

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590345
 研究課題名（和文）進行癌に進展しやすい分化型早期胃癌に特徴的なゲノム構成の
 解明
 研究課題名（英文）Genomic constitutions characteristic of the differentiated-type early
 gastric carcinomas that are prone to progress to advanced stages
 研究代表者
 杉原 洋行（SUGIHARA HIROYUKI）
 滋賀医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：30171169

研究成果の概要：早期および進行期の分化型胃癌 25 例での粘膜内病変の染色体 CGH により、大半の進行癌では、早期癌でよく見られる変化が受け継がれていないことが判明した。またうち 19 例に 3 例の早期癌を加えた 22 例でのアレイ CGH では、粘膜内癌および浸潤癌の粘膜部で MYC-かつ TP53+が、浸潤部では MYC+または TP53-が特徴的であった。これらのことは、分化型早期胃癌の多くでは進行癌と系譜が異なることを示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：消化器、胃癌、分化型早期胃癌、アレイ CGH、系譜解析、癌進展、p53

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国では胃癌は、腺管形成の程度によって、分化型と未分化型に二分されてきた。分化型と未分化型は、それぞれ化生粘膜、非化生粘膜という異なる発生母地から生じる、異なる種類の胃癌であると理解されてきた。ところが近年、分化型が進展とともに未分化型に脱分化するものがあることが注目されるようになり、これまで考えられてきた、腺管形成の程度と発生の場との単純な関係が必ずしも成り立たないことが明らかになった。こ

のことは、従来の胃癌の分類を、胃癌の早期と進行期の系譜上の連続性に基づいた、新たな概念で整理し直す必要が生じていることを示している。そのさいには、組織環境の違いによって可逆的に変化する細胞の形質発現ではなく、組織環境の違いに左右されず、時間とともに不可逆的に変化するゲノムに基づいた胃癌分類をめざすことが重要であると考えられる。この考え方は、研究の進んでいく造血系腫瘍や肉腫では、特徴的な染色体転座が分類の鍵になることが示されていることから支持されよう。

(2) 固定後のヒト腫瘍の手術材料から抽出したDNAを用いて染色体解析ができるようになったのは、comparative genomic hybridization (CGH) が考案されてからである。CGHは、均衡転座を検出することはできないが、癌腫でよくみられる染色体コピー数の増減を、全染色体を対象に網羅的に解析できる。筆者は早くから、CGHが胃癌の染色体解析にきわめて有効であることに注目し、laser microdissectionによる細胞の採取、DOP-PCRによる全ゲノム増幅を組み合わせたCGHの方法論のノウハウを蓄積してきた (Okada et al, *Cancer Genet Cytogenet*, 118: 99, 2000; Kamitani et al., *Cancer Genet Cytogenet*, 132: 30, 2002; Shiomi et al., *Cancer Genet Cytogenet*, 147: 50, 2003; Tsubosa et al., *Cancer Genet Cytogenet*, 158: 156, 2005)。同時に、CGHを用いるのに適した(1-2日間の短時間ホルマリン固定の)外科手術材料をこの10年間収集し、それらに適用できるCGHによる系譜解析の方法論を考案してきた(杉原, *Cytometry Res*, 15: 47, 2005)。

(3) この系譜解析を、筆者はこれまで主として未分化型胃癌に用いて、早期胃癌と進行胃癌との系譜上の関係を調べてきた。その結果、① 腺管成分を含まない未分化型胃癌では、印環細胞癌 (SIG) が染色体変化を付加しながら低分化腺癌 (POR) に移行するとともに進行癌に進展すること (Peng et al. *J Pathol*, 201: 439, 2003)、② 腺管成分を含む未分化型胃癌では、腺管腺癌に由来するものが2/3、印環細胞癌に由来するものが1/3であること (Peng et al. *J Pathol*, 203: 884, 2004; Yoshimura et al. *Pathobiology*, 73: 40, 2006)、③ 腺管成分の染色体構成と、粘膜内癌として見つかる分化型腺癌の染色体構成との間に共通部分もあるが、一部が決定的に異なり、両者が異なる系譜上にあること (杉原他, *日本癌学会総会記事*. 65: 373, 2006) が示された。これらのことは、胃癌の診断、治療にも影響する重大な問題を提起している。すなわち、これまで最も予後の悪い胃癌として知られるスキルス胃癌の多くは印環細胞癌に由来すると考えられてきたが、印環細胞癌そのものがスキルス胃癌になる可能性は一般に考えられているよりも低い可能性がある。また、内視鏡技術の進歩で多くの粘膜内癌が内視鏡治療されているが、その大半は脱分化して未分化型化することの無い、非常にゆっくりと進展する癌かもしれない。進行癌の真の前段階としての早期癌は、早期の期間が短いために見逃されている可能性があり、このタイプの早期分化型胃癌の特徴を明らかにすることは重要かつ緊急の課題である。本研究では、系譜解析の対象を、これまで蓄積してきた分化型胃癌にも拡大し、この課題に挑戦した。

2. 研究の目的

本研究ではこれまで蓄積した(短時間固定の)胃癌の手術材料に、主としてCGHとアレイCGHによる系譜解析を用いて、ゲノムからみた胃癌の分類を確立することを最終的な目標とする。2年間の研究期間内では、早期および進行期の分化型腺癌に重点を置き、分化型早期癌からみて、未分化型進行胃癌に進展するもの、分化型のまま進行癌に進展するもの、および進展のきわめて遅いものに特徴的なゲノム構成を具体的に明らかにすることをめざした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、早期および進行期の分化型胃癌(腺管成分のみからなるものや、50%未満の未分化型成分を含むものを含む)に対して、これまで方法論から開発してきたCGHによる系譜解析(杉原, *Cytometry Res*, 15: 47, 2005)を行った。用いた材料は、分化型早期胃癌19例(粘膜内癌13例、粘膜下浸潤(sm)癌6例)、進行癌9例である。パラフィン包埋組織切片の複数箇所からlaser microdissectionで採取した細胞からDNAを抽出、25例(粘膜内癌10例、sm癌6例、進行癌9例)でDOP-PCRによる全ゲノム増幅を行った後、染色体CGH (Peng et al., *J Pathol*, 201: 439, 2003; *J Pathol*, 203: 884, 2004)、22例(粘膜内癌13例、sm癌3例、進行癌6例)でGenomePlex Tissue Whole Genome Amplification Kit (WGA2 kit) (Sigma)による全ゲノム増幅を行った後、アレイCGHを行った。そして分化型の早期癌、進行癌の粘膜内腺管と浸潤部のそれぞれの複数箇所でのCGHの結果を腫瘍内、腫瘍間で比較する。そのさい、まず腫瘍間で比較し、系譜上の関係についての仮説を立てた。次に、各腫瘍内の複数サンプルのCGH解析データからdendrogramを作成し、各腫瘍内での染色体変化のプロセスを再構築することによって、仮説どおりに染色体の変化が起こっているかどうか検証した。

(2) 粘膜外浸潤癌の場合、粘膜内病変が粘膜下からの再浸潤である可能性を否定するために、粘膜内病変の中の最もよく分化した部分を選択することにした。ここで予想される問題点は、分化型胃癌の場合、多中心性発生が少なくないと考えられており、ひとつの進行癌の中でも、粘膜内腺管と深部浸潤部の系譜が異なる可能性があることである。この点を考慮し、本研究では、腫瘍間系譜解析を多数の分化型胃癌に用いて、それらの系譜上の関係についての仮説を導き出すプロセスの中でも、個々の腫瘍から採取した複数サンプルによる腫瘍内系譜解析を平行して行い、サンプル間の系譜上の関係(クロナリティ)を確認した。

そして、深部浸潤部と系譜上連続している粘膜内腺管と連続性のないものを特定し、それぞれの染色体構成の特徴を明らかにした。

(3) 染色体 CGH の結果をアレイ CGH で確認しようとするさいに予想される問題点は、領域内の遺伝子コピー数の平均を反映する染色体 CGH の結果と個々の遺伝子コピー数を反映するアレイ CGH とは必ずしも結果が一致するとは限らないということである。これまでのアレイ CGH の経験から、gain 領域内に pinpoint で loss が検出されることや、その逆もあり得ることがわかっているため、アレイで loss/gain の spot がクラスターとして見られる領域を染色体 CGH の結果と比較した。

(4) アレイ CGH は 22 例（粘膜内癌 13 例、sm 癌 3 例、進行癌 6 例）に対してアジレントの 60K、60-mer Oligo アレイを用いた。

4. 研究成果

(1) まず、染色体レベルでのアレイ CGH のプロファイルと染色体 CGH の結果の一致率が低かった。これは前者がランダムプライミングや直接標識、後者がニックトランスレーション標識と標識方法の違いに起因している可能性が高い。このため、アレイ CGH どうし、染色体 CGH どうしの比較にとどめた。

(2) 染色体 CGH では、3q+ と 6q+ が早期癌 (12/16, 11/16)、進行癌 (7/9, 5/9) ともに多く見られた。進行癌では早期癌より 2q+, 4q+ が有意に多く (ともに 0/16 vs 5/9, $P < 0.05$)、11q+ が有意に少なかった (11/16 vs 2/9, $P < 0.05$)。これらのことから、大半の進行癌では、早期癌でよく見られる変化が受け継がれていないことが判明した。

(3) アレイ CGH では、粘膜内癌および浸潤癌の粘膜部の 16/22 では MYC- かつ TP53+ (3/22 で MYC+ または TP53-) がみられたのに対し、浸潤部では 9 例中 MYC- かつ TP53+ が 1 例 (MYC+ または TP53- は 6 例) であった。これらは、分化型早期胃癌の多くは進行癌と系譜が異なることを示唆している。

(4) 以上の腫瘍間系譜解析の結果から以下の仮説を立てた。MYC- かつ TP53+ が進行癌に進展しにくい早期癌の signature、MYC+ または TP53- を進行癌の signature と考える。ただし、粘膜内癌の 3 例では進行癌の signature を示しており、これらが (本研究で明らかにしようとしてきた) 進行癌の真の前駆病変である可能性がある。発現レベルでも MYC、p53 にゲノムと同様の変化が既にあるのかどうか、またこれらの癌が形態的、形質的に識別しうるものであるか否かは今後の検討課題である。

(5) 次に、上記の仮説を腫瘍内系譜解析で確認した。アレイ CGH のプロファイルを染色体レベルで観察して切断点の共通性を見ると、sm 癌の 3 例は少なくとも一部の切断点が共通しており (図 1 参照)、系譜が連続していると考えられた。特に、浸潤部が進行癌の signature を示した 1 例では、粘膜病変が粘膜内癌と異なる MYC/TP53 パターンであったことは興味深く、この症例が早期から進行期への移行例であることを強く示唆している。残る sm 癌の 2 例では、浸潤部でも早期癌の signature を示しており、早期癌としてとどまっている理由の一つではないかと考えられた。一方、進行癌の 6 例では、粘膜部分と浸潤部の系譜上の連続性はなかった (図 1 参照)。進行癌の粘膜部分のほとんどで MYC/TP53 のコピー数は粘膜内癌と共通していたことから、進行癌の粘膜部にみられる高分化な腫瘍成分は、偶然同居した別の粘膜内癌である可能性が高い。

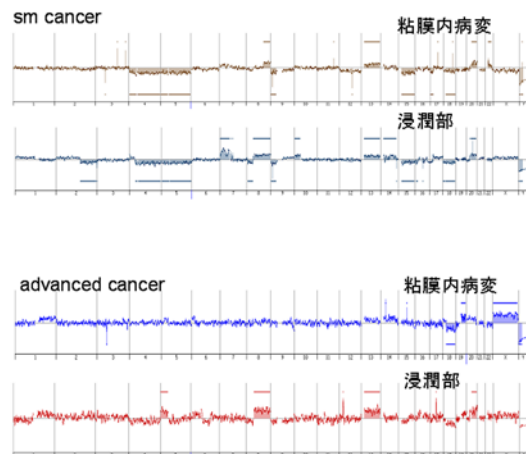


図 1. アレイ CGH プロファイルによる病変内系譜解析

(6) ただ、粘膜病変の染色体 CGH で、早期癌と進行癌との間に共通の染色体変化が乏しかったことは、同様の MYC/TP53 のコピー数変化を示す粘膜病変の中に、進行癌に伴いやすいものとしにくいものがあることを示唆している。今回は、進行癌の粘膜病変として、最もよく分化した部分をサンプリングしたが、今後はより分化度の低い部分にも検索を広げ、進行癌の浸潤部と系譜上連続した粘膜病変を捉えることも次の課題である。また、早期癌の 4/16 で、進行癌の signature が粘膜内に見られたにもかかわらず、これらが摘出時まで早期癌にとどまっていたのは、ゲノムの変化がエピジェネティックに補正され、発現レベルでは変化がなかったためである可能性も考えられる。

(7) 今回の結果は、分化型腺癌の場合は、未分化型と異なり、早期癌と進行癌の系譜が必ずしも連続しておらず、早期癌が長く早期癌

のまま存続する可能性を示しており、リンパ節転移のリスクも低いことが予想される。現時点では、このような癌に対しては、侵襲のより少ない内視鏡切除の適応とすることが適切であろうと考えられる。しかし、粘膜病変が *MYC*+または *TP53*-のパタンを示した早期癌の場合、内視鏡切除だけで良いかどうかを判断するためには、リンパ節転移のあった早期癌の切除材料で、*MYC* と *TP53* のゲノムコピー数を検討することが今後必要であろう。

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)

- ① 杉原洋行. 腺管腺癌に由来する未分化型胃癌の系譜解析. *Cytometry Research* (査読: 有) 42: 1589-1596, 2007
- ② Nakayama T, Ling Z, Mukaisho K, Hattori T, Sugihara H. Lineage analysis of early and advanced tubular adenocarcinomas of the stomach: continuous or discontinuous? *BMC Cancer* (査読: 有) (in press).

[学会発表] (計 7 件)

- ① Nakayama T, Sugihara H, Ling ZQ, Yoshimura A, Mukaisho K, Hattori T. Analysis of chromosome 17p in tubular early gastric carcinomas that precedes poorly differentiated advanced carcinomas. 第66回日本癌学会学術集会 2007.10.5., 横浜
- ② 仲山貴永, 杉原洋行, Ling Zhi-Qiang, 吉村彰伸, 向所賢一, 服部隆則. 胃における未分化型進行癌に進展しうる早期分化型腺癌の染色体解析 -特に17番染色体を中心として-第97回日本病理学会総会, 2008. 5.15., 金沢
- ③ 仲山貴永, 杉原洋行, 凌志強, 吉村彰伸, 向所賢一, 服部隆則. 未分化型胃癌に進展しうる分化型早期胃癌の染色体解析. 第18回日本サイトメトリー学会学術集会, 2008.6.28., 東京
- ④ 仲山 貴永, 杉原 洋行, 向所 賢一, 凌志強, 服部 隆則. 未分化型胃癌に進展する分化型胃癌の特徴. 第98回日本病理学会総会, 2009.5.1., 京都
- ⑤ 仲山 貴永, 杉原 洋行, 向所 賢一, 凌志強, 服部 隆則. 分化型および未分化型進行胃癌に進展する早期分化型胃癌の特徴. 第19回日本サイトメトリー学会学術集会. 2009.6.20., 松江
- ⑥ Nakayama T, Sugihara H, Mukaisho K, Ling ZQ, Hattori T. Immunohistochemical properties of tubular early gastric carcinomas that can precede poorly/well differentiated carcinoma. 第68回日本癌学会学術総会.

2009.10.3., 横浜

- ⑦ 仲山貴永, 杉原洋行, 凌志強, 向所賢一, 服部隆則. 粘膜内および進行期分化型胃癌の染色体解析. 第82回日本胃癌学会総会. 2010.3.4., 新潟.

[図書] (計 1 件)

- ① 杉原洋行. 腫瘍鑑別診断アトラス 胃癌 (深山正久, 大倉康男編) 文光堂, 2009, p.75-84.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉原 洋行 (SUGIHARA HIROYUKI)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30171169

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし