

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591427

研究課題名（和文） トリプルアレイ法を応用した新規がん関連遺伝子の同定

研究課題名（英文）

Detection of novel cancer-related genes by using triple combination array analysis

研究代表者

野本 周嗣 (NOMOTO SHUJI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：40300967

研究成果の概要（和文）：

がんが遺伝子異常に基づく疾患であることは周知されてきた。どのような遺伝子の異常によりその悪性度が異なるかを検証するために、様々なアレイテクノロジーを用いてがん関連遺伝子の抽出が行われている。

我々は、教室で切除された症例の検体の中で、典型的な一症例を用いて遺伝子発現の異常（発現アレイ）、ゲノムの異常（SNPアレイ）、メチル化の変化（メチル化アレイ）を検出するトリプルアレイ法を考案し、これらのすべてのアレイ解析の結果から新規のがん関連遺伝子を抽出することを試みた。抽出された遺伝子は多種にわたり、予後や再発しやすさを予測することが可能であるものが含まれていた。

研究成果の概要（英文）：

It has been known that cancer is a disease associated with the genetic abnormality. Various array technologies have been used to extract genes which were related tumor initiation and progression. We have devised a triple combination array analysis which consisted the expression array, the SNP array, and the methylation array to identify tumor related genes. We could predict prognosis and/or recurrence using some of the extracted genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：トリプルアレイ法、発現アレイ、SNPアレイ、メチレーションアレイ、消化器癌

1. 研究開始当初の背景

がんは本質的にゲノムの異常に基づく疾

患であって、ヒトの発がんに関与する分子の多くは、がんで特異的に認められるゲノムの異常、LOHや変異などの解析を通じて同定されてきた。一方、このゲノム異常の結果、がん組織（細胞）に認められる遺伝子発現の変化からがんに関与する分子を同定する試みも行われてきた。

近年のヒトゲノムの構造に関する知見の急速な集積とゲノム解析技術の格段の進歩によって、がんにおけるゲノムの異常を高速かつ高精度に解析することが可能となっており、ヒトがんの発症に関わる分子の同定が今後ますます加速されると思われる。ポストゲノム時代を担う先端技術として注目されているcDNAマイクロアレイは数千～数万に及ぶ遺伝子の発現量を一度に解析し得るツールであり、これを駆使して遺伝子異常の検索を行う方法が行われている。

最近になると、個人個人が持っている遺伝子多型（Single Nucleotide Polymorphism：SNP）が、がんになり易さ、その進行程度、抗がん剤の効果や副作用に影響していることも判明し、これらを追及するため、ヒトゲノムに散在するSNPを集めたアレイが開発された。SNPアレイは、一枚のアレイについて数百万個のアレル特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いて数万～数十万か所のSNPについて遺伝子型の並列タイピングが可能であるが、SNPタイピングの際のアレイシグナルの定量的特性を利用することにより、原理的にはこれをゲノムコピー数の定量に用いることが可能であり、がん組織でのゲノム増幅や欠失の部位を詳細に知ることが出来るようになった。

さらに最近になり、ヒトゲノム中14,000以上の遺伝子から選択された27,578のCpGサイトを1塩基の解像度でメチル化解析を行うことが可能となるメチル化解析アレイが開発され、非癌部DNAと癌部DNAを比較することにより、癌特異的な遺伝子メチル化変化を網羅的に検討することが可能となった。

2. 研究の目的

これまでの報告では、それぞれ単体のアレイを用いた、cDNAマイクロアレイに基づいて癌における遺伝子発現異常を検討する仕事や、SNPアレイで癌においてゲノムコピー数の異常がどの染色体領域にあるか、また、メチル化アレイにて、癌組織でメチル化変化を来たした遺伝子を同定するような仕事が数多く報告されている。

しかし、同一検体に対して、遺伝子発現の異常とゲノムの異常、さらにメチル化変

化のすべての情報を得て、新規がん関連遺伝子を抽出する、という試みは行われてはいない。

これらのテクノロジーを駆使して、新規がん関連遺伝子を同定することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

我々は、肝細胞癌の代表的な症例を選択し、DNA、RNAの抽出を行い、トリプルアレイの実施はAffimetrix社のプロトコールに厳密に従って発現アレイとSNPアレイを行い、メチル化解析アレイはMBL医学生物学研究所のプロトコールに厳密に従って実施した。

トリプルアレイを行った後には、発現profilingとSNPアレイによる染色体コピー数を比較し、またメチル化の変化をみながら癌関連遺伝子の候補を抽出していく。

まず、第一に染色体の欠失を認める領域から発現低下している遺伝子を抽出し、癌抑制遺伝子の候補として検討し、さらにメチル化の様子をみる。

発現の低下している遺伝子で、癌組織で特異的にメチル化を認める遺伝子は、プロモーターメチレーションのかかった癌抑制遺伝子の候補として抽出する。

トリプルアレイ法により抽出された遺伝子について、肝細胞がん細胞株でメチル化特異的PCR（MSP）、Bisulfate処理をしたDNAでのプロモーター領域のSequence、また、Bisulfate処理による発現の変化をmRNAはRT-PCRにて、蛋白レベルではウェスタン法にて検討することにより、メチル化がかかった遺伝子かどうかを調べる。細胞株でメチル化を認めた遺伝子はさらに、48症例の患者検体でもMSPを行い、その頻度を調べる。これらにより得られた結果につき、臨床病理学的な所見との相関や予後、無再発生存期間との関連を統計学的に検討する。

4. 研究成果

我々はC型慢性肝炎を母体とする典型的なHCC症例を用いて、腫瘍部と非腫瘍部を比較したトリプルアレイ法を実施した。まず、(1)発現アレイで腫瘍部が非腫瘍部と比較し発現低下しており、(2)メチル化アレイで非腫瘍部よりも腫瘍部のメチル化値（0～1：値が大きいほどプロモーター領域のCpGがメチル化されている）が0.5以上大きな分子を抽出した。その後、(3)この分子の遺伝子座の状況をSNPアレイにより検索し

た。これにより、腫瘍部で発現が低下し、その機序がメチル化によると考えられる分子を同定した。

抽出された分子について、当科で切除した48例の肝細胞がん症例にて腫瘍部、非腫瘍部の病理学的な関連と予後、無再発生存期間との関連を検討したところ、これまで悪性腫瘍との関連の報告がほとんどみられなかった分子でも再発や予後に有意差を認めるものがあり、がんの発生や進展に関連することが考えられた。これらの結果について学会での発表や論文を作成し報告してきた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Masamichi Hayashi, Shuji Nomoto, Mitsuro Kanda, Yukiyasu Okamura, Yoko Nishikawa, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Shin Takeda, Yasuhiro Kodera. Identification of the A Kinase Anchor Protein 12 (AKAP12) Gene as a Candidate Tumor Suppressor of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* (査読有) 105(4):381-386, 2012 [DOI: 10.1002/jso.22135]
- ② Daisuke Kobayashi, Shuji Nomoto, Yasuhiro Kodera, Michitaka Fujiwara, Masahiko Koike, Goro Nakayama, Norifumi Ohashi, Akimasa Nakao. Suppressor of Cytokine Signaling 4 Detected as a Novel Gastric Cancer Suppressor Gene using Double Combination Array Analysis. *World Journal of Surgery* (査読有) 36(2):362-372, 2012 [DOI: 10.1007/s00268-011-1358-2]
- ③ Yukiyasu Okamura, Shuji Nomoto, Masamichi Hayashi, Mitsuhiro Hishida, Yoko Nishikawa, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Shin Takeda, Yasuhiro Kodera, Akimasa Nakao. Identification of the bleomycin hydrolase gene as a methylated tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma using a novel triple-combination array method. *Cancer Letters* (査読有) 312(2):150-157, 2011 [DOI: 10.1016/j.canlet.2011.07.028]
- ④ Mitsuro Kanda, Shuji Nomoto, Yukiyasu

Okamura, Masamichi Hayashi, Mitsuhiro Hishida, Tsutomu Fujii, Yoko Nishikawa, Hiroyuki Sugimoto, Shin Takeda, Akimasa Nakao. Promoter hypermethylation of fibulin 1 gene is associated with tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Molecular Carcinogenesis* (査読有) 50(8):571-579, 2011 [DOI: 10.1002/mc.20735]

- ⑤ Yukiyasu Okamura, Shuji Nomoto, Mitsuro Kanda, Masamichi Hayashi, Yoko Nishikawa, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Shin Takeda, Akimasa Nakao. Reduced Expression of Reelin (RELN) Gene Is Associated With High Recurrence Rate of Hepatocellular Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology* (査読有) 18(2):572-579, 2011 [DOI: 10.1245/s10434-010-1273-z]

[学会発表] (計30件)

- ① 野本周嗣, 林 真路, 菱田光洋, 猪川祥邦, 小寺泰弘. トリプルアレイ法による新規肝細胞癌関連遺伝子, CCNJ 遺伝子の抽出. 第67回日本消化器外科学会総会 2012. 7. 19 富山 (富山県民会館)
- ② 猪川祥邦, 野本周嗣, 林 真路, 菱田光洋, 小寺泰弘. トリプルアレイ法により抽出したHCCの新規癌関連遺伝子, DCDC2の検討. 第67回日本消化器外科学会総会 2012. 7. 19 富山 (富山県民会館)
- ③ 菱田光洋, 野本周嗣, 猪川祥邦, 林 真路, 山田 豪, 藤井 努, 杉本博行, 竹田伸, 小寺泰弘. トリプルアレイ法を用い検出されたPTK7遺伝子の, 肝細胞癌における発現の検討. 第67回日本消化器外科学会総会 2012. 7. 19 富山 (富山県民会館)
- ④ 林 真路, 野本周嗣, 菱田光洋, 猪川祥邦, 山田 豪, 藤井 努, 杉本博行, 竹田伸, 小寺泰弘. 肝細胞癌におけるトリプルアレイ法による癌関連遺伝子の検索 ~ COL1A1 遺伝子の解析 ~. 第112回日本外科学会定期学術集会 2012. 4. 13 千葉 (幕張メッセ)
- ⑤ 野本周嗣, 林 真路, 菱田光洋, 猪川祥邦, 山田 豪, 藤井 努, 杉本博行, 竹田伸, 小寺泰弘. トリプルアレイ法を用いた新規肝細胞癌関連遺伝子 STEP4 の抽出. 第112回日本外科学会定期学術集会 2012. 4. 12 千葉 (幕張メッセ)
- ⑥ Shuji Nomoto, Mitsuhiro Hishida, Yoshikuni Inokawa, Yasuhiro Kodera. Use of Triple Combination Array Analysis to Identify Steap Family

Member 4 (STEAP4), A Novel Tumor Related Gene in Hepatocellular Carcinoma. 10th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society 2012.1.14 Seoul, Korea

- ⑦ Mitsuhiro Hishida, Shuji Nomoto, Yoshikkuni Inokawa, Yasuhiro Kodera. Availability of a Newly Designed Technique, Triple-Combination Array Analysis: Identification of Estrogen Receptor 1 Gene in Hepatocellular Carcinoma Using This Method. 10th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society 2012.1.14 Seoul, Korea
- ⑧ Yoshikkuni Inokawa, Shuji Nomoto, Mitsuhiro Hishida, Yasuhiro Kodera. Doublecortin Domain Containing 2 (DCDC2) Gene, A New Candidate of Tumor Suppressor Gene of Hepatocellular Carcinoma Detected by Triple Combination Array Analysis. 10th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society 2012.1.14 Seoul, Korea
- ⑨ 野本周嗣, 岡村行泰, 林 真路, 菱田光洋, 竹田 伸, 杉本博行, 藤井 努, 山田豪, 小寺泰弘. トリプルアレイ法を用いたHCC 新規癌関連遺伝子, STEAP4, の同定. 第49回日本癌治療学会学術集会 2011.10.27 名古屋 (名古屋国際会議場)
- ⑩ 岡村行泰, 野本周嗣, 林 真路, 菱田光洋, 藤井 努, 杉本博行, 竹田 伸, 中尾昭公. トリプルアレイ法を用いた肝細胞癌における新規癌関連遺伝子検出の試み—Bleomycin hydrolase (BLMH) 遺伝子に関する検討—. 第111回日本外科学会定期学術集会 2011.5.26 (震災のため紙上開催)
- ⑪ Shuji Nomoto, Shin Takeda, Hideki Kasuya, Yasuhiro Kodera, Michitaka Fujiwara, Masahiko Koike, Akimasa Nakao. EFEMP1, a novel tumor suppressor gene detected in hepatocellular carcinoma using double combination array analysis. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2010.9.22 大阪 (リーガロイヤルホテル大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野本 周嗣 (NOMOTO SHUJI)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号: 40300967

(2) 研究分担者

粕谷 英樹 (KASUYA HIDEKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 00402636

中尾 昭公 (NAKAO AKIMASA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70167542
(H22~H23)

(3) 連携研究者

連携研究者なし