

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

諸臓器のがんの臨床病理学的特性の基盤となる蛋白発現異常の
網羅的解析・研究の総括

分担研究者 広橋 説雄 国立がんセンター研究所所長

研究要旨：全染色体を4500個のBACクローンでカバーする高密度アレイを用いて比較ゲノムハイブリダイゼーション解析を行い、肝細胞がん・肺腺がんを高頻度にコピー数の減少・増加を示す微小染色体領域を多数同定した。肝細胞がんにおけるウイルス感染・予後と相関するゲノム構造異常や、肺腺がんにおける性差・喫煙歴・予後・EGF受容体遺伝子変異の関与する発がん経路と相関するゲノム構造異常を見出した。Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) が、TCF-4と結合して β -カテニン・TCF-4複合体の転写活性を増強し、大腸発がん早期に寄与する可能性を示した。大腸がん浸潤先進部で高発現し β -カテニンと結合するアクチン結合蛋白アクチニン-4が、細胞運動能を亢進させがんのリンパ節転移を亢進させることを示した。膜糖蛋白ディスアドヘリンがアクチン細胞骨格の構築制御を介して細胞運動能を亢進させる機序の理解をすすめる、同分子の高発現が諸臓器のがん症例において転移性とよく相関し予後不良因子となることを示した。

A. 研究目的

本研究では、がんの遺伝子型と表現型の相関 (genotype-phenotype correlation) を明らかにして、ヒトの諸臓器における多段階発がん過程のシナリオの理解をすすめることを目的とする。高精度ゲノムアレイを用いて、諸臓器のがん臨床検体多数を解析し、がんにおけるゲノム構造異常を網羅的に同定する。臨床病理学的因子とゲノム構造異常の全体像を比較検討することで、がん細胞の特性をゲノム構造異常の観点から理解できるようにする。がん特異的に高頻度に染色体欠失あるいは増幅を認める領域を詳細に同定し、網羅的な遺伝子あるいは蛋白の発現解析の

結果を有機的に活用しながら、候補標的遺伝子の異常を多数検体で検索することで、新規がん関連遺伝子の単離をも目指す。がん克服戦略研究事業において既に同定したがん関連遺伝子については、特にアクチン細胞骨格制御に寄与する分子に着目し、アクチニン-4やディスアドヘリンががんの浸潤・転移に寄与する分子機構の理解をすすめる、転移の抑制を目標とした新規治療法開発の基盤となる知見を得ることを目指す。

B. 研究方法

- 1) ゲノム構造異常の網羅的解析
がん克服戦略研究事業において開発してきたしてきた、がん関連遺伝

子を網羅的に含む「がん個性診断」アレイ (MCG Cancer Array-800 を用い、比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) 法を施行した。肝細胞がん・肺腺がん臨床検体において、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いて腫瘍組織からがん細胞のみを選別し、DNA を抽出後、アダプターライゲーション法により増幅し、解析した。得られたゲノム構造異常の全体像を俯瞰し、臨床病理学的な特徴と相関するゲノム構造異常の抽出を行った。

2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

β -カテニン-TCF-4 系の転写活性を制御する因子を同定するため、エピトープタグを結合した TCF-4 を一過性に培養細胞に発現させて免疫沈降を行い、質量分析によってその複合体に含まれる蛋白質を同定した。

がん克服戦略研究事業において単離した β -カテニンと結合する新規アクチン結合蛋白であるアクチニン-4 の発現を、大腸がん臨床検体において免疫組織化学的に検討し、発現量とがんの臨床病理学的特性との相関を検討した。テトラサイクリン誘導システムを用いてアクチニン-4 遺伝子発現を厳密に制御できる大腸がん細胞株 DLD-1 Tet OFF ACTN4 を樹立し、細胞運動能・細胞形態やアクチン細胞骨格の構築の変化を観察し、マウス移植モデルにおける転移能を定量的に評価した。

がん克服戦略研究事業において単離した新規がん関連遺伝子であるディスアドヘリンの発現量を多数の膵がん細胞株において検討し、アレイスキャンシステムで評価した細胞運動能との相関を検討した。ディスア

ドヘリンを発現する膵がん細胞株において RNA 干渉により発現を減弱させ、あるいはディスアドヘリン発現を欠く膵がん細胞株に cDNA 導入により強制発現させ、細胞運動能・細胞形態・アクチン細胞骨格の構築の観察・マウス移植モデルにおける転移能の評価を行った。舌・食道扁平上皮がん臨床検体において、免疫組織化学的に評価したディスアドヘリン発現量とがんの臨床病理学的特性との相関を検討した。

(倫理面への配慮)

厚生科学審議会により制定された「遺伝子解析研究に付随する倫理問題などに対応するための指針」および科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守した。手術材料の残余の組織の研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し文書で同意を得た。患者の治療方針決定のための病理組織標本を迅速に作製して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせないようにした。患者の臨床情報のうち本研究に必要なものは、別に診療録より調査しておき、解析の過程では無記名として検体番号のみで取り扱うなどの細心の注意を払い、患者のプライバシーを遵守した。所属施設の倫理委員会の承認を得た。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」を遵守した。

C. 研究結果

1) ゲノム構造異常の網羅的解析
肝細胞がん臨床検体について、MCG Cancer Array-800 を用いたゲノム構造異常の検索を行った。高頻度に染

染色体欠失を示す領域として、1p36, 4q21-25, 4q34-35, 8p23-11, 13q14, 16p13, 16q22-24, 17p13 を、染色体重複領域として、1q21-44, 2q21, 2q34, 3q11, 5p14, 5q13-14, 7p22, 7p14, 7q21, 7q22, 7q34, 8q12-24, 17q23 を同定した。さらに高頻度染色体増幅領域として、1q25, 8q11, 11q11 を、新規の染色体ホモ欠失領域として 14q32 領域を検出した。ゲノム構造異常の蓄積の程度は、腫瘍の分化度・B型肝炎ウイルス感染・悪性度（門脈浸襲・肝内転移）と有意に相関した。さらに、17p13.3 領域の欠失と 8q11 領域の重複が、他の臨床病理学的因子（臨床病期・門脈浸襲・肝内転移）と独立した予後予測因子になることを見いだした。

肺腺がん臨床検体について、MCG Cancer Array-800 を用いたゲノム構造異常の検索を行った。高頻度の染色体欠失領域と染色体重複領域を多数同定すると同時に、高頻度の染色体増幅領域として 7p12, 11q13, 12q14-15, 17q21 を、新規の染色体ホモ欠失領域として 8p23 領域を検出した。またゲノム構造異常の蓄積過程の違いから、肺腺がんを大きく3つの群に分類することができた。この分類は患者の性別、喫煙歴、上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) 遺伝子異常の有無と有意に相関した。さらに EGFR 遺伝子異常と相関する遺伝子構造異常を抽出したところ、MET 遺伝子の増幅が EGFR 遺伝子の異常と類似したゲノム異常の蓄積と共存することがわかった。

エピトープタグを結合した TCF-4 を一過性に培養細胞に発現させて免疫沈降を行い、質量分析によってその複合体に含まれる蛋白質を同定したところ、poly (ADP-ribose)

polymerase-1 (PARP-1) が TCF-4 と結合することがわかった。PARP-1 の発現亢進は、 β -カテニンによる TCF の転写活性を増強したが、その酵素活性は必要としなかった。RNA 干渉によって PARP-1 の発現を低下させたところ、転写活性および細胞増殖を抑制した。家族性大腸腺腫症症例およびその実験モデルである Min マウスの腺腫では、PARP-1 の発現が β -カテニンの発現と共に亢進していた。

定量的免疫染色法で検討したところ、大腸がんの73%において正常大腸粘膜上皮に比してアクチニン-4 の発現が亢進していた。特に大腸がんの浸潤先進部におけるアクチニン-4 の高発現は、リンパ節転移と有意に相関した。大腸がん細胞株 DLD-1 にアクチニン-4 の発現を誘導したところ、フィロポディア・ラメリポディア等の細胞突起が顕著に形成され、さらに運動能が亢進することが分かった。マウス同所性移植モデルでは、アクチニン-4 強制発現細胞移植群は、対照群に比し有意に高頻度に腸間膜所属リンパ節への転移を来した。

膵がん細胞株において、ディスアドヘリンの発現量は細胞運動能と有意に相関した。ディスアドヘリンを高発現する膵がん細胞株において、RNA 干渉により発現を減弱させたところ、細胞運動能が減弱した。ディスアドヘリン発現を欠く膵がん細胞株において、cDNA を導入して高発現させたところ、細胞運動能が亢進した。細胞形態とアクチン構築は、ディスアドヘリン発現量に依存して変化した。すなわち、RNA 干渉により発現を減弱させると、がん細胞は大型で扁平な形状を取り、細胞膜直下のアクチンレイヤーが減少して接着斑が発達しアクチンストレスファイバーが増加した。マウス

同所性移植モデルにおいて、ディスアドヘリン強制発現細胞の転移能が亢進していた。舌扁平上皮がんにおいてディスアドヘリン発現はE-カドヘリン発現と逆相関し、ディスアドヘリン発現レベルは腫瘍の浸潤性増殖形態・臨床病期と相関する有意な予後不良因子であった。ディスアドヘリン発現陽性・E-カドヘリン発現陰性の食道扁平上皮がんの予後は、その他の症例に比べて有意に不良であった。

D. 考察

1) ゲノム構造異常の網羅的解析

高精度・高密度のゲノムアレイの利用により従来法では検出困難であった、数100kbレベルの欠失や重複のゲノムコピー数異常を検出できるようになった。諸臓器のがんの臨床検体等におけるゲノム構造異常の全体像が俯瞰できた。新規がん関連遺伝子の単離に必要な、高頻度染色体異常領域の狭小化が達成された。今後、網羅的な遺伝子あるいは蛋白の発現解析の結果を参照しながら候補遺伝子の絞り込みを行い、さらに遺伝子異常を効率良く多数検体で検索することで、新規がん遺伝子・がん抑制遺伝子の単離を目指す。また臨床病理像との対応の結果、予後予測因子といった臨床的に重要な遺伝子異常の候補領域を抽出することができた。今後この結果をさらに多数検体で検証し、ゲノム構造異常に基づくがんの個性診断アレイの作成・実用化を目指したい。

2) がん関連遺伝子の機能ならびにがんにおける異常の解析

β -カテニン-TCF-4系の発がんにおける意義の理解が進んだ。すなわち、PARP-1がTCF-4と結合しTCF-4の転写

活性を増強することで、大腸発がん早期に寄与する可能性があると考えられた。アクチニン-4はがんの転移抑制の新規治療標的となる有力な候補分子と考えられたが、アクチニン-4は家族性腎疾患の原因遺伝子であり、これを直接分子標的とすると腎障害をきたすことが予測される。そこで、アクチニン-4遺伝子発現をがん細胞株において誘導し、トランスクリプトーム・プロテオーム手法によって、アクチニン-4結合蛋白等を体系的に明らかにし、治療標的候補の同定を目指したい。がん克服戦略研究事業において、ディスアドヘリンを強制発現したがん細胞株では、E-カドヘリン発現が、RNAレベルでは保たれているにもかかわらず蛋白レベルで低下して細胞間接着性が損なわれることを示してきた。ディスアドヘリンはカドヘリン細胞接着系のがんにおける新たな不活化機構を提供すると考えられる。これに加え本年度の成果により、ディスアドヘリンがアクチン細胞骨格を制御して細胞運動能を亢進させ、がん転移を直接促進する分子機構が示された。ディスアドヘリンの発現亢進を示す諸臓器のがんは概して悪性度が高く、患者の予後が不良であるとの知見がさらに集積してきた。ディスアドヘリンは、がん浸潤・転移制御の分子標的のひとつと考えられる。

E. 結論

諸臓器のがんにおける遺伝子異常を網羅的に解析し、臨床病理学的因子との相関を詳細に検討することで、がんの遺伝子型と表現型の相関 (genotype-phenotype correlation) を明らかにし、ヒトの諸臓器における多段階発がん過程のシナリオの全貌の解明

に近づくことを目的として研究をすすめた。高密度アレイを用いてアレイCGH解析を行い、がんで高頻度にコピー数の減少・増加を示す微小染色体領域を多数同定した。諸臓器のがんの臨床病理学的因子とよく相関するゲノム構造異常を見出した。がん克服戦略研究事業で同定したアクチニン-4やディスアドヘリンが、アクチン細胞骨格の構築制御を介して細胞運動能を亢進させ、がん転移に寄与する機序を示した。今後さらに、がんの病理像と遺伝子・分子・細胞レベルの変化との対応を明らかにし、新しいがん治療の標的になるような多段階発がんの分子機構の解明を重点的に推進する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Honda K, Yamada T, Seike M, Hayashida Y, Idogawa M, Kondo T, Ino Y, Hirohashi S. Alternative splice variant of actinin-4 in small cell lung cancer. *Oncogene*, 23: 5257-5262, 2004.
- 2) Shimamura T, Yasuda J, Ino Y, Gotoh M, Tsuchiya A, Nakajima A, Sakamoto M, Kanai Y, Hirohashi S. Dysadherin expression facilitates cell motility and metastatic potential of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, 64: 6989-6995, 2004.
- 3) Nakanishi Y, Akimoto S, Sato Y, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Prognostic significance of dysadherin expression in tongue cancer: immunohistochemical

analysis of 91 cases. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 12: 323-328, 2004.

- 4) Shibata T, Kokubu A, Sekine S, Kanai Y, Hirohashi S. Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin-deficient breast cancer. *Am. J. Pathol.*, 164: 2269-2278, 2004.
- 5) Takamura M, Ichida T, Matsuda Y, Kobayashi M, Yamagiwa S, Genda T, Shioji K, Hashimoto S, Nomoto M, Hatakeyama K, Ajioka Y, Sakamoto M, Hirohashi S, Aoyagi Y. Reduced expression of liver-intestine cadherin is associated with progression and lymph node metastasis of human colorectal carcinoma. *Cancer Lett.*, 212: 253-259, 2004.
- 6) Yokoo H, Kondo T, Fujii K, Yamada T, Todo S, Hirohashi S. Proteomic signature corresponding to alpha fetoprotein expression in liver cancer cells. *Hepatology*, 40: 609-617, 2004.
- 7) Seike M, Kondo T, Fujii K, Yamada T, Gemma A, Kudoh S, Hirohashi S. Proteomic signature of human cancer cells. *Proteomics*, 4: 2776-2788, 2004.
- 8) Sekine S, Shimoda T, Nimura S, Nakanishi Y, Akasu T, Katai H, Gotoda T, Shibata T, Sakamoto M, Hirohashi S. High-grade dysplasia associated with fundic gland polyposis in a familial adenomatous polyposis patient, with special reference to APC mutation profiles. *Mod. Pathol.*, 17: 1421-1426, 2004.
- 9) Sekine S, Takata T, Shibata T, Mori M, Morishita Y, Noguchi M,

Uchida T, Kanai Y, Hirohashi S.
Expression of enamel proteins and
LEF1 in adamantinomatous
craniopharyngioma: evidence for its
odontogenic epithelial
differentiation. *Histopathology*,
45: 573-579, 2004.

10) Yanagihara K, Tanaka H,
Takigahira M, Ino Y, Yamaguchi Y,
Toge T, Sugano K, Hirohashi S.
Establishment of two cell lines from
human gastric scirrhous carcinoma
that possess the potential to
metastasize spontaneously in nude
mice. *Cancer Sci.*, 95: 575-582,
2004.

11) Honda K, Yamada T, Hayashida Y,
Idogawa M, Sato S, Hasegawa F, Ino
Y, Ono M, Hirohashi S. Actinin-4
increases cell motility and
promotes lymph node metastasis of
colorectal cancer.

Gastroenterology, 128: 51-62, 2005.

12) Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y,
Yamada T, Honda K, Yanagihara K,
Kosuge T, Kanai Y, Kitajima M,
Hirohashi S. Prognostic
significance of tissue factor in
pancreatic ductal adenocarcinoma.
Clin. Cancer Res., in press.

13) Nishizawa A, Nakanishi Y,
Yoshimura K, Sasajima Y, Yamazaki N,
Yamamoto A, Kanai Y, Hirohashi S.
Clinicopathologic significance of
dysadherin expression in cutaneous
malignant melanoma:
Immunohistochemical analysis of 115
cases. *Cancer*, in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

諸臓器のがんの臨床病理学的特性の基盤となる遺伝子発現異常の網羅的解析

分担研究者 坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部病理学教室教授

研究要旨：ヒトの各臓器がんにおける網羅的遺伝子発現解析を行うことで、多彩な病理像の背景の分子基盤を明らかにするとともに、新しい診断・治療法への応用の可能性につき検討した。平成16年度の具体的な成果としては、初期肺腺がんが遺伝子発現レベルにおいてもII型肺胞上皮の性質を強く維持していることを示すと共に、初期肺腺がん特異的な発現を示す分子を同定・解析した。卵巣明細胞腺がんの分子マーカーHNF1 β が細胞診断にも有用であることを示した。浸潤性膵管がんでアクチン結合蛋白CAP1の発現亢進が高率に見られることをはじめで見出し、その細胞運動性への関与を示した。

A. 研究目的

ヒトのがん組織は、多段階発がん過程により、あるいはがん間質相互作用などの多様な細胞間相互作用により、多彩な病理像を示す。そして、各臓器がんの病理学的特性は、臨床的特性と対応することが示されてきている。本研究では、臓器がんにおける網羅的遺伝子発現解析を行うことで、多彩な病理像の背景の分子基盤を明らかにすることを目的とする。具体的には、厚生労働行政上も緊急の課題である難治がんの代表である膵がん、肺がん、肝がんそして卵巣がん、皮膚がんなどを対象として、個々の臨床病理学的特性と対応させた遺伝子発現異常の解析を行い、その本態の解明と、得られた成果の診断・治療への応用を目指す。DNAマイクロアレイに代表される網羅的遺伝子発現解析技術は、医学の診断や治療に大きな影響をもたらすことが期待されているが、病理診断との対応のみに留まる結果が多く、実際の臨床に応用されている成果は極めて少ない。本研究が目指す、個々の臓器がんの特有な病理像に着目した遺伝子発現解析研究は、新しい疾患概念の確立、病態の理解に留まらず、診断・治療の標準化、臨床応用可能な新しい診断・治療法の開発につながるものと期待され、今後国家レベルで推進が期待されるトランス

レーショナルリサーチの基盤となると考えられる。

B. 研究方法

多彩なヒトの病理材料を対象に、がんの病態解明を目指す本研究課題にあっては、以下の3つのアプローチを統合的に行う。(1)病理材料に発現する遺伝子の網羅的解析。(2)病理像を忠実に反映するヒトがんの増殖転移モデル開発と、それを用いた発現解析ならびに機能解析(3)臨床材料におけるレトロスペクティブ・プロスペクティブな大規模検討による有用性の検証。

(1)の遺伝子発現解析には、DNAマイクロアレイを用いるが、得られた遺伝子群は、in situ hybridization、免疫組織化学による組織での発現の局在、病理像との対応を詳細に検討し病態との関連を絞り込む。臨床材料では、検体量が十分得られず、機能解析が行えない等の欠点もあるため、それを補う手段として(2)モデル系の開発は不可欠であり、免疫不全マウスを用いたがん細胞ないしがん組織の同所移植による増殖転移モデルを開発する。モデルの腫瘍組織を用いて(1)と同様に網羅的遺伝子発現解析を行う。また(1)で同定された

遺伝子を導入あるいは knock-down し、in vitro と in vivo での機能解析を行うことで、分子の病態への直接的関与を明らかにする。このモデルを用いた転移の抑制などの治療実験は、前臨床試験として有用であるのみならず、分子の病態への関与をより明らかにすることが期待される。以上の解析で同定された分子群について病態の解明と診断・治療への応用の検討を行うために、(3) 実際の臨床材料を用いた大規模解析を行う。最終的にヒトがんの病態への関与が示された新規分子については、その分子生物学的解析を進め、その生物学的機能を一層解明する。また臨床的意義が確認されたものについては、実際の臨床応用を目指す。治療への応用としては、遺伝子操作以外に、特異的阻害剤、抗体などの利用につき検討する

(倫理面への配慮)

本研究計画では、がん組織で新たに生じた遺伝子の変化、発現の変化を解析することを目的としており、三省合同指針にあるヒトゲノム・遺伝子解析研究は含まれない。ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」及び科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当大学の倫理審査委員会の承認を得て実施する。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」ならびに「慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン」を遵守する。

C. 研究結果

1. 初期肺腺がんの遺伝子発現解析

非浸潤性肺腺がん 10 例を Affymetrix 社製 GeneChip を用いて約 12600 遺伝子の発現プロファイル解析を行った。その結果、がん部、非がん部を区別できる約 200 個の遺伝子群を同定した。がん部で発現上昇していた遺伝子 20 個を RT-PCR で確認し、さらに免疫組織染色を施行した。発現は肺胞

上皮置換性増殖をしているがん細胞に特異的であり間質の細胞では認められなかった。しかしそれらの多くは、非がん部の II 型肺胞上皮にも同様に発現が認められた。現在、正常肺胞 II 型上皮では発現が認められず、初期肺腺がんのみで発現が確認された遺伝子の解析を進めている。また選択された 200 の遺伝子を染色体の locus 毎にプロットしてみると、特定の locus にまとまって存在することが示された。現在染色体欠損、DNA のメチル化の有無などを検討している

2. 卵巣明細胞腺がんの遺伝子発現解析

当院の明細胞腺がん腹水細胞診標本に抗 HNF1 β 抗体 (ABC 法) と抗中皮モノクローナル抗体 HBME-1 (間接法) を用いて二重染色を施行し、明細胞腺がん細胞と中皮細胞の反応性を比較した。各種卵巣がん細胞診標本に抗 HNF1 β 抗体を用いて免疫染色を行った。一つでも明らかな陽性癌細胞があれば陽性とした。更に、明細胞腺がん症例については細胞診標本と同一症例の組織標本に抗 HNF1 β 抗体を用いて免疫染色を施行した。抗 HNF1 β 抗体は明細胞腺がん細胞の細胞核のみに陽性であり、HBME-1陽性の中皮細胞には反応しなかった。HNF1 β 陽性症例が占める割合は明細胞腺がん 95.5% (21/22)、漿液性腺がん 0% (0/24)、粘液性腺がん 0% (0/4)、類内膜腺がん 30% (3/10) であった。明細胞腺がんにおける HNF1 β 陽性細胞の割合が平均 50% である中で、少数のがん細胞も検出可能であった。明細胞腺がんの同一症例における細胞診標本と組織標本の HNF1 β の反応性は一致した。

3. 膵管がんの遺伝子発現解析

膵がんの腫瘍組織を直接膵臓に移植して得られた同所性移植腫瘍 12 例全例の移植片で高発現する遺伝子のリストを作成した。この中には、すでに膵管がんを含めたいくつかのがんの腫瘍マーカーとして用いられ

ているがん胎児性抗原(CEA)も入っており、また他のグループが発表した膵管がんの網羅的遺伝子発現解析の結果とも一致する遺伝子が多く含まれていた。Adenylate cyclase-associated protein 1 (CAP1)は、この解析により、全ての移植片で高発現している遺伝子として抽出された。ヒト CAP1 に対する抗体を東京都臨床医学総合研究所の森山先生より供与を受け、その抗体を用いて、23 症例の膵管がんに対し免疫組織染色を行ったところ、20 症例で CAP1 の高発現が認められた。残りの 3 症例に関しても、CAP1 を高発現するがん細胞の存在が限局的に確認された。CAP1 の発現量は、ひとつの症例内のがん細胞で多少不均一であったが、分化度の低いがん細胞でより高発現している傾向があった。CAP1 陽性を示すがん細胞に対し、非がん部の膵管、腺房細胞、ランゲルハンス島で、CAP1 は陰性または非常に弱い陽性を示した。膵管癌由来培養細胞を用いて上記の CAP1 抗体による細胞染色を行い細胞内分布を調べたところ、CAP1 は核周辺の細胞質に多く存在し、また Lamellipodium の先端部、特に Ruffling が見られるところにも局在していることが分かった。RNAi (RNA interference)により膵管がん細胞の CAP1 発現量を抑制したところ、ある細胞株では Lamellipodium 形成の阻害が見られ、さらに細胞の運動能が低下した。

D. 考察

1. 初期肺腺がんの遺伝子発現解析
遺伝子発現解析により、腺がん初期のがん細胞は肺胞 II 型上皮の性質を維持していることが確認され、腺がんの発生母地が肺胞 II 型上皮であるというこれまでの仮説を裏付ける結果となった。またこれらの遺伝子の多くは肺腺がんの特異的なため、転移性腺がんや胸膜中皮腫などとの鑑別のマーカーとして応用できると考えられた。さらに正常肺胞 II 型上皮では発現が認められず、初期肺腺がんのみで発現が確認された遺伝子が同定され、早期肺がんの腫瘍マーカーの候補として解析を進めている。

2. 卵巣明細胞腺がんの遺伝子発現解析
HNF1 β は主として肝臓において蛋白産生を制御する転写因子として発現する一方、卵巣明細胞腺がんの特異的に発現し、診断マーカーおよび治療標的分子となりうることが示唆されている。一方、腹水細胞診による組織型の正確な判定はしばしば困難である。そこで、明細胞腺がんの免疫組織化学的マーカーとして HNF1 β が腹水細胞診へ応用可能であるか検討した。その結果、HNF1 β は細胞診標本においても明細胞腺がんの特異的に発現することから、診断マーカーとして利用しうることを明らかにした。しばしば鑑別が困難な中皮細胞とがん細胞の診断にも有用であると考えられた。

3. 膵管がんの遺伝子発現解析

ヒト CAP1 遺伝子のホモログである酵母 CAP は、活性化 RAS の下流で Adenylate cyclase の活性化に寄与する因子として同定され、アクチン再構成による細胞の極性化に関与することが報告されている。今回の解析から、CAP1 は膵管がんにおける新規マーカー候補と考えられた。さらに CAP1 は膵管がん細胞内で、Lamelli-podium の形成およびそれに続く細胞運動に関与していることが示唆された。がんで CAP1 が高発現することを示した報告は過去に無く、その意義につきさらに解析を行っている。

E. 結論

本研究では膵がん、肺がん、肝がんそして卵巣がん、皮膚がんなどを対象として、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、各臓器がんの多彩な病理像の背景の分子基盤を明らかにすることを目的としている。16 年度までの研究で、初期肺腺がん特異的な発現を示す分子の同定、卵巣明細胞腺がん分子マーカーの細胞診断への応用、膵がんで過剰発現する新規分子の同定を行った。今後も、個々の臨床病理学的特性と対応させ

た遺伝子発現異常の解析を継続して行い、その本態の解明と、得られた成果の診断・治療への応用を目指す。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Oikawa T, Ojima H, Yamasaki S, Takayama T, Hirohashi S, Sakamoto M. Multistep and multicentric development of hepatocellular carcinoma: histological analysis of 980 resected nodules. *J. Hepatol.*, 2005, 42: 225-229.

2) Chuma M, Sakamoto M, Yasuda J, Fujii G, Nakanishi K, Tsuchiya A, Ohta T, Asaka M, Hirohashi S. Overexpression of cortactin is involved in motility and metastasis of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 2004, 41(4): 629-36.

3) Wenlin Du, Hattori Y, Hashiguchi A, Kondoh K, Hozumi N, Ikeda Y, Sakamoto M, Hata J, Yamada T. Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment.

Pathol. Int., 2004, 54: 285-294.

4) Chuma M, Saeki N, Yamamoto Y, Ohta T, Asaka M, Hirohashi S, Sakamoto M. Expression profiling in hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis: identification of high-mobility group I (Y) protein as a molecular marker of hepatocellular carcinoma metastasis. *Keio J. Med.*, 2004, 53: 90-97.

5) Panayiotis L, Kanetaka K, Takamura M, Shibata T, Sakamoto M, Hirohashi S. Orthotopic Transplantation Models of Pancreatic

Adenocarcinoma Derived From Cell Lines and Primary Tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas*, 2004, 29: 193-203.

6) Shimamura T, Yasuda J, Ino M, Tsuchiya A, Najima A, Sakamoto M, Kanai Y, Hirohashi S. Dysadherin expression facilitates cell motility and metastatic potential of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, 2004, 64: 6989-6995.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

諸臓器のがんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

分担研究者 稲澤 譲治 東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授

研究要旨：微細ゲノム構造異常を全染色体にわたり俯瞰的に検出するゲノム解析ツールとして高密度・高精度の Custom-made CGH アレイのシステムを確立した。さらに、DNA メチル化領域のゲノムワイドスクリーニング法である BAC array-based MCA (BAMCA) 法や、特定 DNA 配列に結合する蛋白の解析ツールとしてクロマチン免疫沈降法とゲノムアレイを組み合わせた ChIP-on-chip 法を開発した。これらの技術を駆使することにより、食道扁平上皮がんのがん抑制遺伝子 LRP1B をはじめとする幾つかのがん関連遺伝子を同定した。

A. 研究目的

ポストゲノム時代に入り、ゲノム情報に基づいてがんの分子病態を包括的に理解し、がん医療に資する成果を上げることが強く望まれている。このことから、高精度ゲノムアレイシステムによる潜在的がん特異的ゲノム異常の探索研究を実施して、新規のがん関連遺伝子を同定するとともに難治性がんの画期的診断、治療、予防法を開発することを目的に研究を実施する。

B. 研究方法

各種のがんにおいて微細ゲノム構造異常や機能的 DNA エlement をゲノムワイドに検出するシステムを開発し、これを用いて潜在的ゲノム構造異常や機能的 DNA エlement の探索を行う。

併せて遺伝子の網羅的発現解析を行い、これら統合的解析結果に基づき、各種がんにおいて

「phenotype/genotype correlation」を包括的に理解する。特に治療法開発に直結する難治性がんの病態解明を目的とする。今年度は、ゲノムアレイの応用により、DNA メチル化領域の探索法や特定タンパクの結合 DNA エlement の検出などの方法を確立する。

(倫理面への配慮)

今回の研究の遂行にあたっては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(2004年12月28日 文部科学省、厚生労働省、経済産業省、倫理指針ならびに個人情報保護ガイドライン) を遵守すると共に、東京医科歯科

大学をはじめ各研究機関に設置された倫理委員会の承認を得て実施する体制を整えている。

C. 研究結果

1. 高精度ゲノムアレイの開発

従来、100kb レベル～数 Mb オーダーのゲノム構造異常を全染色体にわたり俯瞰的に検出する技術は存在しなかった。これを克服するものとして Custom-made CGH アレイの実用化を目指してきた。その結果、以下のゲノムアレイを作製し、標準化した。

① MCG Whole Genome Array-4500: 4523 個の BAC クローンを配置した全ゲノムをカバーする高密度ゲノムアレイ (国立がんセンター、細田・大木両先生と共同研究)

② MCG 1p36 Contig Array: 染色体 1p36 の 20Mb を間断なくカバーしたアレイ

③ MCG Cancer Array-800: がん関連遺伝子 800 種類の解析を可能とする「がん個性診断」用アレイ

④ MCG chromosome X-tiling array: X 染色体を 1003 個の BAC で埋め尽くした高密度アレイ

これらのゲノムアレイは、わずか数 10kb のヘミ欠失を検出する精度であり、がんの特異的な染色体コピー数異常の解析の強力なツールとなっている。(Inazawa et al., Cancer Sci, review)

さらに、ポストシーケンス以降のゲノム研究である ENCODE (Encyclopedia of DNA functional element) プロジェ

クトを視野に、現在、ゲノムアレイを解析のプラットフォームにした応用技術開発を進め、DNA メチル化領域のゲノムワイドスクリーニング法である BAC array-based MCA (BAMCA) 法を開発した。(Inazawa J et al., Cancer Sci, 2004, review)

2. 食道扁平上皮がんの新規がん関連遺伝子の同定

食道扁平上皮がん (ESC) 細胞株 43 株を対象に MCG Cancer Array-800 を用いたアレイ CGH 解析で、LRP1B 遺伝子 (2q22.1) のホモ欠失を検出した。

Genomic PCR により ESC 細胞株 (6/43, 14.0%) と臨床検体 (30/70, 42.9%) の両者で高頻度な LRP1B の intragenic なホモ欠失を確認した。LRP1B の発現はホモ欠失のない細胞株でも高率 (14/37, 37.8%) に消失し、これらはプロモーター活性を持つ CpG island 内のメチル化による LRP1B 発現消失と考えられた。LRP1B 発現の消失した ESC 細胞株に強制発現させると colony formation assay で明らかな colony 数の減少を観察し、ESC のがん抑制遺伝子候補であることを確認した。(Sonoda et al., Cancer Res, 2004)

3. 肺がんの新規がん関連遺伝子の同定

肺小細胞がん (SCLC) の高頻度 5p13 増幅の標的が SKP2 であることを明らかにし (Yokoi et al., Am J Pathol, 2002)、続き SKP2 発現抑制は DNA 合成のみならずアポトーシスを進行させ

ることから、がんの分子標的治療の格好のターゲットであることを明らかにした(Yokoi S et al., *Cancer Sci*, 2003)。これらの成果に続き、SKP2が肺非小細胞がん(NSCLC)の5p13増幅の標的であり、その発現抑制は、NSCLC細胞の遊走能、浸潤能を抑制することを明らかにした(Yokoi S et al., *Am J Pathol*, 2004)。

また、肺非小細胞がん細胞株のCGHアレイ解析で検出した9q33の新規ホモ欠失領域から、肺がん抑制遺伝子候補DBC1を同定した。(Izumi et al., *Hum Molec Genet*, 2005)

4. 胃がんの新規がん関連遺伝子の同定

MCG Whole Genome

Array-4500/Cancer Array-800を用いて胃がん細胞株32例のCGHアレイ解析を行った。CDK6(7q21.2)の新規増幅を検出した。胃がんの組織マイクロアレイを用いて293例でCDK6の免疫染色による発現解析を実施した。細胞質強陽性を28例(9.6%)に、核強陽性を44例(15%)に検出した。(Takada et al., *Cancer Sci*, 2005)さらに、新規ホモ欠失領域を検出し、がん抑制遺伝子候補として細胞間シグナルの授受に関わる因子(MCG22, lab. name)を同定した。本遺伝子はプロモーター領域において高度のメチル化を認め、ジェネティック・エピジェネティックな機構により機能消失する胃がん抑制遺伝子の候補であることを明らかにした。(Takada et al., submitted)

5. その他の新規がん関連遺伝子の同定

神経芽細胞腫(NB)に続き

(Saito-Ohara F, Imoto I et al., *Cancer Res*, 2003) 卵巣明細胞腺がんの17q増幅の標的遺伝子がPPM1Dであることを明らかにした。(Hirasawa et al., *Clin Cancer Res*, 2004) 悪性黒色腫において高頻度に変異をきたすBRAFが、変異がない場合においても遺伝子増幅により活性化を受けることを明らかにした。(Tanami et al., *Oncogene*, 2004) 多発性骨髄腫の1q21増幅の標的PDZK1と薬剤耐性獲得を明らかにした。(Inoue J et al., *Am J Pathol*, 2004)、各種抗がん剤の薬剤耐性獲得メカニズムと特定ゲノム構造異常の関連を明らかにした。

(Yasui K et al., *Cancer Res*, 2004) 肺がんのみでなくSKPの高発現は胆管がんにおいても予後不良因子となることを明らかにした。(Sanada et al., *Cancer Sci*, 2004) 小児急性リンパ性白血病のt(1;19)転座より新規の切断点融合遺伝子MEF2D/DAZAP1を明らかにした。(Yuki et al., *Cancer Sci*, 2004)

D. 考察

がんの特異的なゲノム構造異常の網羅的スクリーニングを可能にする高精度・高密度のゲノムアレイを開発した。本技術により従来法では検出困難であった数100kbレベルの欠失や重複のゲノムコピー数異常を検出できるようになった。この結果、新規の遺

伝子増幅領域、あるいはホモ欠失領域を各種病型のがん細胞株に検出することができた。一方、ゲノムアレイによる潜在的ゲノム異常のスクリーニングにより、数10kb~Mbレベルの比較的大きなサイズのゲノムDNAの挿入・重複 (insertion/deletion) 多型が少なからぬ頻度で存在することが判明した。これら大きなサイズのゲノムDNAの挿入・重複多型の正確な日本人頻度、存在領域、ゲノム機能性を明らかにすることは、がんを含む疾患の罹病生を理解する上で極めて重要な研究課題と考える。

E. 結論

ゲノムアレイをプラットフォームにした諸臓器のがんのゲノム構造異常の網羅的研究により、種々の新規のがん関連遺伝子を明らかにすることができた。さらに、これら探索研究は国立がんセンター研究所病理部との連携研究により、大規模ながん患者バイオリソースを利用した臨床病理学的データとの相関解析も可能になり、実地のがん医療において、悪性度診断、治療分子標的、予防方策を見出すためのバイオマーカーとしての意義の検証も円滑に進んでおり、がんの患者を視野に入れた成果の進展に一層の期待がかかる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Izumi H, Inoue J, Yokoi S, Hosoda H, Shibata T, Sunamori M, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Frequent silencing of DBC1 is by genetic or epigenetic mechanisms in non-small cell lung cancers. Hum Molec Genet (in press)

Takada H, Imoto I, Tsuda H, Sonoda I, Okanoue T, Inazawa J. Array-based comparative genomic hybridization (CGH-array) analysis for genome-wide screening of DNA copy-number aberrations in gastric cancer cell lines. Cancer Sci 96:100-110, 2005

Shinto E, Tsuda H, Ueno H, Hashiguchi Y, Hase K, Tamai S, Mochizuki H, Inazawa J, Matsubara O. Prognostic implication of laminin-5 gamma 2 chain expression in the invasive front of colorectal cancers, disclosed by area-specific four-point tissue microarrays. Lab Invest 85:257-266, 2005

Sanada T, Yokoi S, Arii S, Yasui K, Imoto I, Inazawa J. Skp2 Overexpression is a p27Kip1-independent poor prognosticator in patients with biliary tract cancers. Cancer Sci 95:969-976, 2004

- Tanami H, Imoto I, Hirasawa A, Yuki Y, Sonoda I, Inoue J, Yasui K, Misawa-Furihata A, Kawakami Y, Inazawa J. Involvement of overexpressed wild-type BRAF in the growth of malignant melanoma cell lines. *Oncogene* 23:8796-8804, 2004
- Misawa A, Hosoi H, Imoto I, Iehara T, Sugimoto T, Inazawa J. Translocation (1;22) (p36;q11.2) with concurrent del(22) (q11.2) resulted in homozygous deletion of SNF5/INI1 in a newly established cell line derived from extrarenal rhabdoid tumor. *J Hum Genet* 49:586-589, 2004
- Yokoi S, Yasui K, Mori M, Iizasa T, Fujisawa T, Inazawa J. Amplification and overexpression of SKP2 are associated with metastasis of non-small-cell lung cancers to lymph nodes. *Am J Pathol* 165:175-180, 2004
- Inoue J, Otsuki T, Hirasawa A, Imoto I, Matsuo Y, Shimizu S, Taniwaki M, Inazawa J. Overexpression of PDZK1 within the 1q12-q22 amplicon is likely to be associated with drug-resistance phenotype in multiple myeloma. *Am J Pathol* 165:71-81, 2004
- Yuki Y, Imoto I, Imaizumi M, Hibi S, Kaneko Y, Amagasa T, Inazawa J. Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19) (q23;p13). *Cancer Sci* 95:503-507, 2004
- Sonoda I, Imoto I, Inoue J, Shibata T, Shimada Y, Chin K, Imamura M, Amagasa T, Gray JW, Hirohashi S, Inazawa J. Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous-cell carcinoma. *Cancer Res* 64:3741-3747, 2004
- Sato H, Saito-Ohara F, Inazawa J, Kudo A. Pax-5 is essential for kappa sterile transcription during Ig kappa chain gene rearrangement. *J Immunol* 172:4858-4865. 2004
- Yasui K, Mihara S, Zhao C, Okamoto H, Saito-Ohara F, Tomida A, Funato T, Yokomizo A, Naito S, Imoto I, Tsuruo T, Inazawa J. Alteration in Copy-Numbers of Genes as a Mechanism for Acquired Drug Resistance. *Cancer Res* 64:1403-1410, 2004
2. 学会発表
井上純、三沢 (降旗) あき子、斎藤 (小原) 深美子、細井創、杉本徹、井本逸勢、稲澤讓治、BAMCA (BAC-array

combined with MCA)法による神経芽腫での 1p35-p36 異常メチル化領域の探索. 第 63 回日本がん学会学術総会. 福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡. 福岡. 2004 年 9 月 29 日

三沢 (降旗) あき子、井上純、井本逸勢、齋藤 (小原) 深美子、細井創、杉本徹、稲澤譲治、BAMCA (BAC-array combined with MCA)法による神経芽腫における網羅的異常メチル化領域の探索. 第 63 回日本がん学会学術総会. 福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡. 福岡. 2004 年 9 月 29 日

中川貴之、井上純、園田格、三沢 (降旗) あき子、小村健、井本逸勢、稲澤譲治、ゲノムアレイを用いた DNA メチル化領域の網羅的検出法 (BAMCA: BAC-array combined with MCA) の開発. 第 63 回日本がん学会学術総会. 福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡. 福岡. 2004 年 9 月 29 日

鈴木江美奈、柚木泰広、今泉益栄、日比重美、金子安比古、天笠光雄、井本逸勢、稲澤譲治、乳児 ALL の t(1;19) に見出された E2A/PBX1 と異なる転座遺伝子 MEF2D/DAZAP1. 第 63 回日本がん学会学術総会. 福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡. 福岡. 2004 年 9 月 29 日

横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、ゲノムアレイを用いた転写調節領域の網羅的検出法 “CHIP on chip” の開発. 第 63 回日本がん学会学術総会. 福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡. 福岡. 2004 年 9 月 29 日

井本逸勢、園田格、井上純、柴田龍弘、嶋田裕、今村正之、天笠光雄、広橋説雄、稲澤譲治、食道扁平上皮がんでホモ欠失またはメチル化により高頻度に silencing される腫瘍抑制遺伝子候補 LRP1B. 第 63 回日本がん学会学術総会. 福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡. 福岡. 2004 年 9 月 29 日

高田久、井本逸勢、細田文恵、津田均、岡上武、大木操、稲澤譲治、高密度・高精度ゲノムアレイにより発見された新規胃がん関連遺伝子候補の解析. 第 63 回日本がん学会学術総会. 福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡. 福岡. 2004 年 9 月 30 日

田波秀朗、井本逸勢、杉原健一、稲澤譲治、ゲノムコピー数異常の網羅的解析からの大腸がん肝転移関連遺伝子の探索. 第 63 回日本がん学会学術総会. 福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡. 福岡. 2004 年 9 月 30 日

中田慎一郎、長澤正之、井本逸勢、稲澤譲治、水谷修紀、G2/M および mitotic checkpoint の異常は MLL 遺伝子再構

成を引き起こす。第63回日本がん学会学術総会。福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡。福岡。2004年9月30日

鈴木文香、井本逸勢、白鳥敬子、稲澤讓治、高密度ゲノムアレイによる膵がんの潜在的ゲノム異常の網羅的解析。第63回日本がん学会学術総会。福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡。福岡。2004年10月1日

和泉宏幸、井本逸勢、井上純、横井左奈、飯笹俊彦、藤澤武彦、高橋隆、稲澤讓治、高密度ゲノムマイクロアレイにより発見された新規肺がん抑制遺伝子候補の解析。第63回日本がん学会学術総会。福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡。福岡。2004年10月1日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) PCT/JP2004/001574 「薬剤耐性を獲得したがん細胞の検出方法」

2004.2.4、出願番号:特願2004-36028、PCT/JP2004/001574、PBM95PCT

2) PTC/JP2004/002294 「新規キメラ蛋白質およびこれをコードする遺伝子、並びに、これらの遺伝子と蛋白質を用いた白血病の判別手段」

2004.2.26、出願番号:

PTC/JP2004/002294、PBM96PCT

3) 特願2004-81926 「ゲノムDNAの定着基盤と当該基盤を用いた染色

体異常並びにそれに起因する疾患の検出方法」2004.3.22、出願番号:特願2004-81926、

4) 特願2004-84795 「食道がんの検出方法、および、抗食道がん物質のスクリーニング方法」2004.3.23、出願番号:特願2004-81926

5) 特願2004-88424 「特定のがん関連遺伝子を用いるがんの検出方法及びがんの抑制方法」2004.3.25、出願番号:特願2004-88424

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

諸臓器のがんにおけるゲノム構造異常の網羅的解析

分担研究者 細田 文恵 国立がんセンター研究所分子腫瘍学部 室長

研究要旨：がんにおけるゲノム構造異常を網羅的に解析する目的で、高密度BACアレイ (MCG Whole Genome Array-4500) を用いて胃がん135症例、乳がん46症例のアレイCGH解析を行った。症例を重ねることにより胃がん、乳がんにおけるゲノムコピー数異常の全体像が捉えられたとともに、高密度BACアレイの使用によりMCG Cancer Array-800では見つからなかった新規の増幅領域を胃がんで70領域（合計95領域）、乳がんで20領域（合計42領域）検出し、ホモ欠失領域を胃がんで23領域（合計34領域）、乳がんで1領域（合計7領域）検出した。これらは新規がん関連遺伝子単離のための糸口となるものである。

A. 研究目的

本研究ではアレイCGH (comparative genomic hybridization) 法を用いたゲノム解析によってがん細胞の遺伝的変化を特定し、がんの性質を規定する因子、特に新規がん関連遺伝子の単離を目指す。がん遺伝子・がん抑制遺伝子の同定は発がん機構の解明につながるのみならず、個々のがんにおける多様な遺伝的変化を病態に対応づけて整理することにより、病型診断や予後予測、治療法の選択等に役立つ可能性がある。

B. 研究方法

アレイCGH法はゲノムのコピー数異常

を探索するための手法のひとつであり、アレイに載せるプローブの高密度化によりゲノム中の微細領域のコピー数変化をも検出できる系である。東京医科歯科大学、稲澤譲治教授グループとの共同研究により、プローブとしてBAC DNAを用いたMCG Whole Genome Array-4500を作製した。がん関連遺伝子を含む800個のBACクローンを配したMCG Cancer Array-800を併用することにより、ヒトゲノムを平均0.6 Mb間隔でスキャンングできる。アレイCGH解析の対象とする胃がん、乳がんについては、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法によってがん組織切片よりがん細胞の

分離を行い、DNA を抽出、アダプターライゲーション法による DNA の増幅を行った。Cy3 標識したがん細胞 DNA (T) と Cy5 標識した正常細胞 DNA (N) を等量混ぜてアレイ上の BAC DNA とハイブリダイズさせた後、結合した蛍光色素量を測定することによって、T/N シグナル比を算出する。T/N 比が 1.3 以上を重複、0.7 未満を欠失として取り扱った。

(倫理面への配慮)

本研究を行うにあたって、手術標本からの組織採取に際しては、「遺伝子解析による疾病対策・創薬等に関する研究における生命倫理問題に関する調査研究」により検討される基準に従い患者への説明と同意を得ると共に、患者のプライバシーを厳守した。また、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した。

C. 研究結果

MCG Whole Genome Array-4500 を用いて、胃がん 135 症例 (高分化型 tub1 : 46 症例 ; 中分化型 tub2 : 33 症例 ; 低分化充実型 por1 : 23 症例 ; 低分化非充実型 por2 : 33 症例)、浸潤性乳管がん 46 症例の解析を行った。DNA コピー数異常は胃がん、乳がんのすべての症例で観察され、症例あたりの異常の合計数は、胃がん低分化非充実型 por2 を除いて、腫瘍ステージの進行に従って上昇していた。

胃がんにおいては染色体 1p36, 1q21, 1q31, 1q42, 3q26, 5p13, 6p21, 7p22-p11, 8q22-q24, 9p13, 9q34, 11q13, 12p12, 12q13, 13q, 16p13-p11, 17q12-q21, 17q25, 19q12-q13, 20 の重複が頻度 20% 以上で認められ、高頻度の重複は 20q (60%)、8q22-q24 (50%)、7p22 (40%)、17q12-q21 (40%)、6p21 (40%)、1q12 (40%) 等であった。また染色体 1p13, 3p26, 3p24, 4q34, 5q21, 8p23, 9p24-p21, 18q12-q23, 19q13, 21q21 の欠失が頻度 20% 以上で認められ、高頻度の欠失は 18q23 (35%)、9p21 (30%)、5q21 (30%) であった。分化型 (tub1, tub2, por1, por2) 別によるプロファイル間には大きな差は認められなかったが、高分化型 (tub1) の一部集団が示すプロファイルと低分化充実型 (por1) のプロファイルに類似性が見られるという MCG Cancer Array-800 解析による知見は MCG Whole Genome Array-4500 解析によっても支持された。

乳がんにおいては染色体 1q, 3p13, 3q24-q28, 4q, 5p15, 5q11, 5q21, 8q, 9p23-p21, 11q13, 12q21, 13q21-q31, 20q, X の重複が頻度 30% 以上で認められ、特に 1q, 4q, 5p15, 8q, 12q21 の重複は 60% の高頻度を示した。欠失は染色体 1p36-p34, 1p21, 3p21, 8p, 9q32, 10q11, 10q24-q26, 11q23-q25, 16q, 17p-q21, 22q において頻度 20% 以上で認められ、高頻度欠失は 17p (55%)、8p (50%)、

11q23-q25 (40%) に見られた。乳がんの組織学的異型度 grade2 集団と grade3 集団の比較から、染色体 1p36 欠失、8p 欠失、8q 重複、11q23-q25 欠失、17q21 欠失は異型度が高くなると高頻度に見られる異常であることがわかった。またエストロゲンレセプター (ER) 陽性、陰性別比較では、11q23 欠失と 16p13 重複、16q13-q23 欠失が ER(+) 症例に特徴的であるのに対して、14q24-q32 欠失、17p 欠失、17q21 重複は ER(-) 症例に特徴的であった。

昨年度 MCG Cancer Array-800 解析により T/N 比が 4 以上の高度増幅を胃がんで 25 領域、乳がんで 22 領域見出していたが、MCG Whole Genome Array-4500 解析によって新たに胃がんで 70 ヶ所、乳がんで 20 ヶ所を検出した。同じく T/N 比が 0.3 未満のホモ欠失領域を胃がんで 11 領域、乳がんで 6 領域見出していたが、新たに胃がんで 23 ヶ所、乳がんで 1 ヶ所が追加された。

D. 考察

胃がんおよび乳がんについてそれぞれ特徴的なゲノムコピー数異常プロファイルを取得した。胃がんにおいて高頻度に重複が見られ、かつ、がん遺伝子として認知されている遺伝子の増幅 (T/N 比 4 以上) が見られた領域は、3q26 (SNO), 6p21 (CCND3), 7p12 (EGFR), 8q24 (MYC), 10q26 (FGFR2), 11q13 (FGF4, CCND1),

12p12 (KRAS), 17q12 (ERBB2), 19q12 (CCNE1), 20q13 (ZNF217) であった。また高頻度に欠失が見られ、かつ、がん抑制遺伝子として認知されている遺伝子のホモ欠失 (T/N 比 0.3 未満) が見られた領域は、3p24 (TGFBR2), 3p14 (FHIT), 5q21 (APC), 8p22 (DLC1), 9p21 (MTAP, p16) であった。同様に乳がんにおける既知のがん遺伝子増幅領域は、8p12 (FGFR1), 8q24 (MYC), 11q13 (FGF4, CCND1), 12q13 (ERBB3), 17q12 (ERBB2), 20q13 (ZNF217, BCAS1) であり、既知のがん抑制遺伝子ホモ欠失領域は 8p22 (DLC1), 9p21 (MTAP, p16), 10q23 (PTEN) であった。以上の結果は従来のゲノム解析から得られてきた成果報告とよく一致するものである。今回高密度アレイを用いたことによって分解能が上がり、高頻度にコピー数異常を示す微細領域を多数検出した。これらの多くは既知のがん関連遺伝子を含まない新規の領域であり、これらを対象として増幅あるいは欠失のターゲット遺伝子を特定し、新規のがん関連遺伝子探索につなげたい。

また、胃がん、乳がんともに症例のゲノム構造異常プロファイルと臨床病理像との相関を解析検討しているが、乳がんの予後因子であるリンパ節転移個数、ホルモン感受性、組織学的異型度などに特徴的な異常を示すゲノム領域が徐々にわかってきた。これらの領域から乳がんの生物学的悪性度を規定する責任遺