

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461986

研究課題名(和文)食道癌におけるポストゲノムシーケンスの変異遺伝子機能解析

研究課題名(英文)Gene mutation analysis of esophageal cancer in the era of post genome-sequense

研究代表者

木村 昌弘(KIMURA, Masahiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50336682

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)：食道癌手術症例48検体について、Truseq Custum Trial kit(Cancer Gene)の400遺伝子についてシーケンスをし、T1からT2、T2からT3へと進行するにしたがって増える遺伝子変異を統計解析し、現在までに7種類(AKAP9、ATM、CYTSB、DDX10、MYH7、MYST4、PRDM16)同定した。またN0とN1の比較において8種類の変異遺伝子(BCR、CARD11、FANCA、JAZF1、NIN、NSD1、RAMBP17、REQL4)を同定した。この400遺伝子での解析が、他施設の3万遺伝子の全ゲノム解析とほぼ同様の結果が得られることに気づいた。

研究成果の概要(英文)：Next generataion Sequence was done about 400 genes using Truseq Custum Trial kit (Cancer Gene) for 48 samples of esophageal cancer. We found the mutaion of 7 genes involved T factor (AKAP9, ATM, CYTSB, DDX10, MYH7, MYST4 and PRDM16). Moreover, we found 8 gene mutaion involved N factor (BCR, CARD11, FANCA, JAZF1, NIN, NSD1, RAMBP17 and REQL4). This result of analysis for these 400 genes were similar to 30,000 genes of whole genomic analysis in other facilities.

研究分野：医歯薬学

キーワード：次世代シーケンス 食道癌

1. 研究開始当初の背景

食道癌は、消化器癌のなかでも特に予後の悪い疾患であり、進行癌として発見された場合、外科的治療には限界がある。現在、放射線治療、化学療法などの組み合わせにより、予後改善のための努力がなされてはいるが、満足できるものではない。食道癌の治療成績向上、予後改善のためには、現状の診断、治療法ではなく、新しい診断法の開発、および治療法の見直しが必要である。癌は遺伝子変異の蓄積によって悪性を獲得するものという観点からも、食道癌発癌メカニズムの詳細を解明することにおいて遺伝子変異解析が重要な役割を果たすことに関して異論はない。特に、多段階発癌のメカニズムは大腸癌、肝癌などにおいて解明されているが、食道癌において多段階の発癌メカニズムは提唱すらされていない。

一方、実験ツールとしての次世代シーケンサーの精度向上には目覚ましいものがあり、高速 DNA シーケンスによる 1 ランあたり 200Gbp (ヒトゲノム 2 人分) のデータを産出する圧倒的なデータにより様々な解析が可能になった。それら次世代シーケンサーにて同定された遺伝子をターゲットとした診断、治療法の開発は食道癌においても、必須であると考えられる。この研究成果の臨床応用が食道癌撲滅に大きなブレークスルーとなることと思われた。

2. 研究の目的

特に食道癌においては、予後は未だ満足できるものではなく、メカニズムの解明が待たれる癌種のひとつである。最近の技術進歩により、次世代シーケンサーを用い、ゲノムワイドに遺伝子変異検索ができるようになった。我々もすでに蓄積している食道癌症例の検体を用いて、遺伝子数をしぼったシーケンスを行い、癌発生、さらに増殖転移の候補となる変異遺伝子を複数見出した。本研究では、その遺伝子変異が癌に及ぼす影響について機能解析を行い、治療の対象となりうるのかを明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンスデータから得られた候補遺伝子の再確認。化学療法、予後に関わる遺伝子変異の同定。

(2) 食道癌細胞株における遺伝子変

異解析

(3) T 因子に関与するとして同定された個々の遺伝子変異の機能解析

(4) N 因子に関与する遺伝子変異の機能解析。診断、治療への応用を計画した。

平成 1 年から平成 20 年度の間に食道癌手術症例で、切除標本の検体を患者の同意を得て遺伝子解析用に保存してあるものは、約 150 例ある。それぞれの TNM 因子、ly、v 因子、手術データ、抗癌剤、放射線治療の有無、および予後、生存期間につき詳細に記録が残されている。それぞれの genomicDNA を抽出し、精製する。

48 検体については、Truseq Custom Trial kit (Cancer Gene) の 400 遺伝子についてシーケンスを行う。48 症例の T 因子、N 因子の内訳は表のごとくである。

	T1	T2	T3
N0	12	5	6
N1	10	7	8

この遺伝子抽出方法は、(1) 得られたシーケンスを DNAnexus という専用ソフトにてデータ解析処理、(2) SNP データベースと比較し、SNP を除く、(3) カバレッジは 100 以上、(4) coding 領域の変異のみ、(5) Silent mutation (タンパクが変異しないもの) を除く、(6) 変異が 4 症例以下のものを除く、という Criteria にあてはまるもので処理をする。

もっとも注意が必要と思われる SNP の扱いで、SNP データベースにない日本人特有の SNP や 1% 以下の人にみられる rare SNP などは考慮されていないため、それらの処理を特に丁寧に行い、遺伝子抽出を行う。Normal との比較では、癌周囲の正常粘膜のみしか保存していないため、Driver gene を見落とす懸念もあり、あえて行わない (Whole Genome での解析は得られる情報が膨大すぎて解析が非常に難渋すると思われる、また SNP の問題が解決できないのが最大の問題点であると考えられる)。最終的に得られる候補遺伝子を先に上げた遺伝子を含めて 15 - 20 程度に再度チェックを行いたい。

これらについても個々の遺伝子につき、Wild type の発現ベクター (pcDNA3.1) および hot spot の mutant 発現ベクターを 2 種類程度作成する。変異症例の cDNA から、RT PCR

をかけて遺伝子領域を増幅したのち、発現ベクター (pcDNA3.1) にクローニングする。その上で、食道正常細胞株 HET1A に導入する。もしくは発現レベルの低い、Wild type の食道癌細胞株に導入し、細胞増殖をギムザ染色、MTT アッセイ、および cell invasion assay を行う。特に転移能を獲得するにいたった遊走能に着目したい。

4 . 研究成果

食道癌手術症例のうち 48 検体について、Truseq Custum Trial kit (Cancer Gene) の 400 遺伝子についてシーケンスを終了し、T1 から T2、T2 から T3 へと進行するにしたがって増える遺伝子変異を統計解析し、7 種類 (AKAP9、ATM、CYTSB、DDX10、MYH7、MYST4、PRDM16) 同定した。また N0 と N1 の比較において 8 種類の変異遺伝子 (BCR、CARD11、FANCA、JAZF1、NIN、NSD1、RAMBP17、REQL4) を同定した。

学会発表などで、この 400 遺伝子での解析が、3 万遺伝子の全ゲノム解析とほぼ同様の結果が得られることに気づいた。そのため、食道癌で半数に変異が見られた p 5 3 の status を再度確認し、これまでの報告どおり、約半数に変異がみられた。さらに 10% 程度の頻度の変異であるが、NOTCH1 の詳細な検討を行った。その結果、NOTCH1 については、免疫組織染色で核に発現している症例は予後不良であった。これらが変異とどう関与しているか、direct シークエンスを施行予定であるが、NOTCH1 の配列が非常に長いため、cDNA の PCR による増幅についてもうまくいかなかった。

またほかの T 因子、N 因子に関わるような遺伝子の発現ベクターに関しても、クローニングを開始したが、うまくいかず、今後の課題とした。NOTCH1 の Wildtype の発現ベクターは作成したため、これらを導入するために細胞株における status を確認する予定である。変異解析については、現在までのデータをまとめ、論文作成中である。

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 6 件)

1 . Ishiguro H, Wakasugi T, Terashita Y, Sakamoto N, Tanaka T, Sagawa H, Okubo T, Takeyama H.

Nuclear expression of TCF4/TCF7L2 is correlated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma.

Cell Mol Biol Lett. 2016 Jul 28;21:5.
DOI:10.1186/s11658-016-0006-0.
eCollection 2016. 査読有り

2 . Ishiguro H, Kimura M, Takahashi H, Tanaka T, Mizoguchi K, Takeyama H. GADD45A expression is correlated with patient prognosis in esophageal cancer. Oncol Lett, peer reviewed, 11, 2016, 277-282
DOI: 10.3892/ol.2015.3882 査読有り

3 . Sagawa H, Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yamashita Y, Suzuki S, Sato S, Shiomi K, Kato A, Kuno T, Matsuo Y, Kimura M, Takeyama H, Takahashi S. Connexin 32 and luteolin play protective roles in non-alcoholic steatohepatitis development and its related hepatocarcinogenesis in rats. Carcinogenesis, peer reviewed, 36, 2015, 1539-1549
DOI: 10.1093/carcin/bgv143 査読有り

4 . Kimura M, Ishiguro H, Tanaka T, Takeyama H. Advanced esophageal cancer with tracheobronchial fistula successfully treated by esophageal bypass surgery. Int J Surg Case Rep, , peer reviewed, 9, 2015, 115-118
DOI: 10.1016/j.ijscr.2015.02.053 査読有り

5 . Kimura M, Kuwabara Y, Ishiguro H, Ando T, Ogawa R, Shiozaki M, Tanaka T, Takeyama H. A new technique for shaping the gastric tube, using both radial and linear staplers. J Am Coll Surg, peer reviewed, 219, 2014, e15-18
DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2014.01.067 査読有り

6 . Kimura M, Kuwabara Y, Ishiguro H, Tanaka T, Takeyama H. Tracheoesophageal fistula due to a damaged tracheal stent. Case Rep Surg, peer reviewed, 2014, 2014, 1-5
DOI: 10.1155/2014/926387 査読有り

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 石黒秀行、木村昌弘、田中達也、溝口公士、竹山廣光、食道癌における NGS を用いた変異遺伝子解析と臨床病理学的因子との検討、第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 16-18 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
2. 木村昌弘、石黒秀行、小川 了、田中達也、齋藤慎一郎、溝口公士、竹山廣光、Radial 型の縫合器を併用した胃管作成法、第 69 回日本消化器外科学会総会、2014 年 7 月 16-18 日、郡山市民文化センター (福島県・郡山市)
3. 石黒秀行、木村昌弘、松尾洋一、小川 了、田中達也、齋藤慎一郎、溝口公士、竹山廣光、食道癌における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、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 3-5 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)
4. 小川 了、木村昌弘、舟橋 整、石黒秀行、宮井博隆、田中達也、竹山廣光、食道癌手術症例における PNI 及び TLC と予後との検討、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 3-5 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 昌弘 (KIMURA, Masahiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50336682

(2)研究分担者

石黒 秀行 (ISHIGURO, Hideyuki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10363920

田中 達也 (TANAKA, Tatsuya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20529169