

平成 21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390102
 研究課題名 (和文) CGH による癌の生物学的特性評価のためのゲノムマーカー探索と診断チップ開発
 研究課題名 (英文) The development of mini-array for estimating the disease state of carcinoma by array CGH
 研究代表者
 佐々木 功典 (SASAKI KOHSUKE)
 山口大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：80116722

研究成果の概要：

アレイ CGH から得られた DNA コピー数データと臨床病理所見を症例ごとに対比し、臨床病理パラメータと相関する BAC クローン 50 種類を同定し、胃癌専用のミニアレイを作製した。このミニチップの有用性を評価する目的で、新規 30 例の胃癌を用いて検討した。精度はリンパ節転移、肝転移、腹膜播種、深達度に対してそれぞれ 66.7%、86.7%、86.7%、97.6%であった。以上より我々の作製した胃癌専用ミニアレイが治療方針決定に有用な病態情報を提供できることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：アレイ CGH、ミニチップ、ゲノム、胃癌、BAC クローン

1. 研究開始当初の背景

癌研究の急速な進歩により、癌関連情報が大量に蓄積し、癌に対する理解も大いに進んで来た。しかしながら、癌の診断や治療といった臨床応用についていえばそれ程ではないというのが実状であろう。癌の診断、治療を進歩させるには、基礎的研究成果が迅速に「ベッドサイド」にて活用されることが肝要である。中でも診断法の開発は重要である。正確な診断が効果的治療に繋がる。同種類の癌でも低悪性度癌の予後は一般に良好であ

り特殊な集約的治療を必要としない。治療上問題となるのは高悪性度癌である。高度悪性癌は治療抵抗性であり、予後不良であり、一段と積極的治療が必要とされている。癌全体としての治療成績を向上させるためには、この高度悪性癌に対して積極的、集学的治療を行う必要があるとされている。そのためには、治療開始前（病理診断時）に各々の症例について低悪性度癌と高悪性度癌を高い精度で鑑別することが求められる。しかしながら現実には、この鑑別は多くの癌において極めて困難である。癌における「個の医療」を実現

するには、この鑑別が確実に行われなければならない。それには、治療前に癌症例各々の生物学的特性（悪性度）を簡単かつ確実に評価できるマーカーが必要となる。

癌のゲノム解析が一般化し、診断や治療への応用が期待されている。我々は、染色体 Comparative genomic hybridization (cCGH) によって、癌の網羅的ゲノム解析を行い、既に 3,000 例の解析を終えている。

このcCGH解析データから、癌の網羅的解析は癌症例各々の生物学的特性の評価に極めて有用であることが明らかとなった。患者の予後やリンパ節転移等治療上必要な情報も生検材料で術前に推定できる。しかしながら、cCGHであるために、染色体レベルでの情報に過ぎない。正確な病態診断、評価には遺伝子レベルでの解析が求められる。幸い、cCGHを発展させたアレイCGH(aCGH)技術が開発され、遺伝子レベルでの解析が可能となった。我々はこの技術によって、食道癌、胃癌、大腸癌、子宮体癌、肺癌等の網羅的ゲノム解析を行っている。既に、約500例の解析を終了しており、現在は臨床・病理データと照合している。そこから、特定遺伝子の量的異常（DNAコピー数異常）が癌の生物学特性と密接に関係していることが漸次明らかになりつつある（その一部は、2006年韓国癌学会、日本癌学会総会にて発表し、論文として投稿中）。すなわち、これらのゲノム異常が癌の生物学的特性を評価するバイオマーカーとなることが示唆される。本研究では癌の生物学的特性（悪性度）と関係した癌マーカーゲノムを同定するとともに、臨床検査として利用できる疾患（臓器）特異的生物学特性（悪性度）診断ゲノムチップ（BACクローン50種類以下）の開発を目指す。

2. 研究の目的

各種固形癌における生物学的評価のための高精度ゲノムマーカーを同定するが、まずは日常的に遭遇する胃癌、大腸癌についてのマーカー同定をめざす。これらのマーカーは感度、特異度ともに90%以上であることを目指す。高悪性度群と低悪性度群との識別が大きな目的であり、本研究では特に高特異度のゲノムマーカーの同定を優先する。各癌において100-200例のaCGHによるゲノムの網羅的解析データと臨床、病理データを対比することにより、治療前（診断時）にリンパ節転移、肝転移、腹膜播種、進行度、予後を推定可能とするゲノム異常を臨床病理所見を推測するのに有用なマーカー候補として抽出する。これらマーカーの有用性を、幾つかの組み合わせを含めて、新規30症例で実際にテストし、精度の高いマーカーを選択する。

これらの情報から、特定の癌に特異的なマーカーゲノムからなるDNAチップを作製する。チップにスポットされるマーカーゲノムは臨床的実用性とコストを考慮して50種類程度になるように厳選する。

3. 研究の方法

(1) 症例

本研究は山口大学医学部倫理委員会にて承認されており、検体は市中病院外科（ゲノム解析研究の検体提供機関であり、本学倫理委員会にて承認済みである。）から患者の同意を得た癌組織を用いて行った。（胃癌ではゲノムマーカー同定のために83例、できあがったゲノムチップの評価のために30例の癌組織を使用した。）

(2) アレイCGH

癌組織から凍結切片を作製し、tissue microdissectionにて癌細胞を分取し、間質成分の混入が少ない癌ゲノムDNAを抽出し、これを利用してアレイCGH(aCGH)を行った。（アレイCGHはヒトゲノム全域を1,440BACクローンでカバーするMacArrayTM Karyo1400 (Macrogen Inc., Seoul, Korea)を使用した。）

(3) アレイCGHデータ解析

マーカークローン同定用の83例のアレイCGHのデータは二つの独立した方法で解析した。一つは①WEKA decision-tree model classifier、もう一つは②2群間での有意差検定である。それぞれの解析法で臨床病理事項を推定するのに有用なクローンを選定した。

(4) 胃癌用ミニアレイの作製

胃癌83例のアレイCGHのデータを解析し、選定された胃癌の臨床病理所見推定に有用なBACクローン、胃癌でコピー数異常の頻度が高いクローンと逆にコピー数異常の頻度が低いクローン、さらにリファレンスクローンニからなる胃癌用のミニアレイを作製する（図1）。

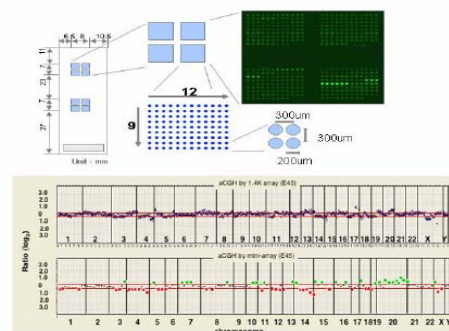


図1 胃癌用ミニアレイの概要

(5) 胃癌用ミニアレイの評価

作製した胃癌用ミニアレイの精度をクローン同定に使用した83症例とは別の新規症例30例を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 臨床病理所見推定に有用なBACクローンの選定

胃癌83例のアレイCGHの結果を方法で記した2種類の解析を行ったところ、リンパ節転移の有無、肝転移の有無、腹膜播種の有無、早期癌か進行癌か、組織型(intestinal type か diffuse type か) を評価するのに有用なクローンが、WEKA decision-tree model classifier で24BACクローン、2群間での有意差検定で26BACクローン、合計50クローンが同定された。(図2、表1)

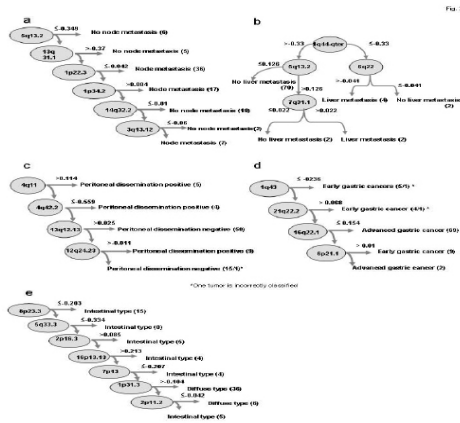


図2 Decision tree によるクローンの選定

BAC ID	Chrom. region	Candidate Gene	Frequency of DCN4(+)	Frequency of DCN4(-)	P-value*
Gastric					
Node metastasis					
225	3q24.32	TNFR1/22D	7	26	0.0005
1308	5q13.1	PCNOL, PNC1/3034	7	43	0.0005
491	16p13.11	PND/1P3	5	35	0.0006
884	19q13.32	N2	5	30	0.0006
Liver metastasis					
1232	19p13.2	CHIA, C1orf88, OVGF1	42	67	<0.0001
1271	9p23	N1	47	13	0.0016
92	11p15	SFS	40	5	0.0006
Peritoneal dissemination					
948	15q21.1	HYDHL, LDHAL4B	32	0	0.0002
155	9q21.2	IKK	32	5	0.0009
Histologic type					
543	19q13.3	DIPCC	7	28	0.0011
911	19q14.2	SPRN1, CHEK1, CWRFR1	0	33	0.0013
Liver					
Node metastasis					
936	8q21.2	DOCK5, GNAH1, KCTD9, CDCA2	3	23	0.0013
1158	8q21.21	EXTL3	3	21	0.0013
878	13q31.2	SJTRK5	13	47	0.0007
Liver metastasis					
877	12p33.3	LRR6	50	5	0.0006
1286	7q35	CNTNAP2	43	4	0.0001
209	21q22.3	HGF2BP, KIAA0179	29	1	0.0002
Peritoneal dissemination					
1407	3q26.3	CNTN6	32	6	0.0009
903	3q24.3	UBR3E1	32	6	0.0009
229	4q31.1	MAP3L3	46	5	<0.0001
Histologic type					
1282	4q34.1	N1	17	23	0.0004
1293	5q31.2	THSD4	15	49	0.0007
91	8q21.2	INTS10	0	24	0.0006
227	14q32.33	IGFBP3-2	16	54	0.0001
1122	15q21.3	GAMC, CAPN3	2	27	0.0003
1210	17q11.2	ATP5A3, ZZZF1	5	41	0.0001

表1 有意差検定によるクローンの選定

これら50クローンに加えて、アレイCGHでコピー数の増減の頻度が高かった26クローン、レファレンスとして62クローン、合計138クローンを貼り付けた胃癌の悪性度評価に特化したミニアレイを作製した。

(2) 胃癌用ミニアレイの評価

作製した胃癌用ミニアレイの精度を評価するために、新規の胃癌30症例を用いて検討した。表2にミニアレイでの予測と実際との一致率、感度、特異度について示した。

	Node Metastasis	Liver Metastasis	Peritoneal Dissemination	Advanced cancers
Accuracy	19/30 (63.3%)	27/30 (90.0%)	15/30 (50.0%)	29/30 (96.7%)
Method 1	20/30 (66.7%)	26/30 (86.7%)	16/30 (53.3%)	27/30 (90.0%)
Overall Accuracy	20/30 (66.7%)	26/30 (86.7%)	16/30 (53.3%)	27/30 (90.0%)
Sensitivity	20/21 (95.2%)	22/22 (100%)	15/15 (100%)	23/23 (100%)
Specificity	0/9 (0%)	4/27 (14.8%)	0/15 (0%)	6/6 (100%)
False positive	9/9 (100%)	3/27 (11.1%)	0/15 (0%)	0 (under-diagnosis)
False negative	1/21 (4.8%)	1/22 (4.5%)	0/15 (0%)	0 (under-diagnosis)

表2 新規胃癌30症例によるミニアレイの評価

肝転移、腹膜播種の有無、深達度については83%~96%と高い一致率であった。一方、リンパ節転移に関しては、66%と精度があまり高くなかった。リンパ節転移の評価についてはミニアレイに採用するクローンの変更が必要であり、症例を重ねてより精度の高い予測ができるようなクローンの選定を行っている。

以上より、胃癌については悪性度を評価するミニアレイを実際に作製し、その有用性を新規症例で確認することができた。大腸癌をはじめとする他の癌腫でもこのようなミニアレイ開発を目指して現在、研究を進めている。

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7件)

① Nakao M, Kawauchi S, Furuya T, Uchiyama T, Adachi J, Okada T, Ikemoto K, Oga A, Sasaki K. Identification of DNA copy number aberrations associated with metastases of colorectal cancer using array CGH profiles. *Cancer Genet Cytogenet.* 188:70-6, 2009 査読有

② Chochi Y, Kawauchi S, Nakao M, Furuya T, Hashimoto K, Oga A, Oka M, Sasaki K. A copy number gain of the 6p arm is linked with advanced hepatocellular carcinoma: an array-based comparative genomic hybridization study. *J Pathol.* 217:677-84, 2009 査読有

③ Liu XP, Li DY, Liu XL, Xu JD, Furuya T, Kawauchi S, Oga A, Sasaki K. Comparison of chromosomal aberrations between primary tumors and their synchronous lymph-node metastases in intestinal-type gastric carcinoma. *Pathol Res Pract.* 205:105-111, 2009 査読有

④ Furuya T, Uchiyama T, Adachi A, Okada T, Nakao M, Oga A, Yang SJ, Kawauchi S,

Sasaki K. The development of a mini-array for estimating the disease state of gastric adenocarcinoma by array CGH. BMC Cancer. 8:393, 2008 査読有

⑤Yamamoto Y, Chochi Y, Matsuyama H, Eguchi S, Kawauchi S, Furuya T., Oga A, Kang JJ, Naito K, Sasaki K. Gain of 5p15.33 is associated with progression of bladder cancer. Oncology. 72:132-138, 2007 査読有

⑥Kawauchi S, Sugimoto S, Liu XP, Ikemoto K, Furuya T., Takahashi M, Sasaki K. Influence of cytological stains on comparative genomic hybridization analysis for DNA extracted from cytological smears. Oncol Rep. 18:1219-1223. 2007 査読有

⑦Yamamoto Y, Matsuyama H, Chochi Y, Okuda M, Kawauchi S, Inoue R, Furuya T., Oga A, Naito K, Sasaki K. Overexpression of BUBR1 is associated with chromosomal instability in bladder cancer. Cancer Genet Cytogenet. 174:42-47, 2007 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①Kenichiro Uchida, Atsunori Oga, Mariko Mihara, Shigeto Kawauchi, Tomoko Furuya, Yasuyo Tyochi, Yoshiya Ueyama, Kohsuke Sasaki. Loss of 3p26.3 associate with disease-free survival after surgery in oral squamous cell carcinoma. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Assosiation, Nagoya. 2008 年 10 月 29 日

②古屋智子、中尾素直、小賀厚徳、河内茂人、佐々木功典. 胃癌に特化した

CGH(comparative genomic hybridization) ミニチップの作製に関する研究 第 97 回日本病理学会総会 金沢市 2008 年 5 月 16 日

③Tomoko Furuya, Motonao Nakao, Tetsuji Uchiyama, Atsushi Adachi, Atsunori Oga, Shigeto Kawauchi, Takashi Hirano, Kohsuke Sasaki. Array CGH analysis of gastric cancers: The development of a gastric cancer specific array. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Assosiation, Yokohama. 2007 年 10 月 4 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: A C C 亜分類の検出法

発明者: 佐々木功典ほか 1 名

権利者: 国立大学法人山口大学

種類: 特許出願

番号: 2007-230274

出願年月日: 2007 年 9 月 5 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~2byouri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 功典 (KOHISUKE SASAKI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80116722

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

近藤智子(古屋智子) (KONDO (FURUYA) TOMOKO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 30379979

中尾素直 (NAKAO MOTONAO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 60457306