

ゲノムコピー数と遺伝子発現パタン^①の腫瘍内部位による多様性の網羅的解析

(15590301)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金(基盤研究C)研究成果報告書

平成 17 年 5 月

研究代表者: 杉原 洋行

(滋賀医科大学医学部・助教授)

滋賀医科大学附属図書館



2004011551

はしがき

癌の病理診断は、現在、組織形態学的診断として行われているが、マイクロアレイの応用が進み、今後癌の遺伝子診断が病理診断に含まれるようになれば、それは癌の診断確定にとどまらず、悪性度、予後や治療法の選択などに直結する重要な情報を提供する手段となる。しかし、実際に診断に応用するためには、腫瘍組織から狙撃的に採取される検体で、どこまで腫瘍全体のゲノムの変化や発現の変化が分かるかという点についての基礎的なデータが必要である。遺伝子発現は組織環境要因でどの程度変化するのか、浸潤先進部の遺伝子発現は、粘膜の生検組織でどこまでわかるかという問題もある。本研究では、遺伝子診断を正しく運用するために不可欠の情報と考えられる、ゲノムコピー数と遺伝子発現の腫瘍内多様性を、網羅的な方法を用いて明らかにしようとした。

研究組織

研究代表者: 杉原 洋行 (滋賀医科大学医学部・助教授)

研究分担者: 向所 賢一 (滋賀医科大学医学部・助手)

(研究協力者: 塩見 尚礼、坪佐 恭宏、龍田 健、彭 敦発、凌 志強、吉村 彰伸)

交付決定額(配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	1,600	0	1,600
平成16年度	1,300	0	1,300
総計	2,900	0	2,900

研究発表

(1) 学会誌等

1. Peng D-F, Sugihara H, Mukaisho K, Tsubosa Y, Hattori T. Alterations of chromosomal copy number during progression of diffuse-type gastric carcinomas: metaphase- and array-based comparative genomic hybridization analyses of multiple samples in individual tumors. *The Journal of Pathology* 201 (3): 439-450, 2003.
2. Shiomi H, Sugihara H, Kamitani S, Tokugawa T, Tsubosa Y, Okada K, Tamura H, Tani T, Kodama M, Hattori T. Cytogenetic heterogeneity and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 147(1): 50-61, 2003.
3. Peng D-F, Sugihara H, Mukaisho K, Ling Z-Q, Hattori T. Genetic lineage of poorly differentiated gastric carcinoma with tubular component analysed by comparative genomic hybridization. *Journal of Pathology* 203 (8): 884-895, 2004.

4. Tsubosa Y, Sugihara H, Mukaisho K, Kamitani S, Peng D-F, Ling Z-Q, Tani T, Hattori T. Effects of degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction (DOP-PCR) amplification and labeling methods on the sensitivity and specificity of metaphase- and array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 158 (2):156-166, 2005.
5. 杉原 洋行 未分化型胃癌の系譜解析. *Cytometry Research* 15 (1): 47-53, 2005.

(2) 口頭発表

1. 坪佐 恭宏、杉原 洋行、向所 賢一、彭 敦堯、谷 徹、服部 隆則. DOP-PCRとDNA標識法のCGHの感度に与える影響: 近4倍体腫瘍での1コピーの染色体増減を検出するための検討. 第62回日本癌学会総会(名古屋), 2003. 9. 25.
2. Peng D-F, Sugihara H., Hattori T. Comparative CGH analyses of diffuse-type gastric carcinomas (GC) with and without tubular adenocarcinoma component. 第62回日本癌学会総会(名古屋), 2003. 9. 26.
3. 杉原 洋行、彭 敦堯、服部 隆則. 胃癌の系譜解析: 腺管成分を含む低分化腺癌の由来. 第93回日本病理学会総会(札幌), 2004. 6. 9.
4. 吉村 彰伸、杉原 洋行、彭 敦堯、服部 隆則. 未分化型胃癌における17p欠失の意味. 第93回日本病理学会総会(札幌), 2004. 6. 9.
5. Ling Z-Q, Sugihara H, Hattori T. Global gene expression and genomic copy-number analyses at chromosome level in gastric cancer cells. 第93回日本病理学会総会(札幌), 2004. 6. 9.
6. 杉原 洋行、彭 敦堯、服部 隆則. 未分化型胃癌の系譜解析. 第14回日本サイトメトリー学会(高崎), 2004. 6. 26.
7. 吉村 彰伸、杉原 洋行、彭 敦堯、服部 隆則. 未分化型胃癌における17p欠失の生物学的意味. 第14回日本サイトメトリー学会(高崎), 2004. 6. 26.
8. 龍田 健、杉原 洋行、凌 志強、服部 隆則. CESH (Comparative expressed sequence hybridization)を用いた遺伝子変化の解析. 第14回日本サイトメトリー学会(高崎), 2004. 6. 26.
9. 杉原 洋行、彭 敦堯、服部 隆則. 未分化型胃癌に含まれる腺管成分の由来. 第63回日本癌学会総会(福岡), 2004. 9. 29.
10. 吉村 彰伸、杉原 洋行、彭 敦堯、服部 隆則. 未分化型胃癌における17p欠失の生物学的意味. 第63回日本癌学会総会(福岡), 2004. 9. 30.
11. 龍田 健、杉原 洋行、凌 志強、谷 徹、服部 隆則. Comparative expressed sequence hybridization (CESH)を用いた食道扁平上皮がんの遺伝子変化の解析. 第45回日本組織細胞化学会(鹿児島), 2004. 10. 29.

12. Ling Z-Q, Sugihara H, Tatsuta T, Mukaisho K, Hattori T. CESH studies of global gene expression analysis. 第94回日本病理学会総会(横浜), 2005. 4.14.
13. 吉村 彰伸、杉原 洋行、服部 隆則. 未分化型胃癌における腺管形成とp53. 第94回日本病理学会総会(横浜), 2005. 4.14.
14. Ling Z-Q, Sugihara H, Tatsuta T, Mukaisho K, Hattori T. Comparative analyses of genomic DNA copy number and mRNA expression levels at chromosome level in gastric cancer cell lines. 第15回日本サイトメトリー学会(名古屋), 2005.7.1-2 (発表予定)

(3) 出版物

なし

研究成果

2003 年度の研究実施計画と研究成果:

(1) ゲノムコピー数の腫瘍内多様性がclonalな変化を反映しているのかランダムな変化を反映しているのかを17pと8qについて明らかにする。→

- ・ホルマリン固定組織切片からレーザマイクロダイセクションで採取した細胞にCGH、ゲノムDNA マイクロアレイを用いた、ゲノムレベルでの多様性およびゲノムの経時的変化の解析を、更にサンプリングポイントを増やし、組織形態との対応付けを行いつつ進めた。→ Shiomi et al., Cancer Genet Cytogenet, 2003; Peng et al., J Pathol, 2003; 2004にて発表。
- ・17pのlossについては、マイクロサテライトマーカーによるLOH解析と対比することによって、ゲノム変化がgrowth advantageに関連したものか(ゲノムの不安定性を反映した)ランダムな変化なのかを評価した。→ 未分化型胃癌27例のCGHで高頻度に見られた17p-をLOH解析と対比した(22例が解析可能)。腺管成分を含む(TC+)ものでは全例に(しばしばその全サンプルに)LOHがみられたが、TC(-)ではLOHはまれであった。一方17p-は、TC(+), TC(-)のいずれにも約半数にみられ、LOHとは相関が無かった。以上からTC(+)ではTP53が17p-の標的遺伝子と推定された。同様に高頻度に見られた8q+は、TC(+)ではarray CGHでC-MYCが標的であった。TC(-)ではarray CGHでそれらの遺伝子に変化していないことが多く、ランダムな変化を反映している可能性が考えられた。
- ・しかし、TCを伴う未分化型胃癌の中には、印環細胞癌の初期像である粘膜内での層状分化がみられ、印環細胞癌に由来したと考えられるものも一部に見られる。そこで、TCを、層構造を伴うものと伴わないものに分けると、TP53の変異やLOHは層構造を伴わないものに高率かつ腫瘍全体に見られ、層構造を伴うものでは、低頻度で、あっても腫瘍の一部に見られるに過ぎなかった。したがって、未分化型胃癌は層構造があれば印環細胞癌に由来すること、層構造がなくTCがあれば腺管腺癌に由来する、層構造もTCもなければ由来不明と考えることができる。こう考えると、印環細胞癌に由来するものでは、randomな変化が蓄積するうちに、late eventとしてwild-type TP53の機能が失われ、それとともに腺管形成が起こることがわかった。一方、腺管腺癌に由来するものでは、未分化型に脱分化する前からearly eventとしてwild-type TP53の機能が失われていることがわかった(吉村他、第93回日本病理学会総会(札幌), 2004; 第63回日本癌学会総会(福岡), 2004, 第94回日本病理学会総会(横浜), 2005, にて発表)。
- ・このような遺伝子レベルのTP53不活化様式の違いは、染色体レベルでの17p-の有無とは相関がなかった。LOHがありながらlossが検出されないものはinformativeな症例の50%強に及び、これらではuniparental disomyになっていると考えられた。

(2) 胃癌細胞株Kato-IIIと培養リンパ球よりRNAを抽出し、ゲノムDNAの代わりにcDNA で Comparative genomic hybridization (CGH)を行うことによる発現プロファイルの解析(Comparative expressed sequence hybridization, CESH)の基礎的検討を行う。→

- ・ CESHとcDNAマイクロアレイspotsを染色体イデオグラム上にプロットした結果との一致率を目安にして種々の標識方法(pre-cDNA 標識, post-cDNA標識, DOP-PCR標識)を比較した。これまでの文献ではDOP-PCR標識でCESHを行っていたが、他の標識に比べてマイクロアレイとの一致率が低かった(50%以下)。増幅をT7で行いcDNA合成時に標識(pre-cDNA標識)した結果と、cDNA をDOP-PCR (35 cycles)で増幅後random priming標識(post-cDNA標識)を行った結果とはほぼ同様であったが、一致率はpre-cDNA labelingの方がやや高かった。それでも一致率は約60-80%にとどまった(Ling et al., 第93回日本病理学会総会(札幌), 2004, にて発表)。この検討から、DOP-PCRはDNAの増幅には問題がないが標識には適しないことが分かった。以後、CESHにはpre-cDNA labelingを用いることにした。
- ・ 培養胃癌細胞 Kato-IIIの2番, 3番, 4番, 7番, 11番, 18番染色体の絶対的コピー数を centromere probe, painting probe, telomeric probeを用いたFISHで決定した(Tsubosa et al., Cancer Genet Cytogenet, 2005, にて発表)。→ これが発現評価においても基本的なデータとなった。
- ・ CESHの結果とcDNAマイクロアレイおよびreal time RT-PCRによるmRNAの定量の結果とを比較した。→ この検討は2004年度に行った。その結果、個々の遺伝子(Kato IIIで up/down-regulateされている遺伝子を5個ずつ選んだ)に関しては、cDNAマイクロアレイとreal time RT-PCRとは正常リンパ球に対する腫瘍の発現の比(T/R比)がきわめてよく一致した。CESHは染色体のlocus上の近接した遺伝子の平均的なT/R比を反映するので、マイクロアレイ上の個々の遺伝子のT/R比とは必ずしも一致しない。一致率は上述の通りである。近接した遺伝子群がクラスターとして発現亢進、低下した場合のみCESHで有意な変化が検出できる。そこで、cDNAマイクロアレイのすべてのスポットを染色体のイデオグラム上にプロットしたものをCESHと比較すると、(用いたマイクロアレイでspot密度の低い)数箇所を除き、発現が up/down-regulateされたスポットが集中している部分がそれぞれ、CESHでも up/down-regulateされていることが確認できた(Ling et al., 第94回日本病理学会総会(横浜), 2005, にて発表)。したがって、CESHは遺伝子がクラスターとして発現変化した領域を拾い上げていることになる。クラスターとしての発現変化の原因としては染色体レベルでのゲノムコピー数の増減が最も考えやすいが、果たしてゲノムコピー数とCESHで検出される発現の変化とがどの程度相関するのかが問題である。
- ・ この点を確かめるために、Kato-III株とAGS株を用いてCESHの結果とCGHの結果とを比較した。FISHで決定した特定の染色体のコピー数がCGHで正しく検出されていることを確かめた上で、CESHによる発現とのズレがどの程度あるのかを解析した。→ その結果、CGHで変化の無い領域にCESHで変化を認める部分があり(1p, 14qのdown-regulation, 4q, 13qの up-regulationなど)、転写因子等による発現調節やuniparental disomyなどが考えられた。CGHでloss/gainがあったがCESHで変化がなかった領域(20p+など)もあった(Ling et al., 第94回日本病理学会総会(横浜), 2005, にて発表)。

2004 年度の研究実施計画と研究成果:

(1) CESH の結果と cDNA マイクロアレイの結果とを比較し、cDNA マイクロアレイの結果と比較的高い一致率を示す標識方法を確立する。→ 上述

(2) 食道扁平上皮癌の病変内の複数箇所に CESH を用いて染色体レベルでの遺伝子発現パターンを網羅的に検索し、粘膜での発現パターンと、腫瘍深部での発現パターンの差を明らかにする。→食道扁平上皮癌の病変内の複数箇所の凍結切片から DNA、RNA を抽出し、CGH と CESH を用いて染色体レベルでのゲノムコピー数および遺伝子発現の変化を検出し、粘膜と腫瘍深部でのゲノムコピー数と発現パターンの差を明らかにした(龍田ら、第 45 回日本組織細胞化学学会(鹿児島), 2004, にて発表)。

CGH では random priming 標識を、CESH では RNA 精製後、T7 transcription による増幅後、pre-cDNA 標識を行った。この場合、reference は正常扁平上皮を用いた。

- ・ CGH で DNA コピー数の減少した部分は、CESH でも有意な発現低下が確認できたが、DNA コピー数の増加した部分は必ずしも発現亢進を伴わなかった。逆に、ゲノムの増加が無く発現が亢進した部分もみられた。粘膜部と深部では発現パターンが一致することが多かったが、深部でのみ発現亢進の見られた染色体部分があった。その場合、深部で DNA コピー数の増加は見られないことが多く、環境変化により遺伝子の発現レベルが変化した可能性が考えられた。
- ・ 食道癌の 1 例を用いて、ゲノムコピー数の変化と発現の変化との関係を、(すべてのサンプルに共通な)stemline 変化と、(一部のサンプルのみにみられる)sideline 変化とに分けて検討したところ、興味ある結果が得られた。Stemline 変化として染色体部分のコピー数が増減した部分は、そのほとんどの部分で、それぞれ発現の亢進と低下が CESH で検出された。逆に、CESH で stemline 変化として発現亢進と低下がみられた部分では、その約 50%で、対応する染色体部分のコピー数の増加と減少がみられた。Sideline 変化として発現が変化した場合には、対応する染色体部分のコピー数はほとんど変化していなかった。これらのことから、粘膜内の複数箇所から生検で採取した組織に CGH を行い、粘膜内での stemline 変化として染色体部分のコピー数の増加が見られれば、その変化は、深部浸潤部も含んだ腫瘍全体としての stemline 変化を含んでいる。その場合、その染色体部分にある遺伝子は深部浸潤部でも発現が亢進している可能性が高いと推定できるであろう。さらに多数例を解析して、このような予測がどこまで可能なのかを今後明らかにしていきたい。

(3) 未分化型胃癌の病変内の複数箇所に CGH と CESH を用いて、粘膜と腫瘍深部での染色体レベルのゲノムコピー数と発現パターンの差を明らかにする。→食道癌と同様に、病変内の複数箇所の凍結切片から DNA、RNA を抽出し、CGH と CESH を用いて染色体レベルでのゲノムコピー数および遺伝子発現の変化を検出した。CESH の reference にはレーザマイクロ代セクションで採取した正常胃腺上皮を用いた。現在解析中である。

まとめと今後の研究の展開

遺伝子診断を正しく運用するために不可欠の情報である、「ゲノムの非特異的な変化と特異的な変化をいかに区別するか」、「腫瘍組織から狙撃的に採取される検体でどこまで腫瘍全体のゲノムの変化や発現の変化が分かるのか」を明らかにするために、これまで進めてきたゲノムコピー数の腫瘍内変化のデータに LOH や (染色体レベルでの) 発現の腫瘍内変化のデータを重ね合わせ、ゲノム変化が発現の変化につながっているのか、(ゲノムの不安定性を反映した) ランダムな変化なのかを解析するとともに、遺伝子発現の腫瘍内多様性がどの程度ゲノムコピー数の多様性を反映しているのかを評価した。後者のアプローチでは、染色体レベルでの発現パタン解析ツールである CESH の方法論の検討から行わなければならなかったが、cDNA マイクロアレイの結果と比較的高い一致率を示す CESH の方法を確立することができた。

前者のアプローチでは、17 番染色体短腕の欠失と *TP53* の LOH や mutation との間に相関がないこと、したがって染色体レベルの loss を LOH とつなげて考えるのは正しくないことがわかった。これは、染色体レベルの loss はその領域内の遺伝子群のゲノムコピー数の平均が loss に傾いていることを意味しているからであり、その平均コピー数が個々の遺伝子のコピー数と必ずしも相関しないのは、考えてみれば当然のことである。ゲノムマイクロアレイと CGH を対比しても、両者は必ずしも一致せず、loss の領域の中にぽつんと遺伝子増幅を示すアレイ spot が見られることがあった。

同様のことは遺伝子発現のレベルでもみられることが、後者のアプローチで明らかになった。cDNA マイクロアレイと CESH を対比すると、cell line を用いて検討しても、その一致率はゲノムの場合よりも更に低かったのである。CESH は遺伝子がクラスターとして発現変化した領域を拾い上げている。クラスターとしての発現変化の原因としては染色体レベルでのゲノムコピー数の増減が最も考えやすいが、果たしてゲノムコピー数と CESH で検出される発現の変化とがどの程度相関するのかは問題である。この点を確かめるために、cell line を用いて CESH の結果と CGH の結果とを比較した。FISH で決定した特定の染色体のコピー数が CGH で正しく検出されていることを確かめた上で、CESH による発現とのズレがどの程度あるのかを解析した。その結果、両者が一致したのは、検索した cell line で平均すると、変化のあった染色体 arm の総数の 1/3 強に過ぎなかった。これは、クラスターとしての発現変化の原因として、染色体レベルでのゲノムコピー数の増減以上に、転写因子、プロモータメチル化等による発現レベルでの調節が重要であることを示している。このような個々の遺伝子をターゲットとした発現調節が、どのように染色体レベルの発現にかかわっているのか、染色体レベルでも発現調節メカニズムが存在するのかどうかを解明することは今後の課題である。

最後に、食道癌、胃癌の外科手術材料を用いて、ゲノムコピー数の変化と発現の変化との関係を調べ、「浸潤先進部の遺伝子発現が粘膜の生検組織でどこまでわかるか」という問題に取り組んだ。CESH で stemline 変化として発現亢進と低下がみられた部分では、その約 50% で、対応する染色体部分のコピー数の増加と減少がみられ、逆に stemline 変化として染色体部分のコピー数が増減した部分は、そのほとんどの部分で、それぞれ発現の亢進と低下が CESH で検出された。一方、sideline 変化として発現が変化した場合には、対応する染色体部分のコピー数はほとんど変化していなかった。これらのことは、浸潤先進部の遺伝子発現を粘膜の生検組織で推定する方法があり得ることを示唆

している。粘膜内の複数箇所から生検で採取した組織に CGH を行い、粘膜内での stemline 変化として染色体部分のコピー数の増加が見られれば、その変化は、深部浸潤部も含んだ腫瘍全体としての stemline 変化を含んでいる。その場合、その染色体部分にある遺伝子は深部浸潤部でも発現が亢進している可能性が高いと推定できるであろう。さらに多数例を解析して、このような予測がどこまで可能なかを今後明らかにしていきたい。このような情報を蓄積していくことは、「浸潤先進部の遺伝子発現が粘膜の生検組織でどこまでわかるか」という問題を解明していく上で、きわめて重要と考えられる。