

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790409

研究課題名（和文）

アレイ CGH 法による粘膜下浸潤胃癌におけるゲノムコピー数異常の網羅的解析

研究課題名（英文）Genomic Profiling of Submucosal-Invasive Gastric Cancer by Array-Based Comparative Genomic Hybridization

研究代表者 黒田 明子（KURODA AKIKO）

大分大学・医学部・医員

研究者番号：10508857

研究成果の概要（和文）：昨年度は粘膜下浸潤胃癌において、11q、14q、17q21のゲノム増幅がリンパ節転移症例で有意に高頻度に検出されることを報告した。本年度はさらに個々の症例におけるゲノム異常について粘膜内部分（MU）と粘膜下部分（SM）を比較した。その結果、23症例中11症例では粘膜下浸潤部分でのゲノム異常数の増加が認められたが、別の11症例では逆に減少しており、粘膜下浸潤に必ずしもゲノム異常の付加が必要ではないことが明らかとなった。つまり、粘膜内には複数の細胞集団が含まれており、限られた細胞が粘膜下へ浸潤しそこで新たな細胞集団を形成することが示唆された。本年度の研究成果より私は胃癌の粘膜下浸潤におけるクローナルエボリューションモデルを提唱した。

研究成果の概要（英文）：Last year, we reported that gain of 11q, 14q and amplification of 17q21 were more frequent in metastatic submucosal-invasive gastric cancers (SMGC). This year, we compared their genomic profiles between paired samples of mucosal (MU) and submucosal (SM) invasion. Eleven of the 23 cases showed an increased number of CNAs in the SM portion as compared with the MU portion, 11 showed a decreased number, identifying that accumulation of chromosomal aberrations were not necessary with submucosal invasion. This result suggested that limited tumor cells among many subpopulations could invade into the submucosa and form subpopulations genetically distinct from the invasive one. On the basis of these findings, we proposed the clonal evolution model for the process of SM invasion of early gastric cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	3200000	960000	4160000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：胃癌、アレイ CGH、粘膜下浸潤胃癌、クローナルエボリューション

1. 研究開始当初の背景

胃癌はいまだにもっとも普遍的な悪性腫瘍の1つである。リンパ節転移は胃癌において最も重要な予後因子の1つである。粘膜内癌のリンパ節転移のリスクは

1.9%であるが、粘膜下浸潤胃癌になると18%にまで増加する。従って、胃癌における粘膜下浸潤のメカニズムを明らかにすることが必要である。悪性腫瘍のゲノム異常を網羅的に解析することがで

きるアレイ CGH 法を用いて、一腫瘍内から回収した複数サンプルを比較することで、腫瘍内における細胞の異種性も解析することが可能である。

2. 研究の目的

ゲノム異常の早期胃癌における、粘膜下浸潤およびリンパ節転移への関わりを明らかにすることを目的とした。

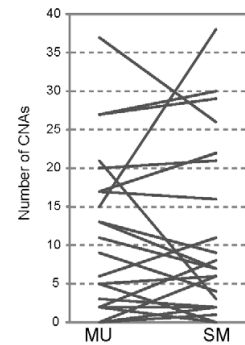
3. 研究の方法

粘膜下浸潤胃癌 27 症例を対象とし、個々の症例で粘膜内部分（以下 MU）と粘膜下部分（以下 SM）、リンパ節転移部分（以下 LN）を別々に採取し（計 59 サンプル）、各々のゲノム異常についてアレイ CGH 法で解析した。

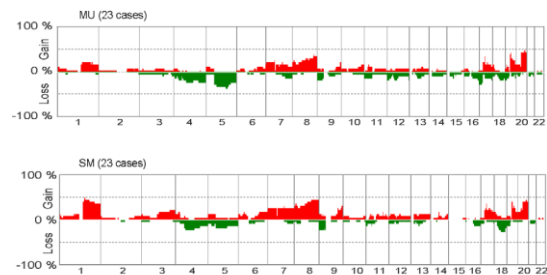
- 1) まず、粘膜下浸潤胃癌の MU と SM を別々に回収し、それぞれの症例の MU と SM における異常領域の数を比較した。それぞれのゲノムコピー数異常を比較することで（23 ペア）、粘膜浸潤の過程で付加されるゲノム異常を同定する。さらに、粘膜下浸潤に特定のゲノム異常が関わっているかどうか明らかにするため、私たちは 23 症例の MU と SM のゲノム異常頻度を比較した。
- 2) 次に、リンパ節転移の過程においてゲノム異常の獲得が重要な役割を果たしているか調べるため、転移性粘膜下浸潤胃癌 9 症例のそれぞれの症例において SM と LN におけるゲノム異常プローブの数を比較した。さらに、早期胃癌のリンパ節転移に特定のゲノム異常が関わっているかどうか明らかにするため、23 症例の SM と LN のゲノム異常頻度を比較した。

4. 研究成果

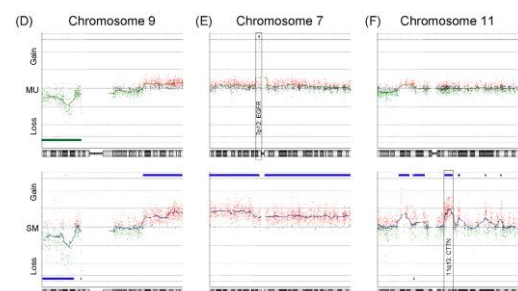
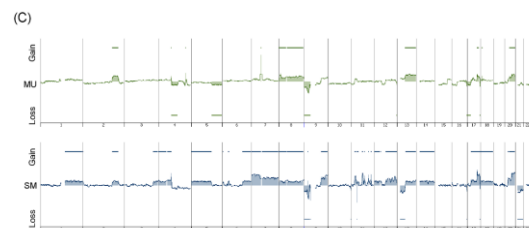
1) まず、MU と SM のゲノム異常を領域の数で比較した結果、23 症例中 11 症例において異常領域の数が増加し、11 症例において減少しており、残りの 1 症例は変化がなく、粘膜下浸潤に必ずしも特定のゲノム異常の付加が必要ではないことが明らかになった。



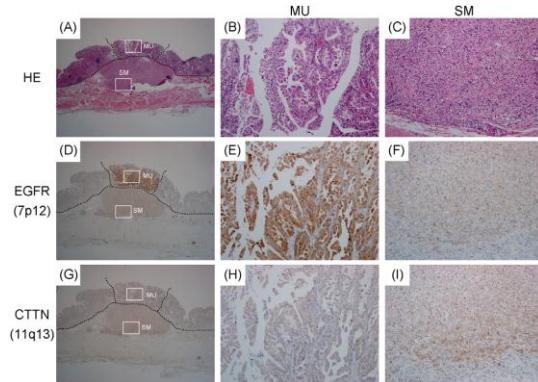
さらに、23 症例の MU と SM のゲノム異常頻度を比較したが、しかし、SM で有意に高い頻度で検出されるゲノム異常はなかった。



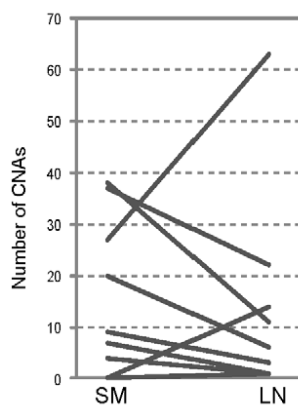
次に、MU のゲノム異常が同一症例内の SM 部分に引き継がれているか解析するため、個々の症例の MU と SM のゲノムプロファイルと比較した。代表例（Case 4）を示す。ペアの MU と SM は 9 番染色体に同じゲノム異常を持っていた。しかし、同一症例の MU と SM において、7p と 11pq に異なるゲノム異常が認められた。これらの結果は、MU と SM が異なる細胞集団であることを示唆する。



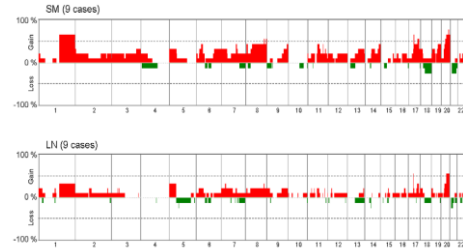
これらの結果から、私たちは **Case 4** の腫瘍細胞は同一のクローンから由来したが、クローナルエボリューションが起り、**MU** と **SM** が異なるゲノム異常を示したと予想した。さらに、**7p** の **Amplification** を持つメジャークローンは粘膜下へ浸潤する性質を有さず、**11pq** の **Gain** を持つマイナークローンは粘膜下へ浸潤し、粘膜下で発達した、と予想した。この可能性を確かめるため、**Case 4** において **MU** のみで amplify していた **7p12** に存在する **EGFR** に対する抗体と **SM** のみで gain していた **11q13** に存在する **CTTN** に対する抗体を用いて、**Case 4** の切片を免疫組織化学的に解析した。下記に示すように、**EGFR** の染色性は **MU** に限定されていた。さらに、**SM** だけが **CTTN** に対する強い染色性を示したこれらの結果は、**Case 4** においてクローナルエボリューションが起こったという私たちの予想を支持する。



2) 転移性粘膜下浸潤胃癌 9 症例において、**SM** と **LN** におけるゲノム異常領域の数を比較した結果、9 症例中 4 症例では **LN** においてゲノム異常領域の数が増加したが、残りの 5 症例では **LN** の方が少なく、**SM** と **LN** の異常領域の数において有意な差は見られなかった。

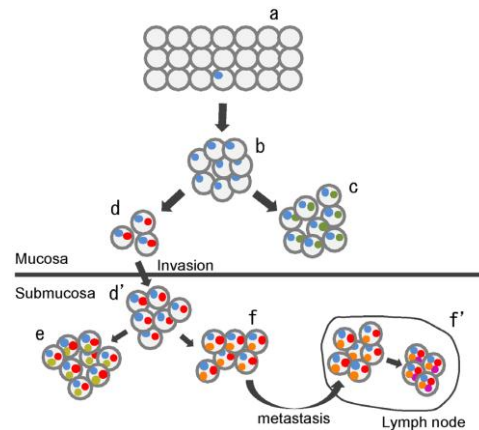


さらに、23 症例の **SM** と **LN** のゲノム異常頻度を比較したが、**LN** で有意に高い頻度で検出されるゲノム異常はなかった。



3) 転移性 **SMGC** の **SM** 部分と **LN** 部分におけるゲノム異常頻度を比較しても、統計的に有意差のある領域が認められなかったことから、転移性 **SMGC** において転移に関わりのあるゲノム異常は、**LN** だけでなく **SM** にも存在すると予想した。そこで次に、転移性 **SMGC** (12 症例) の **SM** と非転移性 **SMGC** (15 症例) の **SM** のゲノム異常頻度を比較した。その結果、**11q13**、**11q14**、**11q22**、**14q32** のゲノム増幅が非転移性の **SMGC** に比べ、転移性 **SMGC** において有意に高頻度で検出された。さらに、**17q12** の **amplification** が転移性 **SMGC** において有意に高頻度で検出された。これらの結果は、**11q13**、**11q14**、**11q22**、**14q32** のゲノム増幅や **17q12** の **amplification** が早期胃癌のリンパ節転移に関わっていることを示唆する。

本研究において私たちは最初、「特定のゲノム異常の獲得が胃癌の粘膜下浸潤に重要である」と仮説を立てた。しかし、これらの結果を合わせると、特定のゲノム異常の獲得よりも、粘膜内部分でクローナルエボリューションにより様々な細胞集団が生み出されることの方が、粘膜下浸潤に重要であるように思われ、そのモデルを提唱した。



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)

Kyoko Yamamoto, Akiko Kuroda,
A Diagnosis of Depression Should Be
Considered in Patients with Multiple
Physical Symptoms in Primary Care
Clinics、TOHOKU JOURNAL OF
EXPERIMENTAL MEDICINE、査読あり、
vol.229、No.4、2013、279-285

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 明子 (KURODA AKIKO)

大分大学・医学部・医員

研究者番号：10508857

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし