

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501294

研究課題名(和文)ゲノムPCR法およびFISH法での肺腺癌の浸潤に関わる新規遺伝子の解析

研究課題名(英文) Analysis of the new gene in connection with permeation of the lung adenocarcinoma in the genome PCR method and the FISH method

研究代表者

南 優子(MINAMI, YUKO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：20466676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：早期に起こった遺伝子異常を検出することで、腫瘍の発生増悪のメカニズムの解明及び患者の予後を予測することを目的とした。小型肺腺癌の上皮内癌と浸潤癌に対してArray-CGH解析を行って、浸潤癌で明らかに増幅のみられる遺伝子を同定した。これら増幅のみられる遺伝子は3q領域に多く、特に3q26領域に多く含まれていた。3q26領域で同定できた遺伝子に対して、多数例で免疫染色やQuantitative Real-Time genomic PCRで検証を行い、Validationのため、他施設の早期肺腺癌での検証も行った。ECT2遺伝子の異常が肺腺癌の予後に関する増悪因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Genetic abnormality in early-stage lung adenocarcinoma was examined to search for new prognostic biomarkers. In situ lung adenocarcinomas and small but invasive adenocarcinomas were examined by array-comparative genomic hybridization (array-CGH), and candidate genes of interest were screened. To examine gene abnormalities, various types of lung carcinoma were examined by quantitative real-time genomic PCR (qPCR) and immunohistochemistry (IHC). Array-CGH demonstrated frequent amplification at chromosome 3q26, and we focused on the epithelial cell transforming sequence 2 (ECT2) oncogene. Overexpression of ECT2 in invasive adenocarcinoma was associated with disease-free survival and overall survival of patients with lung adenocarcinoma. These results were verified using another set of early-stage adenocarcinomas resected at another hospital. Abnormality of the ECT2 gene would be applicable as a new biomarker for prognosis of patients with lung adenocarcinoma.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：小型肺腺癌 3q26 ECT2 FISH qPCR 免疫染色 予後関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

がんは遺伝子異常の病気であり、がん細胞における網羅的かつ探索的なゲノム異常の解析を行うことで、遺伝子異常産物を標的とした分子標的治療の開発や治療効果の予測、予後予測に役立つことが考えられる。近年、肺癌は日本国内では元より、世界中で発症の増加がみられ、未だ5年生存率は20%台と低迷し続けている。日本国内では肺癌が癌死において、男性の1位、女性でも1位または2位と不名誉な死亡率の高さである。肺癌は、新薬の登場や外科技術の進歩、画像技術の進歩があっても、なお難治癌の一つのままである。そのため、腫瘍が治療困難な悪性化に陥るまでの発生増悪のメカニズムを解明するにはより早期の遺伝子異常から解明することが必須である。

野口らが1995年に提唱した小型肺腺癌の分類(Cancer 1995;75(12):2844-2852)は、肺腺癌の多段階発癌の指標となる分類であり、我々はこの分類を元に、既存肺癌手術検体を用いて、早期の肺腺癌が悪性化するのに伴って高発現するゲノム異常を解析し、予後臨床データと相関させ、悪性化のメカニズムを探索する。

2. 研究の目的

肺腺癌の初期病変である小型肺腺癌を対象にし、非浸潤癌(Type A、B)と初期浸潤癌(Type D、E)間での増幅や欠失などのゲノム異常を網羅的に検出し、肺腺癌の初期悪性化に関わるような遺伝子異常を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

小型肺腺癌のゲノム異常に関する研究遂行にあたっては、筑波大学医の倫理審査委員会で承認を受けた。

(1)筑波大学附属病院症例で上皮内肺腺癌(野口分類 Type A,B) 6例と早期の浸潤癌(野口分類 Type D,E) 9例について、メタノール固定検体の正常部と腫瘍部からそれぞれDNAを抽出し、Whole genome amplificationを行い、

正常部と腫瘍部の差次で得られた遺伝子を標的としArray-CGH解析を行った。array-CGHは東京医科歯科大学の稲澤譲治博士が開発したCancer Array 800(Inazawa J et al. Cancer Science, 2004)で800のBACクローンを搭載したDNA arrayで、786の既知の癌関連遺伝子が含まれている。

(2)有意に増幅が見られた3q26領域6遺伝子PIK3CA、ECT2、EIF5A2、TNFSF10、EVI-1、SKILと3q29に含まれ、粘液産生に関わるMUC4に対して、さらに症例を追加し増幅の検証のためにQuantitative Real-Time genomic PCRを行った。特異的プライマーセットはprimer 3で設計し、primer blastで特異性を検証した。PCRはインターカレーター法でSYBR Premix Ex Taq II(Takara)を使用し、ABI PRISM 7300を用いて比較検討した。用いた症例はType A, B 15例、Type D,E 17例、進行浸潤腺癌 51例、大細胞癌 6例、多形癌 12例である。それぞれ、腫瘍と正常部でQuantitative Real-Time genomic PCRを行い、GAPDHで補正し、腫瘍/正常比の増幅を算出した。

(3)(2)の結果を元に3q領域の遺伝子の中でtype A,Bで >1.5 (tumor/normal)の増幅が認められず、types D,E(tumor/normal)でのみ >1.5 の増幅が認められた遺伝子ECT2、EIF5A2、PIK3CA、TNFSF10を選び出し、さらに進行肺腺癌を15例追加し免疫染色を行い、発現を確認した。抗体はECT2(1946562, MILLIPORE)、EIF5A2(HPA029090, SIGMA)、PIK3CA(C73F8, Cell Signaling Technology)、TNFSF10(k-18, Santa Cruz)を用いた。Tris-EDTA buffer (pH9.0)で105 15分賦活を行い、その後、内因性ペルオキシダーゼの除去の為にREAL Peroxidase-Blocking Solution(Dako)を5分反応させ、それぞれの一次抗体を30分、二次抗体(PIK3CA、ECT2、EIF5A2、KI-67はEnVision+ Dual Link System-HRP, Dako、TNFSF10はHistofine simple stain MAX-P0(G), Nichirei)を30分反応させた後、

DAB(Dako)で5分発色させた。ヘマトキシリンで核染色を行った。

陰性コントロールは、PIK3CA、ECT2、TNFSF10は肺胞上皮、EIF5A2は成熟リンパ球をそれぞれコントロールとした。

評価方法は、PIK3CA、EIF5A2、TNFSF10は切片中の染色されている腫瘍細胞の割合(%)と染色強度(0:negative, 1:weak, 2:strong)を掛け合わせて算出した。ECT2は、x400の視野で1000個の細胞のうち染色されている細胞の数をカウントした。

(4) : qPCR と免疫染色の結果が最も相関するECT2についてさらに検討した。ECT2 (epithelial cell transforming sequence 2)は細胞分裂をに關与したがん原遺伝子と考えられているので、日常頻用されている細胞分裂像のマーカーであるKi-67の免疫染色も行い、比較検討した。

症例は(3)で用いた浸潤性肺腺癌66例、さらに小型肺腺癌を14例追加し計小型肺腺癌51例を用いた。抗体はKi-67(MIB1, DAKO)を用いた。Citirate buffer (pH6.0)で121 10分賦活を行った。その後、内因性ペルオキシダーゼの除去の為に REAL Peroxidase-Blocking Solution(Dako)を5分反応させ、それぞれの一次抗体を30分、二次抗体はEnVision+ Dual Link System-HRP, Dakoを30分反応させた後、DAB(Dako)で5分発色させた。ヘマトキシリンで核染色を行った。Mitotic index (MI)は高倍率視野(400倍)で10視野の細胞を数えて、値を算出した。

(5)ECT2およびKi-67の免疫染色結果と病理学的因子(術前転移巣、TNM因子、病理病期、静脈浸潤、リンパ管浸襲、胸膜浸潤、組織亜型、MI)や予後の関係を解析した。統計解析は無再発生存率はKaplan-Meyer Methodを用いた。

(6)筑波大学附属病院症例を用いた解析のValidationのために、国立がんセンター中央

病院の早期肺腺癌200例において、3q26上の遺伝子の増幅と発現と予後の関連をCopy number assay (GeneChip Human Mapping 250K-SNP array, Affymetrix)と同じく198例の早期肺腺癌に対してmRNA expression profile (Affymetrix U133Plus2.0 array)を行った。3q26領域のゲノムのECT2の増幅について、国立がんセンターにおいて切除された小型肺腺癌65例を用いてGeneChip Human Mapping 10K-SNP array (Affymetrix)と早期肺腺癌204例を用いてcDNA microarrayを行い、Prognoscan

(<http://www.prognoscan.org/>, Dataset: [GSE31210](http://www.prognoscan.org/GSE31210))で解析を行った。

4. 研究成果

(1)筑波大学附属病院病理検体を用いたArray-CGH解析でTypes A,Bとtypes D,Eを比較すると、types D,Eにおいて解析対象の786遺伝子中33遺伝子に有意に増幅が認められ、そのうちの22遺伝子が3q領域に認められ、7遺伝子で3q26領域に認められた。

(2)3q26領域で増幅がみられた7遺伝子中6遺伝子、ECT2, EIF5A2, EVI-1, PIK3CA, TNFSF10, SKILを対象にし、101例の肺癌症例に対してqPCRを行って検証した結果、ECT2, EIF5A2, PIK3CA, TNFSF10では、types A,Bで1.5未満の増幅かつtypes D,Eで1.5以上の増幅が認められた。

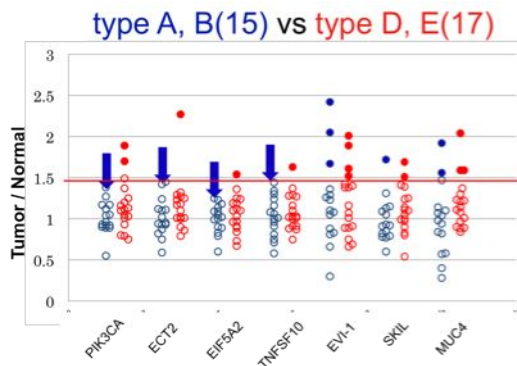
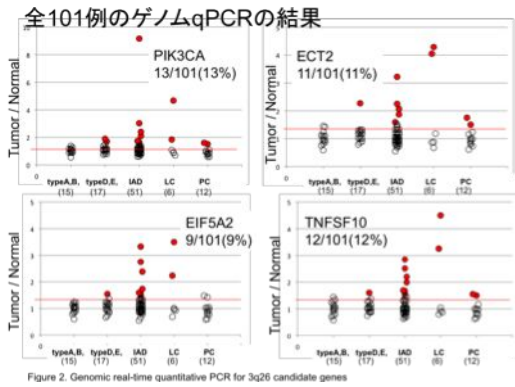
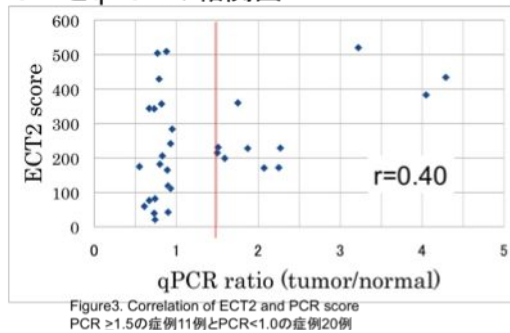


Figure 1. Genomic real-time quantitative PCR for 3q26 and 3q29 (type A, B15 cases, type D, E17cases)



(3) ECT2, EIF5A2, PIK3CA, TNFSF10 について免疫染色を行い、qPCR との相関を調べた結果、ECT2 が IHC と qPCR で相関係数 0.40 と相関が認められた。

ECT2とqPCRの相関図



(4) ECT2 と Ki-67 および MI はそれぞれ 0.760, 0.870 の相関係数を示し、高い相関が認められた。

ECT2とKi-67の免疫染色の相関

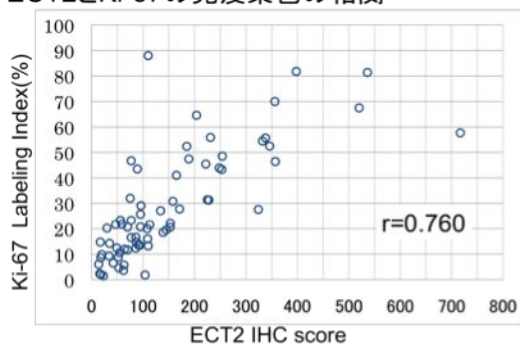


Figure 5. Relationship of IHC score of ECT2 and Ki-67

ECT2とMitotic index (/10HPF)との関連

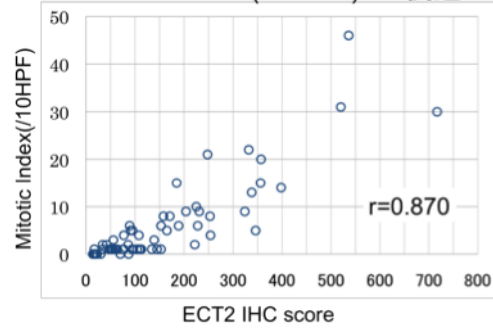


Figure 6. Relationship of IHC score of ECT2 and Mitotic index

(5) 免疫染色結果と病理学的因子や予後について関連を調べたところ、予後やN因子、静脈浸襲、病理病期、組織亜型について有意差が認められた。

ECT2 IHC scoreにおける無再発生存期間の検討

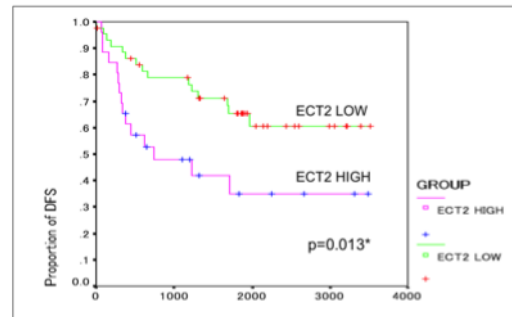


Figure 7. DFS in high score and low score ECT2

ECT2の免疫染色スコアと病理学的因子との関係

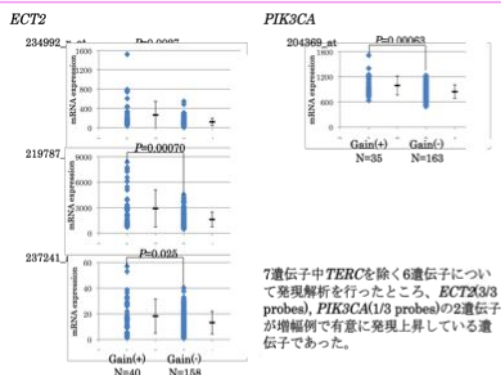
Table 4. Relationship of ECT2 IHC score and clinicopathological data

	ECT2 LOW	ECT2 HIGH	p
n=70	44	26	
metastasis	1(2.3%)	1(3.8%)	0.7
N (0/1/2)	36/3/5	11/7/8	0.003*
T (1a/1b/2a/2b/3/4)	1/15/19/1/7/1	1/3/12/1/9/0	0.25
pStage (IA/IB/IIA/IIIB/IIIA/IIIB/IV)	15/17/2/3/6/0/1	2/6/4/3/10/0/1	0.022*
V	16(36.4%)	19(73.1%)	0.003*
Ly	23(52.2%)	18(69.2%)	0.16
pl (0/1/2/3)	31/7/3/3	13/7/2/4	0.35
Subtype (lepidic/solid/acinar/papillary)	23/11/11/9	3/11/8/3	0.0001*

ECT2 IHC score cut off = 140

(6) これまでの結果の validation のために国立がんセンター中央病院症例を用いて ECT2 の SNP 解析を行ったところ、types C,D にのみ増幅(CN>3)が 18 例に認められた。また早期肺腺癌 200 例の copy number assay では 3q26 上に 47 例(24%)で増幅が検出された。さらに早期肺腺癌 198 例での遺伝子増幅と RNA の発現解析では、ECT2, PIK3CA に 2 遺伝子が有意に発現上昇していた。

早期肺腺がん198例における遺伝子増幅とRNA発現との関連



また、早期肺腺癌 204 例を用いて cDNA microarray を行い、Prognoscan で解析を行ったところ、ECT2 の高発現群は有意に予後不良であった。

早期肺腺がん204例における遺伝子発現と予後との関連

Gene Symbol	Probe ID	Endpoint	Corrected P-value	COX P-value	HR [95%CI](low-high)
ECT2	234992_x_at	Relapse Free Survival	< 0.00001	0.000020	2.30 [1.63 - 3.25]
ECT2	219787_s_at	Relapse Free Survival	0.000036	0.00026	2.14 [1.42 - 3.23]
ECT2	234992_x_at	Overall Survival	0.00023	0.0011	2.23 [1.38 - 3.60]
ECT2	219787_s_at	Overall Survival	0.00053	0.0028	2.35 [1.34 - 4.12]
EIF5A2	235298_at	Relapse Free Survival	0.0062	0.0055	2.42 [1.30 - 4.52]
EIF5A2	220198_s_at	Relapse Free Survival	0.012	0.0064	2.20 [1.25 - 3.88]
EIF5A2	235298_at	Overall Survival	0.023	0.014	2.84 [1.23 - 6.54]
SKIL	206875_s_at	Overall Survival	0.029	0.0034	3.93 [1.57 - 9.83]
EIF5A2	220198_s_at	Overall Survival	0.044	0.0080	2.84 [1.30 - 6.23]

Prognoscanで発現と予後に関連する遺伝子を解析したところ、ECT2, EIF5A2, SKILの3遺伝子が、高発現群症例で有意に予後不良となる遺伝子であることが明らかになった。

これらの中で、最も有意な値を示したのは、ECT2であった。

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 1件)

1: Murata Y, Minami Y, Iwakawa R, Yokota J, Usui S, Tsuta K, Shiraishi K, Sakashita S, Satomi K, Iijima T, Noguchi M. ECT2 overexpression as a new prognostic biomarker for early-stage lung adenocarcinoma Cancer Sci. 2014 Apr; 105(4): 490-7. DOI: 10.1111/cas.12363.

査読有

ECT2 serves as a new biomarker for early-stage lung adenocarcinoma. A FISH image for a tumor showing high ECT2 amplification. Red signal shows the ECT2 gene, and green signal shows chromosome 3 enumeration.

Cancer Sci. 2014 Apr;105(4): April cover. DOI: 10.1111/cas.12384 査読有

[学会発表](計 7件)

1: 村田佳彦、南優子、岩川麗香、横田淳、野口雅之。ECT2発現亢進は肺腺癌の新規予後予測マーカーである/2013.11.21-22:ホテルニューオータニ東京/第54回日本肺癌学会総会

2: Minami Y, Murata Y, Iwakawa R, Yokota J, Noguchi M. ECT2 overexpression and gene alteration are associated with the outcome

of early-stage lung adenocarcinoma/ 2013.10.27-30:Sydney, Australia/15th World Conference on Lung Cancer

3: 村田佳彦、南優子、野口雅之。肺癌における3q26領域の遺伝子増幅の意義/2013.6.6-8 ホテルロイトン札幌/第102回日本病理学会総会

4: 村田佳彦、南優子、薄井真悟、野口雅之。肺癌における3q26領域の遺伝子増幅/2012.11.8-9:岡山コンベンションセンター/第53回日本肺癌学会

5: 村田佳彦、南優子、野口雅之。肺癌における3q26領域の遺伝子増幅(Genomic amplification at 3q26 region in lung carcinoma)/2012.9.19-21: ホテルロイトン札幌/第71回日本癌学会総会

6: 南優子、村田佳彦、野口雅之。小型肺腺癌のArray CGH解析/2011.11.3-4: 大阪国際会議場/第52回日本肺癌学会総会

7: Minami Y, Murata Y, Noguchi M. Array CGH analysis of small-sized adenocarcinoma of the lung/2011.7.3-7:Amsterdam, The Netherlands/14th World conference on lung cancer

[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

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/diagpatho/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

南 優子 (MINAMI Yuko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号: 20466676

(2)研究分担者

野口 雅之 (NOGUCHI Masayuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号: 00198582

(3)連携研究者

()

研究者番号: