

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん研究事業）  
分担研究報告書

3q26 領域における遺伝子増幅に関する研究

ヒト組織研究における試料提供体制の確立

研究分担者 野口雅之

研究要旨：

腫瘍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を解明することが必須である。小型肺腺癌の上皮内腺癌と初期浸潤癌に対して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。これら増幅の認められる遺伝子は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、多数例で検証を行い、ECT2遺伝子の異常が肺腺癌の予後を規定する予後因子であることを明らかにした。

ヒト組織を用いた研究の活性化のためにどのような材料保存、供給体制が必要かを検証し、最終的に『つくばヒト組織バイオバンクセンター』を筑波大学附属病院内部局として立ち上げる事に成功した。

A．研究目的

腫瘍の発生増悪のメカニズムを解明するには、前臨床がん状態の非常に早期病変に起こる異常を研究することが必須である。そこで我々は肺腺癌において、発生初期の非浸潤がんと初期浸潤がんにおける染色体異常を網羅的に検出し、肺腺癌の発生と増悪に関与する遺伝子異常を探索した。

一方で上記のようなヒトがんの発生悪性を研究するにはヒト試料を用いた研究が必須である。しかし現在日本においてはヒト組織の利用は研究機関単位で行われており、自由に研究利用する事の出来る機関もシステムも存在しない。そこで県レベルでの組織バンキングシステムを構築すること

を目的に研究を行った。

それぞれ、について分けて報告する。

3q26領域における遺伝子増幅に関する研究

B．研究方法

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。

筑波大学附属病院症例で上皮内肺腺癌（野口分類 TypeA,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。

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。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追加し免疫染色を行い、発現を免疫染色にて比較検討した。抗体はECT2(1946562, MILLIPORE), EIF5A2(HPA029090, SIGMA), PIK3CA(C73F8, Cell Signaling Technology), TNFSF10(k-18, Santa Cruz)を用いた。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。

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2で使用した進行肺腺癌70例を用いた。抗体は Ki-67(MIB1, DAKO)を用いた。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。

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-Meier Method を用いた。

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](#)) で解析を行った。

#### C: 研究結果

筑波大学附属病院病理を用いた 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。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。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 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。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 遺伝子発現は腺癌細胞においては通常存在する核内のみならず細胞質内にも認められ、この発現陽性症例も同様に肺腺癌の予後などに関係していた。

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。さらに早期肺腺癌 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。

#### D: 考察

遺伝子異常の多数症例解析はほとんどが進行癌についてであり、非小細胞肺癌では、3q26 領域 (PIK3CA や EVI-1 など) については、遺伝子異常が予後に関連しているという報告があるが、小型肺腺癌に特化した検討はあまり報告されていない。3p 領域ではすでに小細胞肺癌で欠失が認められ、肺腺癌においても Whole-genome/exome sequence analysis によって、新たな mutation が発見されているが 3q についての解析は少ない。

今回我々は、array-CGH を用いた解析で上皮内肺腺癌 (Types A,B) に比べ、早期の浸潤癌 (Types D,E) において有意に 3q 領域に増幅が認められた。今回の結果は 3q 領域には、肺癌においてがんの悪性化 (転移・浸潤) に関与する遺伝子が含まれているのではないかと推測される。3q26 領域に存在する ECT2 (epithelial cell transforming sequence 2) はグアニンヌクレオチド交換因子をコ

ードし、通常は核内に存在し GTP 加水分解酵素である RhoA を活性化し、細胞分裂を制御している。一方、遺伝子短縮した oncogenic な ECT2 は細胞質に移行し、PKCi-Par6 複合体と結合し、Rac1 を活性化し、腫瘍の浸潤や増殖に関与するという報告もある。今回の検討でも ECT2 の免疫染色において、核内染色性以外にも細胞質染色性を評価しても N 因子、静脈浸襲、病理病期、組織亜型において有意差が認められ、これらはすなわち浸潤に関与する因子において有意差が認められたと考えられる。ECT2 の、特に細胞質内発現は肺腺癌において予後に関与するバイオマーカーといえる。

国立がんセンター中央病院症例を用いた SNP 解析、cDNA microarray での結果でも ECT2 の増幅は浸潤癌にみられ、高発現群は予後不良の結果もでており、筑波大学附属病院症例を用いた解析結果を確認した。

#### E: 結論

小型肺腺癌の中で上皮内腺癌（野口分類 Type A,B）と早期の浸潤癌（野口分類 Type D,E）に対して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 解析を行い、3q26 領域に存在する遺伝子の中でも ECT2 の核内および細胞質内発現亢進は予後に関するバイオマーカーであることを見いだした。

#### ヒト組織研究における試料提供体制の確立

ヒトがん研究を推進させるためにはヒト

組織を用いた研究が自由に行える環境を整える事が必須である。そこで本研究ではヒト組織バイオバンクシステムの構築を行った。しかし国レベルでのバンキングシステムの構築は現時点では極めて困難であると考え、本研究では『県』レベルでのバンキングシステムの構築を目指した。筑波大学の位置する茨城県においてバンキングシステムを構築するためにまず、別図に示すような「つくばヒト組織バイオバンク」組織を構築した。試料の提供は筑波大学附属病院の外科系各診療グループに依頼して手術、生検の残余検体をバンキングした。また、ゲノム指針に則って試料を収集するための必要細則、書類などを整備した。現在呼吸器外科、消化器外科、泌尿器科、乳腺甲状腺外科などの協力を得て 1200 例以上の症例がバンキングされている。平成 25 年 11 月に正式に筑波大学附属病院の一つの部局として独立した。

今後、茨城県における地域医療貢献のための病理診断システム（つくばヒト組織診断センター）の協力を得て、茨城県下のがん診療拠点病院を中心に検体の収集病院を拡大し、将来的には茨城県におけるがん組織を網羅的に保存できるバンクを目指していきたい。さらにこのシステムを全国に拡張できれば国レベルでのバンキングシステムがスムーズに構築できる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1.Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, Geisinger K, Yatabe Y, Ish

ikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Nakatani Y, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. Diagnosis of Lung Adenocarcinoma in Resected Specimens: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med*, 2013, 137(5):685-705.

2. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. Diagnosis of Lung Cancer in Small Biopsies and Cytology: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med*, 2013, 137(5):668-84.

3. Nakazato Y, Maeshima MA, Ishikawa Y, Yatabe Y, Fukuoka J, Yokose T, Tomita Y, Minami Y, Asamura Y, Tachibana K, Goya T, Noguchi M. Inter observer agreement in the nuclear grading of primary pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(6):736-743

4. Kawamura T, Usui J, Kaseda K, Takeda K, Ebihara I, Ishizu T, Iitsuka T, Sakai K, Takemura K, Kobayashi M, Koyama A, Kanemoto K, Sumazaki R, Uesugi N, Noguchi M, Nagata M, Suka M, Yamagata K. Primary membranoproliferative glomerulonephritis on the decline: decreased rate from the 1970s to the 2000s Japan. *Clin Exp Nephrol*, 2013, 17 : 248-254.

5. Usui S, Minami Y, Shiosawa T, Iyama S, Sato Y, and Noguchi M. Differences in the prognostic implications of vascular invasion between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Lung Cancer*, 2013, 82(3):407-12.

6. Thunnissen E, Beliën JA, Kerr KM, Chung JH, Flieder DB, Noguchi M, Yatabe Y, Hwang DM, Lely RJ, Hartemink KJ, Meijer-Jorna LB, Ysao MS. In compressed lung tissue microscopic sections of ade-

nocarcinoma in situ may mimic papillary adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 2013, 137(12):1792-7.

7. Iwakawa R, Takenaka M, Kohno T, Shimada Y, Totoki Y, Shibata T, Tsuka K, Nishikawa R, Noguchi M, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Yokota J. Genome-wide identification of genes with amplification and/or fusion in small cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013, 52(9):802-16.

8. Yoshihiko Murata, Yuko Minami, Reika Iwakawa, Jun Yokota, Shingo Usui, Koji Tsubota, Kouya Shiraishi, Shingo Sakashita, Kaishi Satomi, Tatsuo Iijima, and Noguchi M. ECT2 amplification and overexpression as a new prognostic biomarker for early-stage lung adenocarcinoma. *Cancer Science* [in press]

## 2. 学会発表

1. 糸口直江、中川智貴、佐藤泰樹、中村優子、薄井真悟、南優子、野口雅之。気管支洗浄液の液状化検体細胞診を用いた免疫染色による肺癌診断の試み。第54回日本臨床細胞学会総会(春期大会)、2013年6月2日、グランドプリンス新高輪

2. 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、第102回日本病理学会総会、2013年、6月8日、ロイトン札幌

3. 糸口直江、佐藤泰樹、永田千草、南優子、野口雅之。肺腺癌の悪性度因子としてのOCIAD2の臨床病理学的意義、第102回日本病理学会総会、2013年、6月8日、ロイトン札幌

4. 佐藤泰樹、坂下信悟、南優子、野口雅之。進行肺腺癌におけるIGBP1の異常発現の解析、第102回日本病理学会総会、2013年、6月7日、ロイトン札幌

5. 村田佳彦、南優子、岩川麗香、横田淳、野口雅之。ECT2の遺伝子異常は早期肺腺癌における新規予後マーカーである、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日、パシフィコ横浜

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：特になし