

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20790286  
 研究課題名(和文)アレイCGH法による早期胃癌におけるゲノムコピー数異常の網羅的解析  
 研究課題名(英文) Genomic profiling of gastric carcinoma in situ by array-based comparative genomic hybridization  
 研究代表者  
 塚本 善之 (Tsukamoto Yoshiyuki)  
 大分大学・医学部・助教  
 研究者番号：00433053

## 研究成果の概要(和文)：

進行胃癌におけるゲノム異常は多く報告されているが、早期胃癌のゲノム異常については、報告がほとんど無い。本課題ではアレイによる比較ゲノムハイブリダイゼーション法(アレイ CGH)により、早期胃癌のゲノム異常を解析した。早期胃癌 20 症例のゲノム異常を解析したところ、8 番染色体長腕の増幅が最も多く検出された(85%)。また、20 番染色体長腕の増幅、5 番染色体長腕の欠失、17 番染色体単腕の欠失が続いて高頻度に検出された。

## 研究成果の概要(英文)：

Although genomic copy number aberrations (CNAs) of gastric carcinoma at the advanced stage have already been extensively characterized by array comparative genomic hybridization (array CGH) analysis, those of gastric carcinoma in situ (CIS) are still poorly understood. In this study, we investigated CNAs of 20 gastric CISs (Vienna category 4.2) using oligonucleotide-based array CGH. The most frequent aberrations in CIS were gains at 8q (85%) and 20q (50%), and losses at 5q (50%) and 17p (50%), suggesting that these CNAs are involved in the development of CIS.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 基礎医学・人体病理

キーワード: 分子病理、アレイ CGH

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌はわが国の癌死亡率の第二位をしめる重要な疾患である。診断技術の進歩による早期発見によってその治療成績は向上したが、進行胃癌の治療成績は必ずしも良好ではない。それ

は進行胃癌に対して外科治療以外に効果的な補助療法が確立されていないことがその要因の一つといえる。近年、癌の発症メカニズムの解明が大きく進み、癌は遺伝子異常の蓄積によって引き起こされる遺伝子病であると考えられている。

そして、その異常遺伝子を標的とした治療薬を用いた分子標的治療が急速に進歩している。しかしながら、胃癌においてそのような治療法を開発するためには、胃癌における標的分子を同定しなければならない。つまり、胃癌において蓄積された遺伝子異常の実態を明らかにしなければならない。我々はこれまで既にアレイ CGH 法により進行胃癌のゲノムコピー数異常をゲノムワイドに網羅的に解析している(Tsukamoto et al., J Pathol, 2008)。30例の進行胃癌をアレイCGH法により網羅的に解析して、遺伝子コピー数の異常領域を同定した。図1は進行胃癌30例のアレイCGHの結果を示している。各症例において増幅(gain)のみられた染色体領域を染色体右側の線で示し、欠失(loss)のみられた領域を左側の線で示してある。ゲノム異常の頻度(%)を染色体ごとにとまとめたところ、ゲノム増幅は 1q21.3(67%), 1q42(67%), 3q26-qter(53%), 7p11(47%), 8q24(83%), 19q13(50%), 20p12(70%), 20q11(93%), 20q13(97%)に高頻度に認め、ゲノム欠失 3p14(63%), 4p15(67%), 4q34-qter(77%), 5q12(70%), 9p21(63%), 10q23(43%), 16q22(57%), 18q21(67%), 21q21(57%)に高頻度に認めた(図2)。胃癌のゲノム異常のパターンは我々がこれまで解析し報告した腎癌のゲノム異常(Yoshimoto et al., J Pathol. 2007)とは明らかに異なっており、各臓器癌にはそれぞれに特徴的なゲノム異常が存在することが示唆された(図2)。また、これらの異常領域において、発現異常を来す遺伝子を同定するため、同じ30症例について、Expression Array を行い、発現プロファイルを決定している。

図 1

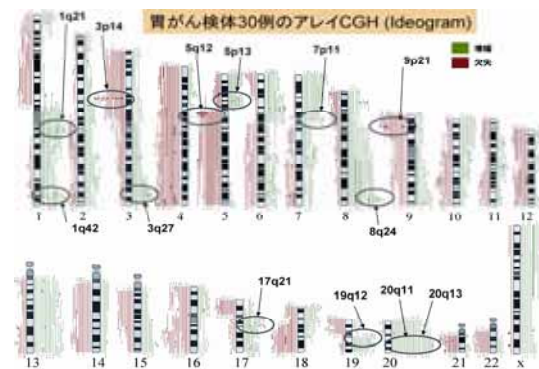
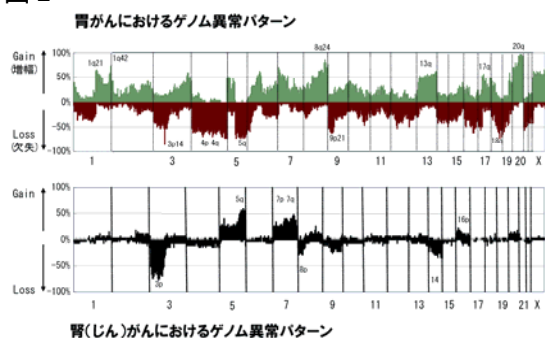


図 2



## 2. 研究の目的

一方、早期胃癌が進行胃癌へと進行するために重要なゲノム異常はよくわかっていない。これまですでに胃癌の通常の染色体 CGH 解析や、他研究者による preliminary な網羅的遺伝子解析によって、ゲノム異常の中から遺伝子の単離は試みられてきたが、そのゲノム異常の臨床的意義は明らかでない。複雑なゲノム異常の臨床的意義を明らかにするためには、単に完成した進行癌のゲノム異常を解析するだけでは不十分で、癌の進展の過程において経時的に蓄積されるゲノム異常を同定することが必要である。私は、このような視点に立って、早期胃癌のゲノムコピー数異常を進行胃癌のそれと比較して、早期癌から進行癌へ進行する過程で付加されるゲノム異常を同定したい。それによって、どのゲノム異常が初期の発癌に重要であるのか、早期癌から進行癌へと進行するために重要なゲノム異常は何であるのかを明らかにできると考えた。

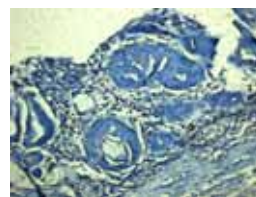
## 3. 研究の方法

第一に、早期胃癌に対して、内視鏡的粘膜切除術(ESD)あるいは外科的切除術を試行された手術標本のパラフィン包埋切片から癌細胞のみを切り取り、ゲノム DNA を抽出してアレイ CGH 法により早期胃癌のゲノム異常を網羅的に解析する。癌細胞のみを切り取るために laser-captured microdissection (LCM)を用いる。

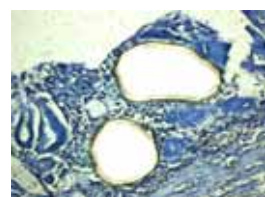
Laser-captured microdissection (LCM)



切り取り前



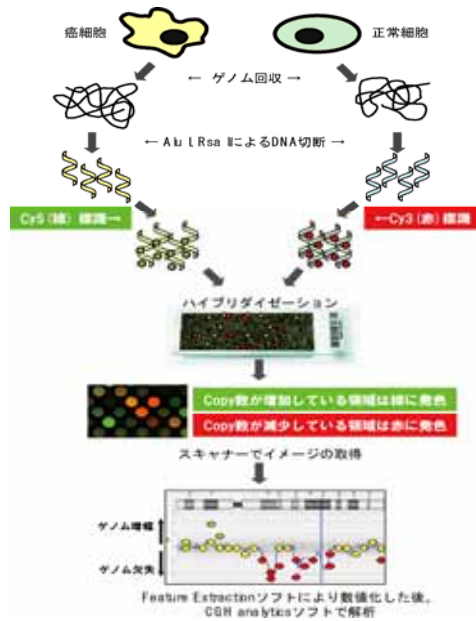
切り取り後



回収した癌細胞



アレイ Comparative Genomic Hybridization 法  
(アレイ CGH 法)



第二に、早期胃癌のゲノム異常と我々が既に解析した進行胃癌のゲノム異常と比較して、早期胃癌には存在しないが進行胃癌には存在するゲノム異常、すなわち胃癌の進行によって新たに加わったゲノム異常を同定する。

第三に、胃癌細胞株のゲノム異常をアレイ CGH 解析するとともにその mRNA の発現をマイクロアレイにより網羅的に解析する(トランスクリプトーム解析)。そして早期胃癌で検出されるゲノム異常ならびに進行胃癌でのみ検出されるゲノム異常を有する細胞株を同定する。そしてゲノムコピー数の増加領域ならびに欠失領域において発現異常を認める遺伝子を抽出する。

第四に、臨床サンプルで検出されたゲノム異常を有する細胞株あるいは有しない細胞株に候補遺伝子を遺伝子導入(過剰発現)あるいは siRNA 導入によりロックダウン(発現抑制)して、機能解析を行う。

4. 研究成果

早期胃癌 20 症例におけるゲノム異常をアレイ CGH 法により解析した。代表的な症例のゲノム異常を図 1 に示す。20 症例分のゲノム異常のまとめを図 2 に示す。8 番染色体長腕(8q)の増幅がもっとも高頻度に検出された(85%)。また、20 番染色体長腕(20q)の増幅、5 番染色体長腕の欠失(5q)、17 番染色体短腕(17p)の欠失がそれぞれ 50%の症例で検出された。

次に、早期胃癌のゲノム異常を過去に解析した進行胃癌 30 症例のゲノム異常と比較した(図 3、Table 1)。早期胃癌で高頻度に検出された 8q の増幅、5q の欠失、17p の欠失は進行胃癌においても同様に高頻度に検出された。この

結果は、これらの異常が胃癌の早期に関連していることを示唆する。一方で、20q、20p12、1q42、3q27、13q34 の増幅、4q、4p15、9p21、16q22、18q21、3p14 の欠失は進行胃癌で有意に高頻度に検出された。この結果は、これらの異常が胃癌の進行に関連していることを示唆している。特に、20q はもっとも有意に進行胃癌で増幅しており、この領域に胃癌の進行に関連する遺伝子が存在することが強く示唆された。

図 1 代表的な症例におけるゲノム異常。横軸は染色体番号を示す。log2ratio が 0 より大きい場合はゲノムが増幅していることを示し、0 より小さい場合は欠失していることを示す。

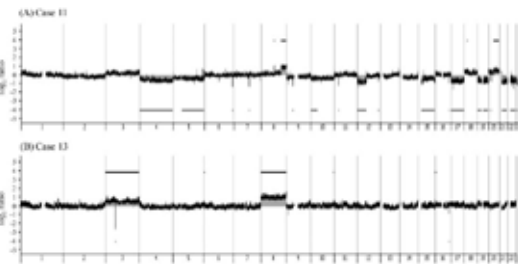


図 2 早期胃癌 20 症例分のゲノム異常のまとめ。1 本の線が 1 症例の異常を示す。緑がゲノム増幅、赤がゲノム欠失を示す。

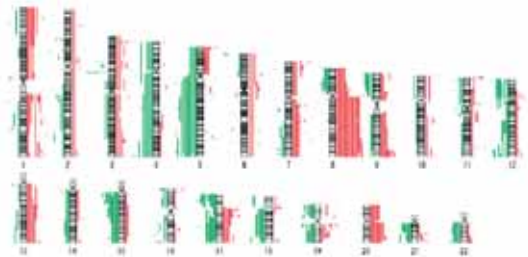
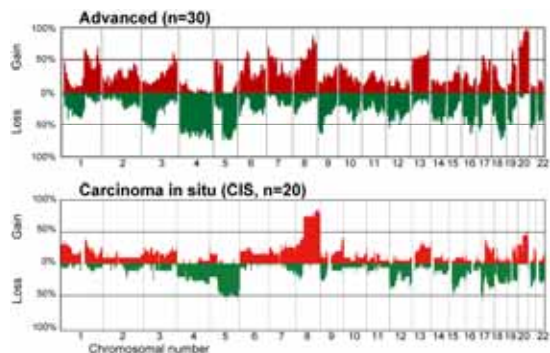


図 3 早期胃癌 20 症例分のゲノム異常と進行胃癌 30 症例分のゲノム異常の比較。



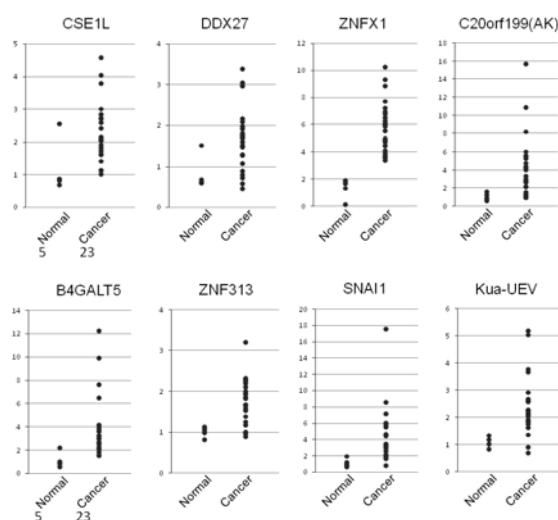
**Table 1** 早期胃癌 20 症例分のゲノム異常と進行胃癌 30 症例分のゲノム異常の比較。

Genomic CNAs Gain/loss <sup>a</sup>	AC <sup>b</sup> n = 30 (%)	CIS n = 20 (%)	Fisher's exact test p value
<b>Gains</b>			
20q	29 (97%)	10 (50%)	0.0002
1q42	20 (67%)	4 (20%)	0.0016
20p12	21 (70%)	6 (30%)	0.0089
3q27	16 (53%)	4 (20%)	0.0221
13q34	18 (60%)	6 (30%)	0.0476
6p21	16 (53%)	5 (25%)	0.0786
1q21	20 (67%)	8 (40%)	0.0845
19q13	15 (50%)	5 (25%)	0.1398
17q12-q21	18 (60%)	7 (35%)	0.1482
8q24	25 (83%)	17 (85%)	1.0000
<b>Losses</b>			
16q22	17 (57%)	2 (10%)	0.0010
4q34-qter	23 (77%)	6 (30%)	0.0015
4p15	20 (67%)	4 (20%)	0.0016
3p14	19 (63%)	5 (25%)	0.0104
9p21	19 (63%)	5 (25%)	0.0104
18q21	20 (67%)	6 (30%)	0.0200
21q21	17 (57%)	7 (35%)	0.1588
5q	21 (70%)	10 (50%)	0.2345
17p12	17 (57%)	10 (50%)	0.7739

引き続き、胃癌の進行に重要であると考えられる 20q13 領域に存在する遺伝子の胃癌における遺伝子発現を解析した。その結果、20q13 領域に存在する 43 個の遺伝子のうち、8 つの遺伝子が進行胃癌で 2 倍以上発現亢進していた (図 4)。

次に、胃癌細胞株のゲノム異常および発現解析を行い、20q13 領域のゲノム増幅を持っており、上述の 8 つの遺伝子が発現亢進している細胞株を探した。その結果、解析した 13 個の胃癌細胞株の中で、MKN74 がもっとも高レベルな 20q13 のゲノム増幅を示しており、その領域に存在する遺伝子の多くが過剰発現していた。現在、MKN74 を用いて、9 つの遺伝子の機能を解析している。

**図 4.** 20q13 領域に存在し、胃癌で発現亢進していた遺伝子のリスト。



## 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)

Uchida M, Tsukamoto Y, et al.

Genomic profiling of gastric carcinoma in situ and adenomas by array-based comparative genomic hybridization.

Journal of Pathology, 2010, 221, 96-105.

Tsukamoto Y, et al.

MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta.

Cancer Research, 2010, 70, 2339-49.

(学会発表) (計 2 件)

塚本善之

Genome-wide microRNA expression profiling in gastric carcinoma.

第 68 回日本癌学会学術総会

塚本善之

Genome-wide microRNA expression profiling in gastric carcinoma.

第 32 回日本分子生物学会年会

(その他)

ホームページ

<http://www.med.oita-u.ac.jp/byori2/index.htm>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 善之 (Tsukamoto Yoshiyuki)

大分大学・医学部・分子病理学・助教

研究者番号：00433053