

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 6 月 17 日現在

機関番号：24303
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790805
 研究課題名（和文） 染色体異常解析を用いた膵臓癌における発癌原因遺伝子の探索
 研究課題名（英文）
 Research of related genes with carcinogenesis of pancreatic cancer using chromosomal analysis
 研究代表者
 吉田 直久（YOSHIDA NAOHISA）
 京都府立医科大学・医学研究科・講師
 研究者番号：50340089

研究成果の概要（和文）：

我々は膵臓癌に対して spectral karyotyping (SKY)法、fluorescence in situ hybridization (FISH)法を用いて網羅的染色体転座の解析を行った。その中で高頻度に染色体異常を認めた部位の一つである 8p12 に位置する NRG1 が膵臓癌において、その融合遺伝子の存在していると考え、ゲノムアレイ法および bubble PCR 法を用いて解析を行った。t(8;17)(p11.2;q23)、t(8;18)(p23;q12)を有した細胞株 A と t(7;8)(q11.2;p11.2) i(8q)を有した細胞株 B について、細胞株 A ではエクソン 1 の近傍に、一方、細胞株 B での切断点は、エクソン 9 から 17 の間に切断点が存在することを明らかにした。現在更なる解析を行い融合遺伝子の探索を進めている。

研究成果の概要（英文）：

The analyses of spectral karyotyping (SKY) and fluorescence in situ hybridization (FISH) were performed to human pancreatic cell lines. The frequent chromosomal disorder was detected in 8p12. NRG1 in 8p12 was considered as the possibility of fusion gene. The breakpoints of NRG1 was t(8;17)(p11.2;q23), t(8;18)(p23;q12) and t(7;8)(q11.2;p11.2) i(8q). We performed genomic array and bubble PCR to candidate cell lines. The detail breakpoints of NRG1 were exon 1, and exon9-17. We have performed further analyses for these breakpoints to find the fusion gene.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：胆道癌，膵臓癌

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍や骨軟部肉腫では、これまでに病型特異的な染色体異常が同定され、その切断点から原因遺伝子が単離されている。しかしながら固形腫瘍においては染色体異常が複雑なためその解析はすすんでおらず原因遺伝子の単離は困難とされてきた。

2. 研究の目的

我々は予後不良な膵臓癌においてこれまで

に spectral karyotyping (SKY) 法、fluorescence in situ hybridization (FISH)法を用いて網羅的染色体転座の解析を行い、その中で高頻度に染色体異常を認めた部位の一つである 8p12 に位置する NRG1 が膵臓癌において、その融合遺伝子の存在を強く考え、ゲノムアレイ法や我々が開発した cDNA バブル PCR 法を用いてその探索を行っている。新しい発癌メカニズムの発見により膵臓癌の飛躍的な病態の解明を行い将来的にその

予後の改善をはかりたい。

3. 研究の方法

膵臓癌における複雑な染色体転座について対象数を増やし SKY 法による詳細な解析を行う。これまでに Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法により NRG1 (neuregulin 1) 遺伝子のスプリットを確認した細胞株について、NRG1 の融合遺伝子を同定するためゲノムアレイ法および cDNA バブル PCR 法を併用し転座相手遺伝子の解析をすすめていく。融合遺伝子が同定されれば、その産物の機能解析を行い、発癌との関連性についてさらなる検討をすすめる。

1. 膵臓癌における複雑な染色体転座について対象数を増やし解析を行うために、我々がこれまでに造血器腫瘍の染色体解析に用いてきた確立された手技を用いて染色体標本の作成を行う (Genes Chromosomes Cancer. 26: 336-45, 1999)。対象として膵臓癌細胞株および病理組織学的に膵臓癌と診断された患者腹水中の腫瘍細胞を用いて染色体標本を作製し、SKY (spectral karyotyping) 法で網羅的に染色体転座を解析する。具体的には、腫瘍細胞をコルセミドにて処理し、分裂期核の腫瘍細胞を多数作成し、その後 KC1 にて低張処理を行う。得られた染色体検体を固定し、プレパラートに染色体を展開し標本を作成する。蛍光プローブを用い各々の染色体を染め分ける SKY 法を施し蛍光顕微鏡にて karyotype を決定する。

2. 腫瘍細胞より抽出した genomic DNA を高密度オリゴヌクレオチドアレイ (Affymetrix, Human mapping 250K array) を用いてゲノムコピー数を解析し SKY 法のデータと比較し特異的染色体転座における切断点の詳細な同定および相手候補遺伝子の同定を行う。

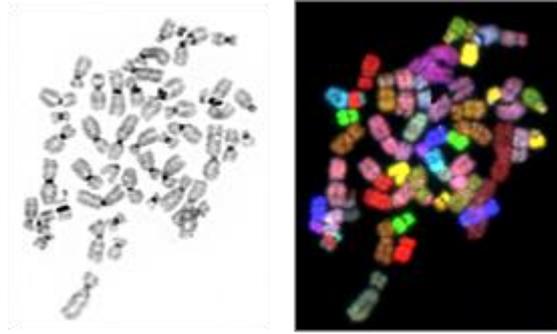
3. 得られた染色体転座点に存在する遺伝子の両端を認識する赤および緑の特異的蛍光プローブを用いて FISH 法を用いてその遺伝子内での切断を確認する。

4. 同定しえた染色体転座関連遺伝子において mRNA レベルでの発現を正常膵組織および腹水腫瘍細胞において RT-PCR を用いて行う。

5. 同定しえた染色体転座関連遺伝子について cDNA バブル PCR 法を用いて相手遺伝子の探索を行う。特にこれまでの解析により FISH 法にて NRG1 遺伝子のスプリットを確認した細胞株について、詳細な解析を行う。

4. 研究成果

細胞株における SKY 像の実例 1



Spectral karyotyping :

39, der (X) t (X;21) (q28;q11.2), -1, der (3) t (3;21) (p12;q22.1), -4, del (5) (q11.2q31), +der (5) t (5;22) (q11.2;q11.2), -6, del (7) (q32), +der (7) t (3;7) (p13;p13), del (8) (p11.2), der (8) t (8;18) (q13;q12), +del (8) (p11.2) (q11.2), del (9) (q13), -10, -11, -11, del (12) (q13), -13, der (14) t (7;14) (q11.2;q32), t (14;20) (q24;p11.2), del (16) (p11.2), der (17) t (3;17) (p21;q25), der (18) t (7;18) (q11.2;q12), der (18) t (17;18) (q21;q21), del (21) (q22.1), -22

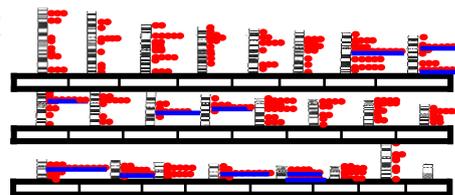
細胞株における SKY 像の実例 2

Spectral karyotyping :

57, X, -X, der (1) (1qter->1p32-36.1;;6q27->6p21.3), der (3) t (X;3) (p11.2;p25), i (5p), del (6) (p21.3), +7, +i (8q), +9, der (9) t (9;17) (p13;q21)x2, +der (10) t (10;15) (p11.2;q24.1), +11, +der (12) t (2;12) (q33;q13), dic (7;13) (q32;p11.2), +der (13) t (13;21) (q12;q22), +der (13) (20qter->20q13.1;;13q14->13p11.2;;12q15->12qter), der (14) t (14;16) (p11.2;q22), +der (15) (15qter->15p13;;7;;13q14->13q32;;2q11.2->2q37;;3p21->3p25;;Xp11.2->Xp22.3;;11p11.2->11qter), -18, del (19) (p13.1)x2, +der (20) (20p12->20q11.2;;13q14->13q32;;2q11.2->2pter), der (22) t (16;22) (q11.2;p11.2), +der (22) t (14;22) (q11.2;p13), +dim(no. 13) (15)

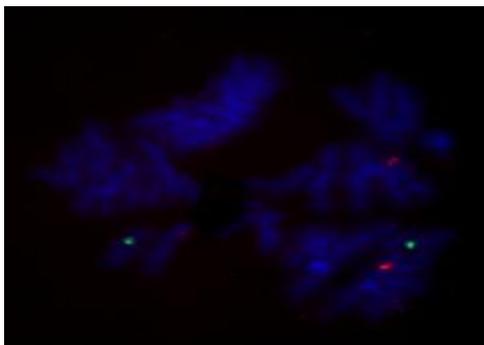
このような複雑な染色体転座を部位 10 個の細胞株について網羅的に解析し転移部位を示した。

染色体転座部位



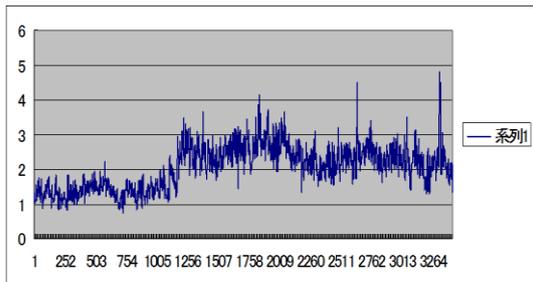
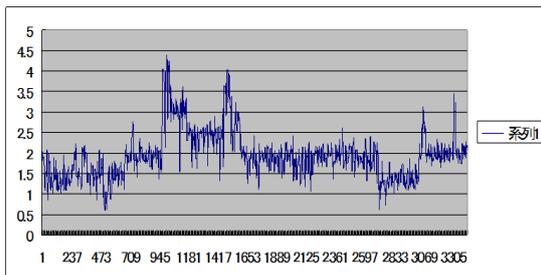
また実際に転座の詳細を解析するため FISH 法での確認を行った。

FISH 像の一例



その中で高頻度に染色体異常を認めた部位の一つである 8p12 に位置する乳癌において融合遺伝子が報告されている NRG1 が膵臓癌においても関連する可能性を考えゲノムアレイ法および FISH 法で詳細な染色体切断点を解析した。8p12 に存在する NRG1 は細胞株 22 株中の 2 株 (9%) において、NRG1 内でゲノム切断が認められた。

陽性例のゲノムアレイ像

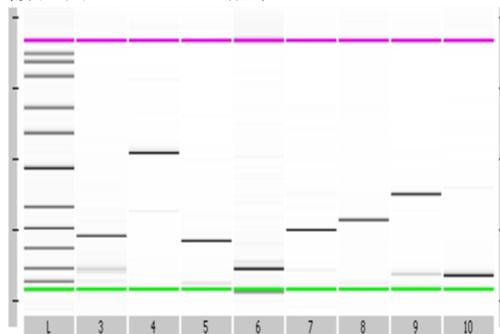


その 2 例について NRG1 に対して染色体転座関連遺伝子について FISH 法にて NRG1 遺伝子のスプリットを確認した細胞株について、詳細な解析を行い t(8;17)(p11.2;q23)、t(8;18)(p23;q12) を有した細胞株 A と t(7;8)(q11.2;p11.2) i(8q) を有した細胞株 B について、細胞株 A ではエクソン 1 の近傍に、一方、細胞株 B での切断点は、エクソン 9 から 17 の間に切断点が存在することを明らかにした。

さらに対象の細胞株についての NRG1 の発現を解析した。NRG1 は 10 種類以上の isoform

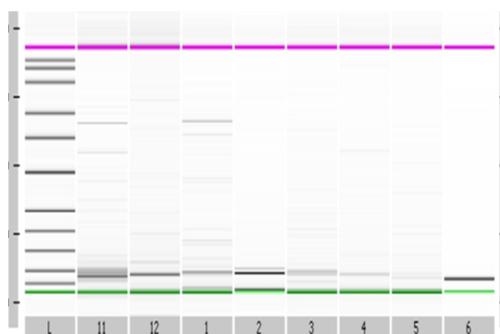
が報告されているため各 isoform を網羅するようにプライマーを設定し RT-PCR にて検討を行った。

陽性例 1 RT-PCR 結果



と陽性例 1 では発現を認めある種の isoform が考えられた。

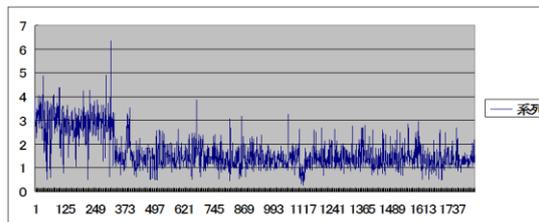
陽性例 2 RT-PCR 結果



陽性例 2 は発現を認めなかった。

さらに 8 番染色体、17 番染色体、および 18 番染色体に予測される転座関連遺伝子を検索するために cDNA バブル PCR 法を用いて相手遺伝子の探索を行った。

特に 18 番染色体についてはゲノムアレイ法にて数のように詳細な切断が解析しえた。



バブル PCR を用いて候補である複数の遺伝子について bubblePCR を行ったが有意な相手電子の同定には至っていない。またさらに高解像度が可能な genomic DNA に対するゲノムアレイ法を施行し染色体切断点および転座関連遺伝子の同定を試みているが有意な相手電子の同定には至っておらずさらなる解析を行っている。

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)

吉田直久、細川豊史、石川剛、八木信明、古倉聡、内藤裕二、中西正芳、國場幸均、大辻英吾、黒星晴夫、谷脇雅史、田口哲也、細井創、中村晃和、三木恒治、種々の癌腫の抗がん剤治療に伴う末梢神経障害に対する牛車腎気丸の有効性、Progress in Medicine、査読有、32、2012、2509-2515

吉田直久、國場幸均、稲田裕、八木信明、古倉聡、内藤裕二、中西正芳、中村晃和、細井創、長谷川大祐、元好貴之、内山清、清水義博、金政和之、谷脇雅史、三木恒治、XELOX療法における治療初期の副作用の解析とその対策について、Progress in Medicine、査読有、32、2012、721-726

Yoshida N, Naito Y, Inada Y, Kugai M, Inoue K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Konishi H, Wakabayashi N, Yagi N, Morimoto Y, Wakabayashi N, Yanagisawa A, Yoshikawa T. The Detection of Surface Patterns by Flexible Spectral Imaging Color Enhancement without Magnification for Diagnosis of Colorectal Polyps. Int J Colorectal Dis. 査読有, 27, 2012, 605-611

Yoshida N, Naito Y, Inada Y, Kugai M, Yagi N, Inoue K, Okuda T, Hasegawa D, Kanemasa K, Kyoichi K, Matsuyama K, Ando T, Takemura T, Shimizu S, Wakabayashi N, Yanagisawa A, Yoshikawa T. Multicenter study of endoscopic mucosal resection using 0.13% hyaluronic acid solution of colorectal polyps less than 20 mm in size. Int J Colorectal Dis. 査読有, 28, 2013, 49-56

Yoshida N, Yagi N, Inada Y, Kugai M, Kamada K, Katada K, Uchiyama K, Ishikawa T, Takagi T, Handa O, Konishi H, Kokura S, Inoue K, Wakabayashi N, Abe Y, Yanagisawa A, Naito Y. Possibility of Ex vivo Animal Training Model for Colorectal Endoscopic Submucosal Dissection. Int J Colorectal Dis 査読有, 28, 2013, 49-56.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 直久 (YOSHIDA NAOHISA)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：50340089

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

