

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860235

研究課題名(和文) 胃癌組織分化に関わる遺伝子の網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of gene expression in different histological types of gastric cancer

研究代表者

中村 律子 (Nakamura, Ritsuko)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20632657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：単一胃癌内の分化度の異なる部位(管状腺癌および低分化腺癌)からRNAを抽出しマイクロアレイで解析した。発現に差がみられた遺伝子をqPCRで確認、マイクロアレイと発現傾向が一致した遺伝子を形態形成に関わる候補遺伝子と考えた。その中から、管状腺癌より低分化腺癌で発現が低下していたHRASLS2 (HRAS like suppressor 2)に着目し、MKN45での安定発現株を作成したところ細胞接着・増殖形態に変化を及ぼした。

研究成果の概要(英文)：Gastric cancer has been classified according to histological types such as tubular adenocarcinoma and poorly differentiated adenocarcinoma. Two or three types are often presented in one tumor. The mechanisms to form the different histological types are not clear yet. To elucidate which molecules are related to morphological formation in gastric cancer, we performed microarray analysis of RNA from a formalin-fixed paraffin-embedded gastric cancer specimen which has both tubular adenocarcinoma and poorly differentiated adenocarcinoma. Several genes which showed different expression level between tubular adenocarcinoma and poorly differentiated adenocarcinoma by microarray were selected and confirmed the RNA expression level using qPCR. We focused on HRASLS2 (HRAS like suppressor 2) and created stable cell line expressing HRASLS2. Compare to the control, HRASLS2 expressing cell line showed different cell adhesion and cell growth pattern.

研究分野：人体病理

キーワード：胃癌 組織型

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞の概念が提唱され、脳、造血器、乳腺、大腸等各種腫瘍においてその存在が明らかにされつつあり癌の発生源であると考えられている。癌とひとこと言っても病理組織学的には多彩な形態を表しそれに応じて分類もされている。癌幹細胞の特定や幹細胞性の維持に關与する遺伝子について解明されつつあるが、癌の分化(消化器癌であれば管腔形成が明瞭な高分化腺癌とびまん性に増生する低分化腺癌)を制御する遺伝子に關しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

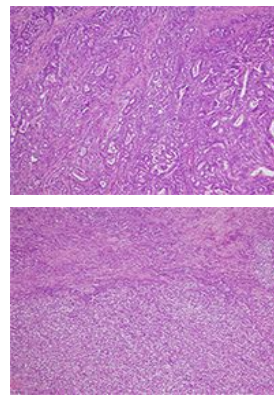
今回の研究では単一腫瘍内においても異なる組織型が存在することが比較のまれではない、胃癌について単一腫瘍内の組織型の異なる部位での発現遺伝子の相違を調査し、癌の分化や形態形成に關わる因子の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胃癌組織からの RNA 精製およびマイクロアレイ解析: 金沢大学附属病院において行われた胃癌の手術検体の中から、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色にて管腔形成の比較的明瞭な部位と、癌細胞が充実に増生し管腔が不明瞭な部位が共存する検体に対し、それぞれの部位および非癌部胃粘膜よりホルマリ固定パラフィン切片から RNeasy FFPE kit (Qiagen 社)にて RNA を採取した。採取された RNA は量・質ともにマイクロアレイに適しているか、Nano drop (Nano drop Technologies) で濃度測定後、2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies) で分解の程度を測定した。RNA 各 1µg を用いて RNA 増幅を施行後に増幅 RNA 8µg を CyDye 標識し 3D-Gene®全遺伝子型 DNA チップ上でそれぞれ反応させた。反応後、3D-Gene Scanner 3000 にてスキャンし、各部位におけるおののの遺伝子の発現を比較した。発現差が 4 倍以上みられた遺伝子を中心に、組織型の相違をもたらす可能性が高い候補遺伝子として選別した。

(2) 定量的 PCR (qPCR) での発現確認: マイクロアレイにて選別された候補遺伝子について、qPCR にて発現を確認した。ホルマリ固定パラフィン切片から採取できる RNA は量が限られているため、多数の遺伝子について解析が困難と推測し、まず胃癌由来の培養細胞内での発現を確認した。細胞株は高分化管状腺癌由来の MKN7、低分化腺癌由来の MKN45、および印環細胞癌由来の KAT03 と HSC39 を用いた。マイクロアレイと細胞株で発現傾向が一致した遺伝子に關して手術検体でも同様に qPCR を行った。

(3) 培養細胞を用いた *in vitro* assay: マイクロアレイと細胞株、手術検体 pPCR 間で発現の増減が一致したものを胃癌形態形成に關わる有力候補遺伝子とした。有力候補遺

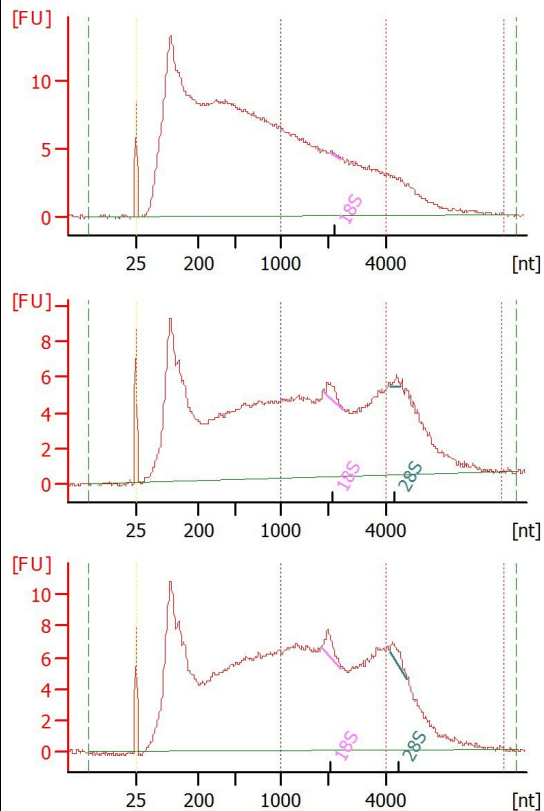


伝子が実際に組織型の差異に關わっているか、培養細胞に強制発現させ、細胞増殖や形態等の変化を観察した。

.....  
 図 1. 上: 管腔形成のみられる部位 (管状腺癌) 下: 充実性増生を示す部位 (低分化腺癌)  
 .....

4. 研究成果

マイクロアレイを施行する際、十分量の分解がない質の良い RNA を使用することが重要であるが、ごく少量しか組織を採取できない未固定凍結組織の中から異なる組織型の胃癌を探し出すことが困難であり、ホルマリ固定パラフィン切片を使用した。管状腺癌 (図 1 上) 低分化腺癌 (図 1 下) および非癌部組織より RNA を抽出した。RNA の状態はいずれも分解が進んでいたものの、マイクロアレイに適応できるレベルであり (図 2) 収量も解析可能な範囲であった。



.....  
 図 2. 精製 RNA の分解度。上: 非癌部、中: 管状腺癌、下: 低分化腺癌。いずれも RNA の高度な分解がみられたものの、増幅を行えばマイクロアレイ解析に使用可能であった。  
 .....

RNA 精製後のマイクロアレイ解析は東レの受託解析にて行った。各遺伝子の管状腺癌、低分化腺癌および非癌部での発現量を比較した結果が図3である。非癌部と管状腺癌(図3上)あるいは非癌部と低分化腺癌(図3中)での遺伝子発現を比較した場合、2本の青線内からはずれた、発現量の差が2倍以上ある遺伝子が多数認められたのに対し、管状腺癌と低分化腺癌を比較した図3下では、差がみられる遺伝子はそれほど多くなく発現量の差も小さいものが多かった。68 遺伝子についてその RNA 発現を管状腺癌由来細胞株である MKN7 および低分化腺癌由来である MKN45 を用いて確認したところ、21 遺伝子がマイクロアレイと細胞株の qPCR の発現傾向が一致した。その 21 遺伝子について、異なる組織型を有する胃癌 4 症例で同様に qPCR にて発現解析したところ、7 遺伝子がマイクロアレイ、細胞株および胃癌検体で似た発現傾向を示した。その中から、低分化腺癌において、非癌部および管状腺癌より発現が低下していた遺伝子の 1 つであった HRASLS2 (HRAS like suppressor 2) に着目した。HRASLS2 はわずかに報告があるもののその発現や機能は不明な点が多い遺伝子である。胃癌細胞株での HRASLS2 の機能を解析するため、強制発現細胞株の作成を試みた。HRASLS2 の cDNA を pCMVTag1 ベクターに組み込み、MKN45 細胞へ

トランスフェクションした。G418 にてセレクションを行い、生存した細胞をウェスタンで HRASLS2 の発現を確認し HRASLS2 安定発現株とした。同様に pCMVTag1 ベクターをトランスフェクションした MKN45 細胞をコントロールとした。図4は各細胞株の培養皿上での状態である。コントロール(右)細胞は細胞塊を形成し増殖する傾向が強いのに対し、HRASLS2 発現細胞株(左)は比較的平面的に増殖していた。HRASLS2 が細胞接着関連の因子に影響を及ぼす可能性が推測され、今後その詳細を検索していく。また3次元培養系を使用し、HRASLS2 がコロニー形成や形態にどのように関与しているか現在検討中である。

図3(左欄). マイクロアレイ結果の遺伝子プロット。1つの点が1遺伝子に相当する。上: 非癌部(横軸)と管状腺癌(縦軸)における遺伝子発現の比較。中: 非癌部(横軸)と低分化腺癌(縦軸)における遺伝子発現の比較。下: 管状腺癌(横軸)と低分化腺癌(縦軸)における遺伝子発現の比較。

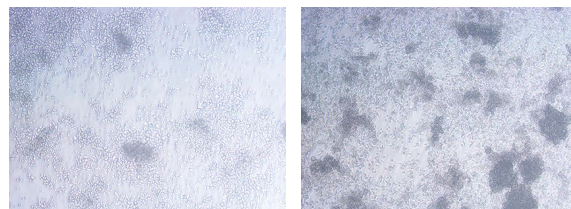
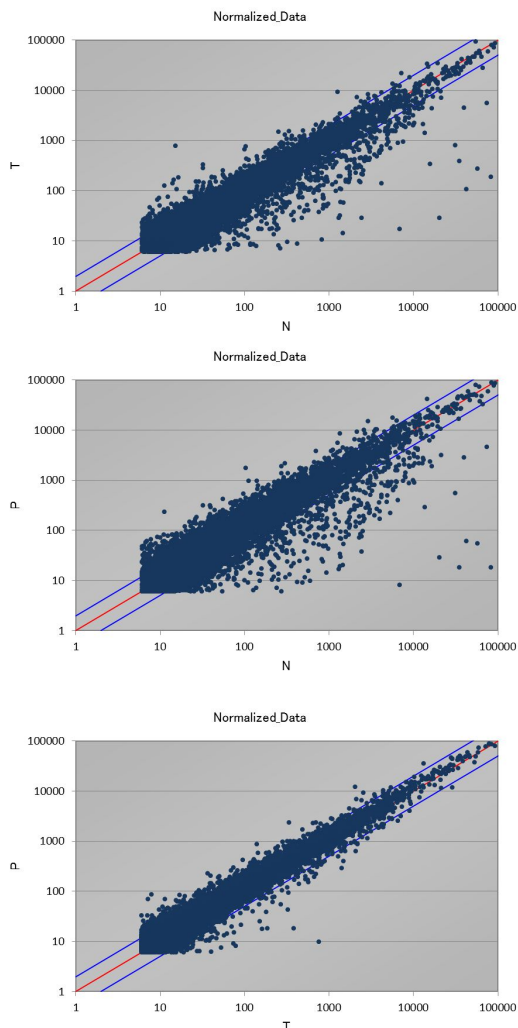


図4. HRASLS2 強制発現による細胞増殖・接着への影響。左: HRASLS2 を安定発現させた MKN45 細胞。右: コントロールベクターを組み込んだ MKN45 細胞。

## 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 2件)

Oyama T, Okamoto K, Nakamura R, Tajiri R, Ikeda H, Ninomiya I, Ooi A  
Overexpression and gene amplification of both ERBB2 and EGFR in an esophageal squamous cell carcinoma revealed by fluorescence in situ hybridization, multiplex ligation-dependent probe amplification and immunohistochemistry. Pathology International, 査読有, 65(11): 608-13, 2015  
DOI:10.1111/pin.12344

Ooi A, Oyama T, Nakamura R, Tajiri R, Ikeda H, Fushida S, Nakamura H, Dobashi Y.  
Semi-comprehensive analysis of gene

amplification in gastric cancers using multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization.  
Modern Pathology, 査読有, 28(6):861-71, 2015  
DOI:10.1038/modpathol.2015.33

〔学会発表〕(計 8件)

FFPE 組織を用いた胃癌の組織分化に関わる遺伝子の網羅的解析

中村 律子、尾山 武、田尻 亮輔、大井 章史  
第 74 回日本癌学会学術総会 2015/10/8 名古屋国際会議場、名古屋

ヒト胃癌においてアレイ CGH 法により高度な遺伝子増幅を呈した炎症関連遺伝子の意義

尾山 武、中村 律子、田尻 亮輔、大井章史  
第 74 回日本癌学会学術総会 2015/10/8 名古屋国際会議場、名古屋

大井 章史、尾山 武、中村 律子、田尻 亮輔、池田 博子、土橋 洋

MLPA と FISH を用いた、進行胃癌の遺伝子増幅の準網羅的解析

第 104 回日本病理学会総会 2015/5/1 名古屋国際会議場、名古屋

尾山 武、中村 律子、田尻 亮輔、大井章史

アレイ CGH 法を用いたヒト胃癌に対するゲノムコピー数異常の網羅的解析

第 104 回日本病理学会総会 2015/4/30 名古屋国際会議場、名古屋

尾山 武、中村 律子、田尻 亮輔、大井 章史

アレイ CGH 法による癌関連遺伝子発現の腫瘍内ヘテロ不均一性を示す部分間におけるゲノムコピー数異常解析

第 73 回日本癌学会学術総会 2014/9/26、パシフィコ横浜、横浜

大井 章史、田尻 亮輔、中村 律子、尾山 武、池田 博子、土橋 洋

MLPA と FISH を用いた胃癌における増幅遺伝子の準網羅的検索

第 73 回日本癌学会学術総会 2014/9/26、パシフィコ横浜、横浜

尾山 武、中村 律子、田尻 良輔、大井 章史

ヒト胃癌における癌関連遺伝子発現の腫瘍内不均一性を示す部分間における遺伝子発現の相違。

第 103 回日本病理学会総会 2014/4/25、広島国際会議場、広島

大井 章史、田尻 亮輔、中村 律子、尾山 武、池田博子、土橋 洋

Multiple ligation-dependent probe amplification と FISH を用いた胃癌における遺伝子増幅の準網羅的検索。

第 103 回日本病理学会総会 2014/4/24、広島国際会議場、広島

〔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

中村 律子 (Nakamura Ritsuko)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20632657