

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592037

研究課題名(和文) 包括的SNPアレイ解析と遺伝子発現プロファイルの統合から導いた新規膵癌治療戦略

研究課題名(英文) Treatment strategy of pancreatic cancer based on genome-wide profile

## 研究代表者

廣野 誠子 (Hirono, Seiko)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60468288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は予後不良な癌種の1つで、新規膵癌治療の開発を目的に、膵癌治療の標的分子となりうる遺伝子群の同定を行った。膵癌凍結切除標本からマイクロダイセクションした膵癌細胞のDNAとRNAを抽出し、DNAはGeneChip Mapping array 100Kを用いて包括的DNA1次構造異常解析を行い、RNAはGeneChip Human Genome U133 plus 2.0 arrayを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、膵癌特異的なhomozygous deletionならびにLOH領域、またamplification領域を同定し、そのRNA発現量を検討した。

研究成果の概要(英文)：We identified specific copy number variants and heterogenous deletion for pancreatic cancer by GeneChip Mapping array 100K and expression profile by GeneChip Human Genome U133 plus 2.0 array, using DNA and RNA extracted from harvest the pancreatic cancer cells by microdissection. We identified 6 regions, including Ch 9p21.3, Ch 18q21.1, of homozygous deletion, and many regions of heterogenous deletion. The RNA expression of CDKN2A gene, which is located in Ch 9p21.3, and SMAD4, which is located in Ch 18q21.1, were none in homozygous deletion samples. However the RNA expression of these genes were various in heterogenous deletion samples. We also identified some specific amplification regions and we found that the RNA expression of the genes which is located in these regions increased in amplification samples, compared to other samples.

研究分野：膵臓癌

キーワード：網羅的遺伝子解析 包括的DNA1次構造異常解析 膵癌

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は予後不良な癌種の1つで、根治可能な唯一の治療は、外科的切除術のみであるが、切除した膵癌患者も、早期に転移・再発をきたすことが多い。これまで、膵癌患者の予後改善を目的とした研究は多くなされてきたが、未だ膵癌患者の生存期間は短く、新規膵癌治療の開発が必須である。

本研究では、新規膵癌治療の標的となりうる遺伝子群の同定を目的とし、包括的なDNA1次構造異常解析と網羅的遺伝子発現解析を統合することで、膵癌により特異的な遺伝子群の同定を試みる。

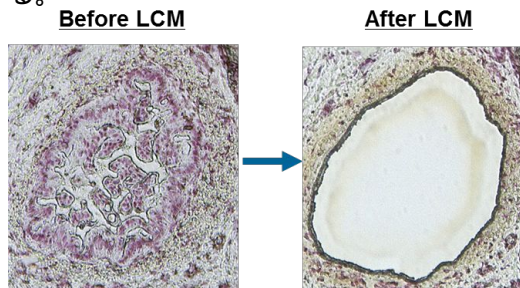
### 2. 研究の目的

膵癌の新規治療の標的遺伝子群を同定することを目的とする。本研究では、DNA1次構造異常解析から、膵癌特異的なDNAのcopy数や構造異常を認める領域を同定し、同時に網羅的遺伝子発現解析を行い、発現異常を認める遺伝子を同定し、より効果的な標的遺伝子群を同定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 膵癌細胞のみを特異的に回収

膵癌の凍結切除標本を薄切し、マイクロダイセクションを用いて、膵癌細胞のみを回収する。また、包括的DNA1次構造異常解析のコントロールとして、膵臓の正常部分の細胞も回収する。また網羅的遺伝子発現解析のコントロールとして、正常膵管の細胞を回収する。



#### (2) DNA と RNA の抽出

回収した膵癌細胞のDNAとRNAを抽出し、DNA解析のコントロールとして、同一個体の正常膵組織の細胞のDNAを抽出する。また、遺伝子発現プロファイルのコントロールとして、正常膵管のRNAを抽出する。

#### (3) 包括的DNA1次構造異常解析

抽出したDNA500ngを、GeneChip Mapping Array 100K (Affimetrix社)を用いて、hybridizationする。CNAG softwareを用いて、同一個体の膵癌細胞と正常細胞のarray dataを比較し、膵癌に特異的なcopy数異常とheterozygous deletion (LOH)を同定する。

#### (4) 遺伝子発現プロファイル

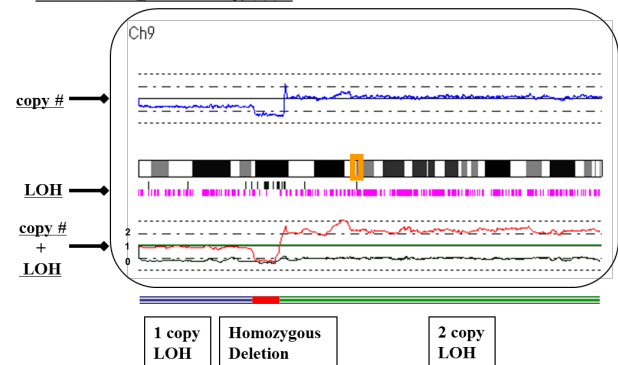
抽出したRNAを、GeneChip Human Genome U133 plus 2.0 arrayを用いて、hybridizationする。膵癌細胞のマイクロアレイデータと、正常膵管細胞のマイクロアレイデータを比較し、膵癌に特異的に発現を認める遺伝子群を同定する。

### 3. 研究成果

#### (1) 膵癌特異的DNA1次構造異常の同定

同一個体の膵癌細胞DNAと正常細胞DNAの比較により、膵癌細胞特異的なDNA1次構造異常を同定した。全20症例に対し、CNAG softwareによる各症例の膵癌特異的DNA異常を解析し、頻度の多いDN構造異常を認めた領域を同定した。

CNAG法を用いた1解析例



#### \* homozygous deletion 領域

Homozygous deletionを6領域に認め、最も高頻度に認めた領域は、CDKN2AやCDKN2Bを含むch9p21.3であった。ch9p21.3のhomozygous deletionは9例(45%)に認めた。続いて高頻度にhomozygous deletionを認めた領域は、SMAD4を含むch18q21.1で、5例(25%)に認めた。

#### \* heterozygous deletion 領域

LOHを認めた領域は、homozygous deletionに比べ、高頻度に認め、また多くの領域で認められた。なかでもch9p21.3は19例(95%)にheterozygous deletionを認め、続いてch17p13.3-p11.2領域に18例(90%)、ch9p23-p22.3領域に17例(85%)、ch18q22.1領域に17例(85%)、ch18q22.3領域に17例(85%)に認めた。

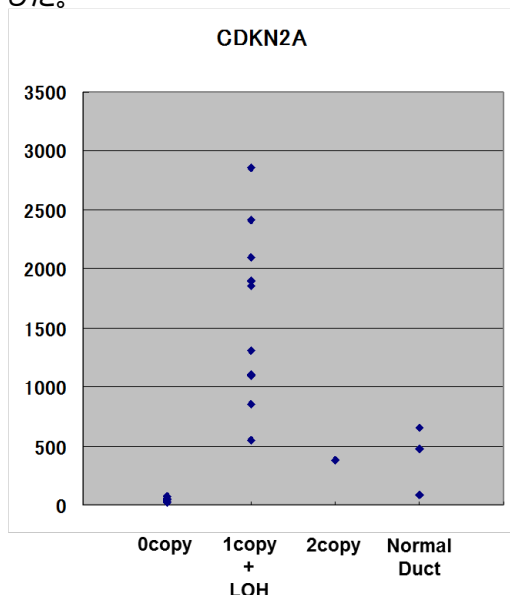
#### \* amplification 領域

Copy数の増幅を認めた領域は、ch18q11.1-q11.2領域で9例(45%)に認め、そのほかch1q42.2-q44領域、ch7p領域、ch8q24.21領域で5例(25%)に認めた。

#### (2) 遺伝子発現プロファイルと包括的DNA1次構造異常解析の統合による膵癌特異的に異常をきたす遺伝子群の同定

#### \* CDKN2A の DNA 構造異常と発現量

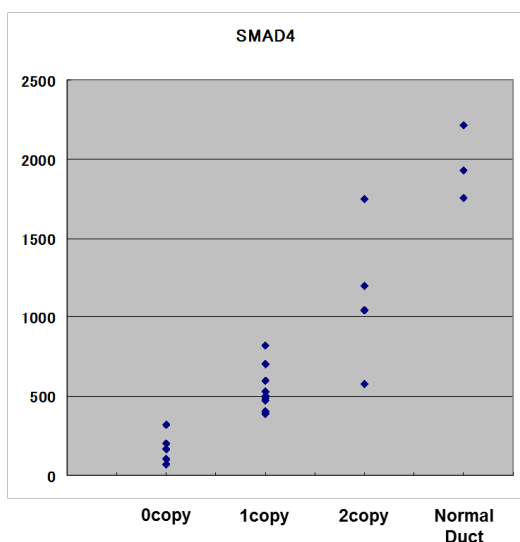
Homozygous deletion ならびに heterozygous deletion を最も高頻度に認められた ch9p21.3 領域に存在する CDKN2A の遺伝子発現を同定し、DNA 構造異常との関係を解析した。



CDKN2A の発現は、homozygous deletion 症例では、発現量がほぼゼロであったが、heterozygous deletion 症例に関しては、発現量にばらつきを認めた。

\* SMAD4 の発現量

Ch18q21.1 領域は、5 例 (25%) に homozygous deletion を認め、この領域に存在する SMAD4 の発現量と DNA 構造異常の関係を解析した。

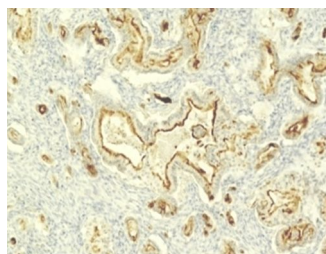


SMAD4 の発現量は、homozygous deletion 症例ではほとんど発現を認めず、heterozygous deletion 症例では、正常 copy 数症例の発現量と、homozygous deletion 症例の発現量の間位置する発現量を認めた。

このことから、CDKN2A と SMAD4 の heterozygous deletion の発現パターンが相違していることがわかった。

\* amplification 領域の遺伝子発現

網羅的遺伝子発現解析で膵癌特異的に高発現を認めた遺伝子群のうち、copy 数の増幅を高頻度に認めた領域に存在した遺伝子群を同定した。それら遺伝子群のうち IGF2BP3 は、食道癌や肺癌でも高発現をみとめることが報告されており、膵癌組織を用いて、免疫染色を行うと、癌細胞の膜に高発現を認めた。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

廣野誠子、谷 眞至、川井 学、岡田健一、宮澤基樹、清水敦史、北畑裕司、山上裕機  
第 44 回日本膵臓学会 2013 年 7 月、仙台

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
廣野 誠子 (Seiko Hirono)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60468288

(2)研究分担者

山上 裕機 (Hiroki Yamaue)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20191190

谷 真至 (Mesuji Tani)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60236677

川井 学 (Manabu Kawai)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40398459

岡田 健一 (Ken-ichi Okada)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50407988

宮澤 基樹 (Motoki Miyazawa)  
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教  
研究者番号：90549734

(3)連携研究者

( )

研究者番号：