

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 6 月 2 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590350  
 研究課題名（和文）遺伝子発現マイクロアレーを用いた中皮腫の遺伝子発現の解析・メチル化遺伝子の探索  
 研究課題名（英文）*Comprehensive analysis of gene expression in malignant mesothelioma using Affymetrix GeneChip array*  
 研究代表者  
 アマティア ヴィシュワ ジー（AMATYA VISHWA J）  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：90403625

### 研究成果の概要：

凍結材料を用いた研究では、中皮腫と肺腺癌の間で統計学的有意差を持って発現異常のみられる遺伝子のクラスター化を行い、中皮腫では肺腺癌と比較して、231遺伝子の過剰発現、64遺伝子の発現低下が見られた。

FFPE材料を用いた研究では、中皮腫と非腫瘍肺組織の間で統計学的に有意差をもって発現異常の見られる遺伝子のクラスター化を行い、中皮腫では266遺伝子の過剰発現と948遺伝子の発現低下があることが判明した。過剰発現のある遺伝子には、Calbindin2(Calretinin)、Keratin5、PDGF、Ki-67などが含まれ、ホルマリン固定パラフィン包埋材料からでも十分に遺伝子異常の有無を検討できることがわかった。これらの遺伝子の中でReal Time定量RT-PCR法にて、NDRG-1、RARRES-1及びHAS-1遺伝子のmRNAの発現が非腫瘍肺組織と比べ中皮腫には過剰であることが判明した。また、Wnt-signal経路に関する遺伝子では、WIF1、MMP7、 $\beta$ -cateninなどの発現低下とCaM kinase、Nemo-like Kinaseなどの過剰発現を認めた。メチル化及び非メチル化特異的プライマーを用いたMethylation Specific PCRでは、中皮腫の76%と非腫瘍性肺組織の32%にはWIF-1プロモーター領域のメチル化を認め、WIF-1の発現減少はメチル化によるものと考えた。

### 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：中皮腫、遺伝子発現、GeneChip、マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析を行い様々ながんにも過剰発現あるいは発現低下の見られる遺伝子を見出すことが知られている。中皮腫の遺伝子発現の網羅的解析を行われた報告は少ない。

## 2. 研究の目的

中皮腫では、特異的な遺伝子の発現がその発生、増殖、進展に関わっていることを考えられるが、その発生メカニズムの解明や治療の開発に役立つことが明らかにはない。そこで、GeneChip X3P アレイを用いた中皮腫の遺伝子発現解析にもとづいた中皮細胞の悪性のメカニズムまた、各種遺伝子のメチル化の解析によってエピジェネティックな変化の解析を行う。これらの研究からあげられた遺伝子に基づいて中皮腫の早期診断や肺癌との鑑別に重要な遺伝子マーカーの探索を行う。

## 3. 研究の方法

ホルマリン固定パラフィン包埋FFPE組織から RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion 社)にてRNAを抽出し、Turbo DNA-Free kit (Ambion 社)にてDNAを除去し、そのRNAとReference RNA (Stratagene 社)を Experion 高速全自動電気泳動システム (Bio-Rad 社)にかけて上質なRNA (中皮腫7例、非腫瘍肺組織4例、肺腺癌4例、筋肉腫様癌2例、Reference RNA)を選び SenseAMP One Round linear amplification kit (Genisphere 社)を用いてmRNA増幅を行った。

mRNAの増幅後 Genechip X3P にハイブリダイゼーションさせ、遺伝子発現の解析を行う。

その解析から得られた遺伝子単独の発現な

どを検討する。

発現低下した遺伝子の原因の一つであるメチル化を検討する。

## 4. 研究成果

Genechip X3P を用いた研究から中皮腫では266 遺伝子の過剰発現と 948 遺伝子の発現低下があることが判明した。過剰発現のある遺伝子には、Calbindin2 (Calretinin)、Keratin5、PDGF、Ki-67 などが含まれ、ホルマリン固定パラフィン包埋材料からでも十分に遺伝子異常の有無を検討できることがわかった。これらの遺伝子の中で Real Time 定量 RT-PCR 法にて、NDRG-1、RARRES-1 及び HAS-1 遺伝子の mRNA の発現が非腫瘍肺組織と比べ中皮腫には過剰であることが判明した。また、Wnt-signal 経路に関する遺伝子では、WIF1、MMP7、 $\beta$ -catenin などの発現低下と CaM kinase、Nemo-like Kinase などの過剰発現を認めた。メチル化及び非メチル化特異的プライマーを用いた Methylation Specific PCR では、中皮腫の76%と非腫瘍性肺組織の32%には WIF-1 プロモーター領域のメチル化を認め、WIF-1 の発現減少はメチル化によるものと考えた。

## 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 4 件)

1. Amatya VJ, Takeshima Y, Kohno H, Kushitani K, Yamada T, Chikao Morimoto C, Inai K.

Caveolin-1 is a novel immunohistochemical marker to differentiate epithelioid mesothelioma from lung adenocarcinoma.

Histopathology 2009 (In Press)

査読有

2. Takeshima Y, Amatya VJ, Kushitani K, Kaneko M, Inai K.

Value of immunohistochemistry in the Differential Diagnosis of Pleural Sarcomatoid Mesothelioma from Lung Sarcomatoid Carcinoma.

Histopathology 2009 54:667-676

査読有

3. 河野秀和、Amatya VJ、武島幸男、井内康輝.

中皮腫発生に関わるエピジェネティクス.

MOOK「肺癌の臨床 2008～2009」353-360, 2008

査読無, 巻なし

4. Amatya VJ、武島幸男、井内康輝.

中皮腫の遺伝子異常—マイクロアレイを用いた網羅的解析

MOOK「肺癌の臨床 2007～2008」281-291, 2007

査読無, 巻なし

[学会発表] (計 6 件)

1. Vishwa Jeet Amatya、武島幸男、櫛谷 桂、河野秀和、井内康輝

Caveolin-1, a novel marker, differentiated epithelioid mesothelioma

from lung adenocarcinoma

第 49 回日本肺癌学会総会 演説 2008 年 11 月 13 日～11 月 14 日  
北九州市

2. Amatya VJ, Takeshima Y, Kohno H, Kushitani K, Yamada T, Morimoto C and Inai K.

Caveolin-1 is a novel immunohistochemical marker of malignant mesothelioma and differentiated epithelioid mesothelioma from lung adenocarcinoma.

The 9th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group Congress 2008 年 9 月 25 日～9 月 27 日  
Amsterdam, Netherlands

3. Vishwa Jeet Amatya、河野秀和、櫛谷 桂、武島幸男、井内康輝

Caveolin-1 (CAV1) is novel marker of epithelioid mesothelioma (EM) for differentiating it from lung adenocarcinoma (LAC)

第 47 回日本肺癌学会中国・四国支部会 演説 2008 年 7 月 18 日～7 月 19 日  
高知市

4. Vishwa Jeet Amatya、武島幸男、櫛谷 桂、河野秀和、金 龍男、井内康輝

CD26 and Caveolin-1 expression in malignant mesothelioma and lung adenocarcinoma

第 97 回日本病理学会総会 示説 2008 年 5 月 15 日～5 月 17 日  
金沢市

5. Vishwa Jeet Amatya、武島幸男、櫛谷 桂、河野秀和、井内康輝

Gene expression analysis of malignant mesothelioma using FFPE samples

第 48 回日本肺癌学会総会 示説 2007 年 11 月 8 日～11 月 9 日

名古屋市

6. Vishwa Jeet Amatya、武島幸男、櫛谷 桂、  
河野秀和、井内康輝

Gene expression analysis of malignant  
mesothelioma (FFPE samples) using gene  
chip X3P array

第 96 回日本病理学会総会 示説 2007 年 3  
月 13 日～3 月 15 日

大阪市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

アマティア ヴィシュワ ジー (AMATYA  
VISHWA J)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：90403625

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者