

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 24 年 4 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700903

研究課題名（和文） 消化管癌遺伝子異常の網羅的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of the genomic alterations of gastrointestinal cancers

研究代表者

多田 素久 (TADA MOTOHISA)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00554239

研究成果の概要（和文）：まず、胃癌・大腸癌細胞株 69 個について、高密度オリゴヌクレオチド SNP アレイを用いて遺伝子異常(DNA コピー数変化および Loss of heterozygosity (LOH))の網羅的検索を行った。そして、高頻度に見られた異常に関して胃・大腸癌手術検体 106 例を用いて検証を行った。その結果、これまでに報告のない多数の遺伝子増幅・欠失、LOH が明らかになった他、ステージ I, II において、LOH を来たす遺伝子数の多い胃・大腸癌患者では、少ない癌に比べ有意に生命予後が不良であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： We performed genome-wide analysis of 35 colorectal cancer (CC) and 34 gastric cancer (GC) cell lines for areas of DNA copy number changes and loss of heterozygosity (LOH) by the use of high-density single nucleotide polymorphism (SNP) array. The results from the array analysis were verified in 106 cancer tissues (CC; 64, GC; 42) by genomic quantitative real-time PCR and LOH analysis. Several never-detected genomic alterations were detected. Moreover, the overall survival of the patients with LOH with high frequency prolonged compared to that of the patients with LOH with low frequency.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 消化管癌臨床の動向

2006 年の統計によれば、わが国における胃癌・大腸癌による死亡者は全癌死亡者数のうちそれぞれ第 2 位、第 3 位を占め、合計死亡

者数は全癌死亡の約 28%と 1/4 以上となっている。胃癌死亡者数は減少傾向にあるものの、大腸癌死亡者数は増加の一途をたどっている。また、近年の治療技術の進歩により内視鏡的に切除可能な癌が増えつつある一方、進

行癌に対しては有効な治療手段がないのが現状である。また、早期癌と思われるものでも、術後早期に再発する場合も少なくなく、微小転移の存在が推測されている。また、切除不能・再発癌に対する化学療法に関していえば胃癌ではS-1+Cisplatinが標準療法とされ、その他 irinotecan や paclitaxel, docetaxel などが使用されており、大腸癌に対しては FOLFOX (Fluorouracil+Leucovorin+oxaliplatin) や FOLFILI (Fluorouracil+Leucovorin+Irinotecan) が使用されているが、奏効率や予後改善効果は十分ではない。近年分子生物学の手法の進歩により、特定のシグナルに関与する分子を target とする分子標的治療が各種癌に対して施行されており、大腸癌に対しても血管内皮成長因子 (VEGF) を標的とする bevacizumab や上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) を標的とする cetuximab が使用されるようになってきたが、奏効率や予後に関する上乗せ効果は十分とはいえず、また、K-Ras 変異型の大腸癌に cetuximab を使用しても予後改善がみられないとの報告は記憶に新しく、一方胃癌では確立した分子標的治療は皆無である。

(2) 消化管癌基礎研究の動向 (遺伝子異常を中心に)

これまでに、大腸癌の発癌機序としては、正常粘膜から APC 変異による線腫形成→K-Ras 変異による線腫の増大→p53 変異による癌化→更なる遺伝子変異の蓄積による癌の進行という adenoma-carcinoma sequence が提唱されている。一方、ミスマッチ修復遺伝子の機能異常により生じるマイクロサテライト不安定性 (MSI) により、TGF-βII 型受容体遺伝子など繰り返し配列を有する遺伝子変異の蓄積により発癌することも知られている (*Hum. Pathol.* 2008)。一方、胃癌に関しては、ヘリコバクター・ピロリの感染による慢性胃炎・萎縮性胃炎を母地として発癌にいたる intestinal type と炎症を経ずに発癌するスキルス胃癌のような diffuse type の 2 種類が知られている。しかしながら、大腸癌で ras, p53, APC の変異を併せ持つものはわずか 7% という報告もあり、また、胃癌では上記の発癌過程に関わる分子は不明で、慢性骨髄性白血病における Bcr-Abl のような鍵となる、特異的な遺伝子異常に関してはいまだ明らかとなっていない。

(3) 遺伝子異常の網羅的解析方法の動向 (従来より、染色体コピー数変化のゲノムワイ

ドな同定方法として、Comparative Genomic Hybridization (CGH) が知られており、CGH により遺伝子コピー数異常が調べられていたが、解像度が 10-20 Mbp と低く、責任遺伝子の同定は困難であった。その後、数百~数千個の BAC クローン, cDNA をプローブとして搭載したアレイ (array-based CGH) の登場により解像度が 100 Kbp 以下と改善し、消化管癌の解析にも応用されるようになったが、CGH を用いた解析の場合、もう一つのゲノム異常である Loss of Heterozygosity (LOH) を検出することができなかった。一方、LOH の解析方法として restriction fragment length polymorphism (RFLP) やマイクロサテライトマーカーを用いた方法が知られていたが、解像度が低く、網羅性という観点からは難点があった。ところが近年になり、大規模 Single nucleotide polymorphism (SNP) タイピングを目的として開発された高密度オリゴヌクレオチドアレイが、原理的に染色体コピー数と LOH を同時に解析できることがわかり、肺癌、膀胱がんなどのさまざまな癌のゲノム異常解析に応用されつつある。

(4) これまでのわれわれの研究

これまでわれわれは、高密度オリゴヌクレオチド SNP アレイを用いて肝細胞癌・膵癌の遺伝子異常の網羅的解析を行ってきた。肝細胞癌細胞株 17 種において高頻度に増幅している染色体領域 10 ヶ所を同定し、これら高度増幅領域に含まれる遺伝子群について 70 例の肝細胞癌手術検体を用いた解析から、肝細胞癌の早期再発に関わる候補分子として Grainyhead-like 2 (GRHL2) を、また、腫瘍径・病理組織学的悪性度に関連する因子として Tax-1-binding protein 1 (TAX1BP1) 及び CyclinD1 (CCND1) を見出した (*J. Hepatol.* 2008)。また、膵癌細胞株 26 腫において高頻度に増幅している染色体領域 23 ヶ所を同定、うち新規の 8 ヶ所について膵癌手術検体を用いて解析したところ最大 35% の症例で遺伝子増幅がみられた (*Oncology* 2008)。

2. 研究の目的

上記の経験を踏まえて、高密度オリゴヌクレオチド SNP アレイを用いて、消化管癌 (胃癌・大腸癌) の遺伝子異常の網羅的解析を行う。解析を通して①胃癌・大腸癌の遺伝子異常プロファイルを作成する。②胃癌・大腸癌の発生、進展に寄与する新規遺伝子を同定する。③患者の臨床病理学的背景因子および予後と遺伝子異常とを比較することで、新規のマーカーを同定する、ただしこのマーカーは

個々の遺伝子単位でなく、たとえば5個の遺伝子のうち何個以上異常なら予後不良、などの molecular signature でもよい。乳がんにおいては OncotypeDx あるいは MammoPrint などによってゲノム解析を行い、予後を予測することによって適正な治療法を選択する方法が欧米では実用化されているが、消化管癌においてはこのような報告はない。以上3点を最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) 高密度オリゴヌクレオチド SNP アレイを用いた消化管癌細胞株における遺伝子異常の網羅的解析

これまでに、われわれは肝細胞癌・膵癌の遺伝子異常の網羅的解析を行う際、まず細胞株での検討を行い、複数の細胞株で高頻度かつ高度に異常をきたしている領域から遺伝子を抽出、実際の臨床検体で同様に異常がみられるかどうか検討するという手法で早期再発や悪性度に深く寄与する遺伝子を同定してきた (*J. Hepatol.* 2008, *Oncology* 2008)。細胞株の解析を最初に行う利点としては、腫瘍細胞の純度が高いことが挙げられる。実際の臨床検体の解析では、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションしても微量な間質細胞やリンパ球の混入は避けられず、アレイ解析の妨げになる。一方、細胞株の場合、継代を繰り返しているうちに遺伝子異常が付加されていく可能性は否定できないが、その場合、遺伝子異常は at random に入り、複数の細胞株の同一の領域に遺伝子異常が蓄積されていく可能性は低いと考えられるので、複数の細胞株で高頻度かつ高度に異常をきたしている領域は発癌の鍵分子である可能性が高く、さらに臨床検体でそれを確認することで、より生物学的意義が明らかとなる。また、array CGH の手法を用いて細胞株と臨床検体の遺伝子異常のプロファイルの比較したところほぼ同様であったとの過去の報告もある (*Douglas EJ, et al. Cancer Res* 2004)。

SNP アレイは Affymetrix 社の GeneChip Human Mapping 100K Set を使用する。これは約 10 万個の SNP 特異的プローブが平均間隔 23.6 Kbp で搭載されている高密度のアレイで従来の array CGH に比べ高解像度であるため、より小さい増幅や欠失が同定可能となっている。また、SNPcall の有無により LOH の有無が判定可能となっている。さらに、もう一つの工夫点は解析ソフトとして CNAG (Copy Number Analyzer for GeneChip) を用いることである。基本的な機能は、SNP 判定に用い

たプローブのシグナル強度を用いてゲノムのコピー数を計測するというものだが、従来の解析ソフトに比べ、実験間誤差の補正によりノイズが低下し、高いシグナル/ノイズ比を実現している。また、通常は癌部のコピー数の判定の際は正常組織との比較が必要であるが、CNAG を用いることで、細胞株のような正常自己対照のない場合でも、最適な reference sample の選択がなされ、コピー数変化及び LOH の判定が可能となっている。

実際には、当施設で保管している消化管癌細胞株(胃癌 34 種、大腸癌 35 種)から DNA を抽出し、上記システムを用いて解析し、それぞれの細胞株に関して増幅、欠失、LOH のマップを作成した。

(2) アレイ解析結果の、臨床検体を用いた validation と臨床病理学的背景因子および予後との関連の解析

アレイ解析結果から、胃癌、大腸癌細胞株のそれぞれにおいて、複数の細胞株でコピー数 5 以上、あるいはコピー数 0 (ホモ欠失) をきたした領域を選択し、その領域に含まれる遺伝子について、細胞株における validation を行った。手法としては、genomic real-time PCR によるコピー数の計測および real-time RT-PCR による mRNA の発現検討である。それによりコピー数増加と mRNA 発現増加の相関がみられた 10 遺伝子について、手術検体を用いた DNA コピー数の計測を行った。また、ホモ欠失を来たした領域に含まれる遺伝子に関しては LOH 解析を行った。解析に供した手術検体は胃癌 42 例、大腸癌 64 例である。なお、より正確を期するため、これらの手術検体からレーザーキャプチャーマイクロダイセクションの手法で癌部を切り出し、核酸抽出を行った。近年、正常組織でも染色体コピー数の変化が見られる (Copy number polymorphism, copy number variant, *Feuk L, et al. Nat Rev Genet* 2006) ことから、非癌部組織も切り出し、同様に核酸抽出を行い解析することとした。

臨床検体の解析から得られた結果と、臨床検体に付随する各種背景因子(年齢、性、大きさ、分化度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移、発生部位、ステージ)および全生存期間と遺伝子異常の相関を解析した。

4. 研究成果

(胃癌) 細胞株のアレイ解析の結果、半数以上で 3p, 4p, 4q, 6q, 8p, 9p, 13q, 17p, 18q の LOH が、75%以上で 7p, 8q, 12q, 20p の増幅が、35%以上で 3p, 4q, 8p, 9p, 15q, 18q

の欠失がみられた。また、複数の細胞株でのコピー数5以上の高度増幅領域はゲノム上に31ヶ所あり、その領域に含まれる遺伝子数はそれぞれ0-16個、最小共通増幅領域は60Kbp、今回新たに見出した領域は14ヶ所であった。細胞株での遺伝子増幅と mRNA 発現が一致していた遺伝子のうち10遺伝子につき手術検体由来 DNA を用いて検証を行った。そうしたところ、MYC (Chr. 8q24.21)が21/42 (50.0%)、PAK1 (11p13.5)が19/42 (45.2%)、ITGB4BP (20q11.22)が17/42 (40.5%)の症例と、40%以上の症例でコピー数3以上の増幅を示した。その他、S100P (4p16.1)が14/42 (33.3%)、JAZF1 (7p15.2-1)が13/42 (31.0%)、IRF2 (4q35.1)が13/42 (31.0%)、LAMA3 (18q11.2)が11/42 (26.2%)、MAML2 (11q21)が11/42 (26.2%)、RFC1 (4p14)が11/42 (26.2%)、ARID4B (1q42.3)が10/42 (23.8%)の症例でコピー数3以上の増幅を示した。また、細胞株のホモ欠失領域は26ヶ所、含まれる遺伝子数はそれぞれ0-1個で、最小欠失領域は4.8Kbp、うち13ヶ所が新規に見出された。検証可能であった症例のうちAB051467 (4q22)が16/39 (41.0%)、PTPRD (9p23)が16/38 (42.1%)、A2BP1 (16p13.3)が24/41 (58.5%)、C20orf133 (20p12)が16/41 (39.0%)と、すべての遺伝子について35%以上の症例で LOH を示した。これらの遺伝子異常と手術検体の臨床病理学的背景を検討したところ、遺伝子異常の頻度の高い症例では、有意にリンパ節転移陽性を示した ($p < 0.05$)。また、Stage I, II の胃癌症例では、LOH の頻度の少ない症例で有意に全生存率が良好であった ($p < 0.05$)。

(大腸癌)細胞株全体の傾向として増幅は8q, 13q, 20qで、欠失は3pで、LOHは、3p, 5q, 8p, 9p, 17p, 18p, 18qで高頻度に見られた。複数の細胞株でコピー数5以上の高度増幅を示した部位は23ヶ所で、見出された最小増幅領域は42Kbpであった。また、ホモ欠失を示した部位は、26ヶ所で、最小欠失領域は11Kbpであった。高度増幅を示した部位に含まれる遺伝子について real-time PCR を行ったところコピー数5以上のゲノムの増幅が確認された。また、ホモ欠失を示した部位に含まれる遺伝子について PCR で増幅が見られないことも確認された。上記のうち新規に見いだされた増幅領域は15ヶ所、欠失領域は18ヶ所であった。細胞株での遺伝子増幅と mRNA 発現が一致していた遺伝子のうち10遺伝子につき手術検体由来 DNA を用いて検証を行った。そうしたところ、MYC (8q24.21)が

42/64 (65.6%)、EBAG9 (8q23.1-2)が38/64 (59.4%)、JAZF1 (7p15.2-1)が31/64 (48.4%)、AGR2 (7p21.1)が28/64 (43.8%)、TM4SF13 (7p21.1)が27/64 (42.2%)と、40%以上の症例でコピー数3以上の増幅を示した。その他、SUZ12 (17q11.2)が17/64 (26.6%)、DUSP16 (12p13.2)が16/64 (25.0%)、CSMD3 (8q23.3)が12/64 (18.8%)、CXADR (21q21.1)が12/64 (18.8%)の症例でコピー数3以上の増幅を示した。また、LOH の検討は4遺伝子で行い、検証可能であった症例のうち AB051467 (4q22)が29/61 (47.5%)、PARK2 (6q26)が24/57 (42.1%)、A2BP1 (16p13.3)が33/59 (55.9%)、C20orf133 (20p12)が39/63 (61.9%)と、すべての遺伝子について40%以上の症例で LOH を示した。これらの遺伝子異常と手術検体の臨床病理学的背景を検討したところ、胃癌同様、遺伝子異常の頻度の高い症例では、有意にリンパ節転移陽性を示した ($p < 0.05$)。また、Stage I, II の胃癌症例では、LOH の頻度の少ない症例で有意に全生存率が良好であった ($p < 0.05$)。

以上のことから、これらの遺伝子異常を検討することで、特にステージの低い癌での予後予測することが可能であると考えられた。このことは特にステージ II の癌での術後化学療法を積極的に行う群の抽出に役立つものと考えられた。また、比較的少数の遺伝子解析で済むため、術前内視鏡施行時の生検サンプルを用いた解析も可能と考えられ、術前に、将来的な予後を考慮した治療戦略を立てることが可能であると考えられた。

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1件)
Tada M, Kanai F, Tanaka Y, Sanada M, Nannya Y, Tateishi K, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Imazeki F, Yoshida H, Ogawa S, Yokosuka O, Omata M. Prognostic significance of genetic alterations detected by high-density single nucleotide polymorphism array in gastric cancer. Cancer Sci 2010;101: 1261-1269: 査読有: DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01500.x

[学会発表] (計1件)
Motohisa Tada, Comprehensive analysis of allelic imbalance by using high-density

single nucleotide polymorphism (SNP)
array in gastrointestinal cancer. 13th
Japanese-German Cancer Workshop Sept 19,
2011 Grand Prince Hotel Hiroshima,
Hiroshima, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 素久 (TADA MOTOHISA)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00554239

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：