

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659889

研究課題名(和文) 11q13.3増幅ナビゲーションマイクロダイセクト口腔癌ゲノム構造解析

研究課題名(英文) Genomic analysis of the 11q13.3 amplicon navigation microdissection in oral cancer

研究代表者

小村 健 (OMURA, KEN)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10334434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、臨床検体から高レベルゲノム異常のある微量の細胞だけを対象にゲノム構造異常を検出する「手法」を開発することにある。ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織からDNAを抽出し、初期DNA量を100ng程度まで減らしても良好なCGHアレイデータが得られることが判明した。また、免疫組織染色後の封入されたプレパラートから抽出したDNAがCGHマイクロアレイ解析可能であることが明らかになった。より微量なDNAでゲノム構造解析を行うために、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスを行ったところ、初期DNA量は15ng程度でゲノム変異が検出できた。

研究成果の概要(英文)：The aim is to develop the methods that detect the genomic structure abnormality in oral cancer cell with high-level genomic abnormality. We were confirming the satisfactory data of CGH microarray analysis using extracted 100ng input DNA from a formalin fixation paraffin embedded (FFPE) tissue. Moreover, we were confirming the satisfactory data of CGH microarray analysis using extracted DNA from a sample mounted in slide-glass which coverslip on the slide were removed by soaking the slide in xylene after immunohistostaining. To detect the genomic abnormality using smaller quantity of input DNA, we performed the targeted next-generation sequencing. We detected the genomic abnormality in oral cancer from 15ng input DNA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔がん ゲノム マイクロアレイ 11q13.3 マイクロダイセクション

## 1. 研究開始当初の背景

近年 cDNA マイクロアレイや CGH アレイ法、さらには次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列解読などの様々な先端技術により、各種癌における網羅的遺伝子解析がすすめられている。しかし、世界規模で研究が推進されているにもかかわらず、転移や生命予後、薬剤感受性を高精度に予測する遺伝子マーカーは開発されていない。その理由の一つに、臨床検体における癌細胞は、形態学的に均一に見えても実は様々なレベルの遺伝子異常をもつヘテロな細胞集団であるにもかかわらず、現在行われている遺伝子解析は、たとえばマイクロダイセクトしたとしてもそれは非癌組織と分離しただけで、様々なレベルの遺伝子異常をもつヘテロな「癌細胞集団」から抽出した遺伝子で行われていることがあると考えている。癌細胞集団すべてで生じている遺伝子異常がすなわち重要な遺伝子異常であるとの証拠はなく、むしろ癌幹細胞などの少数の細胞がもつ微細な遺伝子異常が患者の生命予後に結局影響を及ぼしているであろうことは、想像に難くない。いくら組織学的に同じような癌細胞に見えても、これらヘテロな細胞集団をまとめて処理したのであれば、数%の細胞がもつ重要な遺伝子異常は、他の多くの重要でないシグナルに「埋もれて」しまい、検出が難しい。組織を対象とした場合に、数%の細胞がもつ重要な遺伝子異常が他の多くの重要でないシグナルに埋もれてしまわないようにしたいと多くの研究者が考えることだが、実際には何をたよりに重要な細胞を「選択」していくかが問題となる。研究者らはすでに 11q13.3 領域に座位する遺伝子 *FADD*(Fas-associated death domain) が、多くの口腔癌においてゲノム増幅・タンパク高発現を示し、リンパ節転移や生存率に影響を与えることを報告している (DNA amplification and expression of *FADD* in oral squamous cell carcinoma.:

Prapinjumrune C, Morita K, Kuribayashi Y, Hanabata Y, Shi Q, Nakajima Y, Inazawa J, Omura K: J Oral Pathol Med. 39(8) 802-805 2010)。さらに免疫染色により *FADD* の高発現が同一症例の組織中でモザイク状に生じているという興味深い知見を得ている。一方この研究のなかで、口腔癌培養細胞というホモジニアスな細胞集団では *FADD* のゲノム増幅、mRNA 発現、タンパク高発現がパラレルであることも示していることから、組織中でモザイク状に生じている 11q13.3 領域のゲノム異常を、タンパクの免疫染色によって検出するという確証と手法を有している。この「*FADD* タンパク高発現」によるナビゲーションをたよりに、11q13.3 領域ゲノム異常をおこしている細胞を選択的に抽出し解析に使用することができる。11q13.3 領域ゲノム異常が真に意味のある異常かどうかは不明であるが、ナビゲーションに用いることにより、11q13.3 領域プラスアルファの詳細なゲノム構造異常を検出する意義は十分にあると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床検体癌組織から特に高レベルゲノム異常のある細胞だけをあらかじめ厳選たうえでゲノム DNA を抽出し、網羅的ゲノムコピー数異常を検出する「手法」を確立することにある。

## 3. 研究の方法

【テストサンプル DNA 抽出・CGH アレイ解析による最適条件の検討】

口腔癌症例の生検および切除標本で凍結保存されている組織および FFPE 組織の両方が保存されているテストサンプルを用いて、

DNA を抽出し、全ゲノム増幅の有無、および 2 種類の蛍光色素ラベル法の組み合わせ、スタートのサンプル量などの条件をちがえた複数のサンプルを用意し、アジレント社 SurePrint G3 Human CGH 8X60K を用いてゲノムコピー数異常の頻度、程度、S/N 比などを検討した。その上で、どの手法が微量 DNA の解析に適しているか、また精度の高い CGH アレイ解析に必要な DNA の質と量の限界を検討した。

#### 【免疫組織染色後のプレパラートからの DNA 抽出・CGH アレイ解析】

口腔癌サンプルの切片を抗 FADD 抗体にて染色し、封入観察後に、キシレン溶液中でプレパラートを振盪しカバーガラスをはがした上で、プレパラート上の標本から DNA を抽出し、上記で検討した最適条件下に処理した蛍光標識 DNA を用いて CGH アレイ解析を行った。

#### 【微量 DNA でゲノム構造解析を行うための次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンス解析】

より微量な DNA でゲノム構造解析を行う方法として、次世代シーケンサーを用いたゲノム変異解析の可能性について検討した。Life Technologies 社 Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 にてがん関連 50 遺伝子上の 2800 以上の COSMIC 変異を含む Hotspot 領域を増幅し Life Technologies 社 Ion PGM にてシーケンスを行った。

## 4 . 研究成果

#### 【テストサンプル DNA 抽出・CGH アレイ解析による最適条件の検討】

FFPE 組織から抽出した DNA では、酵素法による蛍光色素ラベルを用いると、S/N 比が低くなり良好なマイクロアレイデータが得られないことが判明した。一方、化学標識法では、

投入 DNA 量が 250ng と比較的多く必要であるが、FFPE 組織由来 DNA でも、S/N 比が高く比較的良好なマイクロアレイデータが得られることが明らかとなった。そこで、微量の DNA を全ゲノム増幅後に化学標識法を用いてラベルした DNA を用いたところ、酵素法ほどではないが、S/N 比が低くなり良好なマイクロアレイデータが得られないことが判明した。これらの結果は、酵素法のラベル化のステップで PCR 反応が必須となることが原因と考えられ、全ゲノム増幅においても同様であるが、FFPE 組織から抽出した DNA に PCR 反応を加えるとバイアスのかかった増幅がおこり、コピー数変化が維持されないと考えられた。さらに微量の DNA で検討したところ、投入 DNA 量を 100ng 程度まで減らしても同様なデータが得られることが判明した。

#### 【免疫組織染色後のプレパラートからの DNA 抽出・CGH アレイ解析】

免疫組織染色後の封入されたプレパラートから抽出した DNA が CGH マイクロアレイ解析に用いることができるかを検討した。十分な DNA 量を得るために、マイクロダイセクションを施行せずに 4um 厚の切片を免疫組織染色し、キシレンで脱水後に封入したプレパラートを再度、キシレン中で一晚振盪しカバーガラスを除去した上で、DNA を抽出し CGH アレイを実施したところ、良好な S/N 比のマイクロアレイデータが得られることが明らかになった。

#### 【微量 DNA でゲノム構造解析を行うための次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンス解析】

FFPE 組織から抽出した DNA を用いても、初期投入 DNA 量が 15ng 程度でも解析が可能であることが明らかとなった。口腔扁平上皮癌

32 症例の解析で、読み深度は約 640 であり、  
変異頻度が 5%以上のアミノ酸置換を伴う変異は、1 症例あたり 1 から 6 遺伝子で認められた。  
遺伝子別では *KDR* および *TP53* の変異が半数以上の症例で認められ、次いで *APC*、  
*CDKN2A* の変異が多く認められた

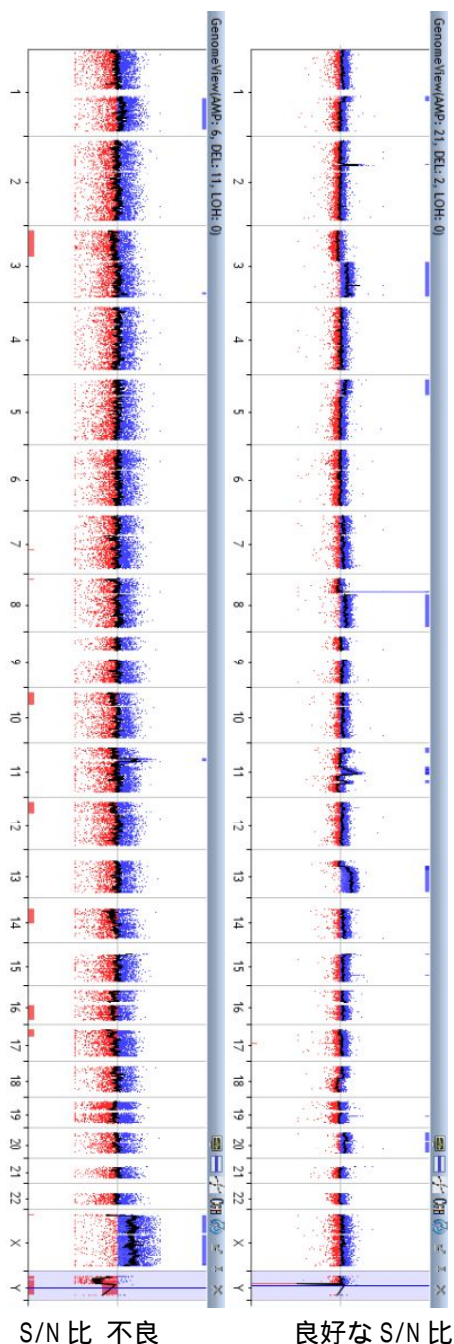


図 1 化学標識法による蛍光ラベル後の CGH アレイ

Chrom	Gene Sym	chr2	chr3	chr4	chr4	chr5	chr7	chr8	chr9	chr9	chr9	chr11	chr12	chr13	chr18	chr18	chr19	chr22			
		WHL	PRKCA	FGF3	KIT	KDR	APC	MET	SMO	FGFR1	NOTCH1	GNAS	CDKN2A	HRAS	KRAS	RBI	CDH1	TP53	STK11	unknown	
GHF2_031																					
GHF2_032																					
GHF2_033																					
GHF2_034																					
GHF2_035																					
GHF2_036																					
GHF2_037																					
GHF2_038																					
GHF2_039																					
GHF2_040																					
GHF2_041																					
GHF2_042																					
GHF2_043																					
GHF2_044																					
GHF2_045																					
GHF2_046																					
GHF2_047																					
GHF2_048																					
GHF2_049																					
GHF2_050																					
GHF2_051																					
GHF2_052																					
GHF2_053																					
GHF2_054																					
GHF2_055																					
GHF2_056																					
GHF2_057																					
GHF2_058																					
GHF2_059																					
GHF2_060																					
GHF2_061																					
GHF2_062																					
GHF2_063																					
GHF2_064																					
GHF2_065																					
GHF2_066																					
GHF2_067																					
GHF2_068																					
GHF2_069																					
GHF2_070																					
GHF2_071																					
GHF2_072																					
GHF2_073																					
GHF2_074																					
GHF2_075																					

図 2 32 症例のターゲットシーケンス解析

### 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 5 件)

1. 森田圭一, 谷本幸介, 原田浩之, 島本裕彰, 富岡寛文, 林 深, 小崎健一, 稲澤譲治, 小村 健: 次世代シーケンサーを用いた口腔扁平上皮癌におけるがん関連遺伝子のターゲットシーケンス. 第32回日本口腔腫瘍学会総会 2014年1月23-24日 札幌市
2. 森田圭一, 松川 祥, 原田浩之, 島本裕彰, 富岡寛文, 田中香衣, 林 深, 小崎健一, 稲澤譲治, 小村 健: 口腔扁平上皮癌患者のゲノム構造異常解析による治療抵抗性予測. 第51回日本癌治療学会学術集会 2013年10月24-26日 京都市
3. 森田圭一, 松川 祥, 原田浩之, 中島雄介, 島本裕彰, 富岡寛文, 田中香衣, 林 深, 小崎健一, 稲澤譲治, 小村 健: 口腔扁平上皮癌患者のゲノム構造異常解析による治療抵抗性予測. 第37回日本頭頸部癌学会 2013年6月13-14日 東京
4. 森田圭一, プラディット ルシャタムカヤヌント, 松川 祥, 林 深, 小崎健一, 稲澤譲治, 小村 健: 舌扁平上皮癌後発頸部リンパ節転移症例の FFPE 組織を用いたゲノムコピー数異常解析. 第50回日本癌治療学会学術集会 2012年10月25-27日 横浜市
5. 森田圭一, プラディット ルシャタムカヤヌント, 松川 祥, 林 深, 小崎健一, 稲澤譲治, 小村 健: 口腔扁平上皮癌の FFPE 組織を用いたゲノムコピー数異常解析. 第36回日本頭頸部癌学会 2012年6月7-8日 松江市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小村 健 (OMURA KEN)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：10334434

##### (2) 研究分担者

森田圭一 (MORITA KEIICHI)  
東京医科歯科大学・硬組織疾患ゲノムセンター・特任講師  
研究者番号：10396971

##### (3) 連携研究者