

染色体変化の腫瘍内多様性からみたゲノム変化の temporal analysis

課題番号：13670171

平成 13 年度～平成 14 年度科学研究費補助金（基盤研究 C2）研究成果報告書

平成 15 年 5 月

研究代表者：杉原 洋行
（滋賀医科大学医学部・助教授）

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）

（研究協力者：彭 敦発、向所 賢一、坪佐 恭宏、神谷 純弘）

交付決定額

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	1,000	0	1,000
平成 14 年度	1,100	0	1,100
総計	2,100	0	2,100

研究発表

(1) 学会誌等

- Tamura H, Sugihara H, Bamba M, Tani T, Hosokawa M, Kodama M, Hattori T. Clonal analysis of esophageal squamous cell carcinoma with intraepithelial component. Pathobiology 69(6): 289-296, 2001.9.1.
- Kamitani S, Sugihara H, Shiomi H, Tani T, Hattori T. Intratumoral regional variations in copy number of chromosomal part revealed by microdissection and combined ploidy and comparative genomic hybridization analyses in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Genet Cytogenet 132(1), 30-35, 2002.1.1.
- Tokugawa T, Sugihara H, Tani T, Hattori T. Modes of silencing of p16 in development of esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res 62(17): 4938-4944, 2002.9.1.
- 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 Genet Cytogenet （発表予定）
- 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 analysis of multiple samples in individual tumors. J Pathol （発表予定）

(2) 口頭発表

- 彭 敦発、杉原洋行、服部隆則. CGH analysis of DOP-PCR-amplified DNA from microdissected cells of diffuse gastric carcinoma. 第 91 回日本病理学会総会（横浜）, 2002.3.26.
- 彭 敦発、杉原洋行、服部隆則. CGH analysis of DOP-PCR-amplified DNA from microdissected cells of diffuse gastric carcinoma.第 12 回日本サイトメトリ学会（愛知）, 2002.8.2.

滋賀医科大学附属図書館



2002018452

- Sugihara H, Peng D-F, Hattori T. Earlier genomic changes in diffuse-type gastric carcinomas: CGH and genomic microarray analyses. 8th European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours (Barcelona), 2002, 9.12-15.
- 坪佐恭宏、杉原洋行、向所賢一、彭敦発、神谷純弘、谷徹、服部隆則. CGH 及び CGH アレイ解析に対する DOP-PCR の影響. 日本癌学会第 61 回総会（東京）, 2002.10.1.
- 彭 敦発、杉原洋行、服部隆則. 未分化型胃癌における DOP-PCR 増幅後の CGH 及び array CGH 解析. 日本癌学会第 61 回総会（東京）, 2002.10.2.
- 彭 敦発、杉原洋行、服部隆則. Comparative CGH and histological analyses in diffuse-type gastric carcinomas. 第 92 回日本病理学会総会（福岡）, 2003.4.25.
- 杉原洋行、彭 敦発、服部隆則. 染色体・遺伝子変化の腫瘍内多様性からみた未分化型胃癌の temporal analysis. 第 92 回日本病理学会総会（福岡）, 2003.4.25.

研究成果

目的と研究のデザイン

私たちは、HUMARA によるクローン解析を、表層拡大を示す胃の印環細胞癌や食道癌など、field carcinogenesis が示唆されていた腫瘍に用い、そのほとんどが単クローン性であることをこれまで明らかにしてきた (Bamba et al., 1998; Tamura et al., 2001)。この研究では、クローン性に増生する細胞集団を作りながら、腫瘍細胞がどのように悪性度を増して行く（=進展する）のかを解明するために、不可逆的かつ蓄積性に变化するゲノムレベルの変化を手がかりに、腫瘍内の多様な成分（サブクローン）の間の系譜を明らかにしようとした。腫瘍内の多様性から時間軸を遡り、early event と late event とを識別できるこのようなアプローチを、私たちは temporal analysis と呼んでいる。

この研究では、ゲノムレベルの変化として、CGH による染色体構造の変化に注目することにした。CGH によって、(コピー数の増減を伴う) 構造異常を全染色体にわたって網羅的にスクリーニングできるだけでなく、マイクロサテライト解析では多数のマーカーを必要とする染色体コピー数の増減の境界 breakpoint を比較的容易に知ることができる。breakpoint が偶然一致することはまれであるので、腫瘍内の組織型や進展の時期の異なるサンプル間でそれが一致することにより、クローンの共通性を明らかにできるのである。

2 年間の研究期間内の初年度に、microdissection によって個々の腫瘍内の複数箇所より採取した腫瘍細胞の DNA を DOP-PCR で増幅し、CGH に用いる場合の方法論的な問題点を検討して方法を確立し、2 年目にはこれまで間質の混入が多いために解析が困難とされてきた未分化型胃癌にその方法を応用した。

初年度の具体的目標

これまで microdissection の比較的容易な食道癌を用いて多数箇所のサンプリングから腫瘍内

の染色体構成の多様性から temporal analysis を行ってきた (Kamitani et al., 2002; Shiomi et al., in press) が、それらの経験も踏まえて、初年度に以下のような問題点を抽出した。まず、上記のような temporal analysis を行うためには、サンプル間で間質成分の混入の割合が一定である必要がある。間質成分の混入率が変わればそれだけで CGH の結果 (G/R 比のシフトサイズや breakpoint の位置) が異なり、これが「変化」と誤って判断される可能性がある。間質成分の混入が一定であることをどのようにモニターすればよいのかということが、まず問題になった。次に、DNA のコピー数の増減が DOP-PCR による増幅の過程や標識の過程で変化してしまわないかどうか、また PCR 増幅の exponential phase と plateau phase でコピー数が変化しないかどうか、2 種類の細胞を種々の割合で混入させて DOP-PCR 増幅を行った場合、その成分比が増幅過程を通じて保たれるかどうかを検討した。

初年度の結果とその意義

間質成分の混入率は、すべてのサンプルに共通な変化 (これを stemline 変化と名づけた) に注目することで評価できることに気づいた。約 20 例の未分化型胃癌で多数箇所から採取したサンプルを解析した結果、stemline 変化は約 85% の症例で検出できた。これらの症例で、その変化の G/R 比を比較することによって、間質成分の混入の程度が評価でき、混入の多いサンプルを除外して検討することができた。

DOP-PCR 後に nick translation 標識を行い、効率よく標識するためには長い DNA を長いまま増幅できなければならない。そこで、PCR 反応の polymerase を再検討し、EX Taq (Takara) がその目的に適していることが分かった。

リアルタイム PCR で PCR 増幅の phase 間 (exponential か plateau か) で CGH の結果を比較したところ、有意な差は見られなかった。そのために以後の検討は plateau phase まで DOP-PCR を行うことにした。

DOP-PCR と標識法の影響と 2 種類の細胞の混合比の constancy の確認は、染色体 DNA の 1 コピーの増減と 2 コピーの増減を識別できる、near-tetraploid の KATO-III 細胞を用いて検討した。Kato III 細胞に正常細胞を種々の割合で混合した contamination model を作成して CGH を行い、混合比に応じた G/R 比の変化が DOP-PCR によって修飾されるかどうかを検討した。そのさい、まず 2、3、4、7、11、18 番染色体の FISH を行い、1、2 コピーの loss、1-3 コピーの gain の領域を割り出し、それぞれの領域のコピー数の変化が CGH でどれだけ検出できるかを調べた。その結果、CGH では、DOP-PCR による増幅の有無が G/R 比の profile や正常細胞の混合による G/R 比の変化に影響することはほとんどなかった。また、nick translation 標識では、理論値通り、DNA-tetraploid の腫瘍に正常細胞の contamination が 20% 未満の条件で 1 コピーの gain が CGH で捉えられた。しかし、染色体の 1 コピー loss を捉えることは困難であった。

これまで食道癌の CGH 解析を nick translation 標識 (Shiomi et al., in press) だけでなく、DOP-PCR 標識によっても行ってきた (Kamitani et al., 2002) が、両者の間でデータにかなりの不一致があった。上述の Kato-III 株を用いた方法で DOP-PCR による標識を検討すると、nick

translation 標識にくらべ、false positive の変化が検出されやすいことが分かった。

また初年度から、2 年目の応用を視野に入れて、未分化型胃癌からいかに腫瘍細胞を効率的に採取するかの検討を始めていた。そして、あらかじめ炎症細胞の少ない部分の選び、そこで microdissection を行うことが最も重要であることが分かった。

次年度の具体的目標

初年度で確立したプロトコルを用いて、腫瘍内の複数箇所でも microdissection、DOP-PCR、nick translation 標識後の CGH を行い、染色体（部分）のコピー数変化の結果（特にその breakpoint の位置の共通性と多様性）から腫瘍内のサブクローン間の系譜解析を行った。

次年度の結果とその意義

Diffuse 型胃癌 23 例の個々の腫瘍内の多数箇所からサンプリングを行い、それぞれのサンプルから抽出した DNA を EX Taq を用いた DOP-PCR で増幅後、nick translation で標識後、CGH に用いた。その結果から、個々の腫瘍内の検索したすべてのサンプルに見られた変化を（上記のように）stemline 変化と定義し、進展の時間経過とともに、それらに更に変化（sideline 変化）が付加していったプロセスを、多数のサンプルの結果から症例ごとに再構築した。また、検出された変化の中から early events と late events を抽出した（Peng et al., in press）。

stemline 変化としてよく見られたのが、8p+、8q+、17p-であった。E カドヘリンのある 16q- もかなり高頻度に見られた。E-カドヘリンは主としてメチル化によって silencing が起こると考えられているが、私たちの結果はゲノムの loss も伴っていることが少なくないことを示している。同様の多数箇所からのサンプリングを食道癌で行い、p16 のプロモータ領域のメチル化と p16 のある 9p の LOH を調べたところ、メチル化による silencing は病変のほぼ全体に起こっていたが、LOH はその内の一部に起こっているだけであった。LOH はメチル化による silencing が起きた後からでも追いつち的に生じてくることが明らかになった（Tokugawa et al, 2002）。同様のことが、E カドヘリンのある 16q でも起こっているものと考えられる。

次に組織形態との関連を見た。サンプルごとに印環細胞癌と低分化腺癌とを比較すると、高頻度でかつしばしば stemline に見られた 7q、8p、8q、17p の変化は驚くほど一致していたが、20q と Xp、Xq の gain は低分化腺癌で増加していた。このことから、印環細胞癌と低分化腺癌は共通の遺伝子異常によって生じ、共通の lineage に属していること、そして印環細胞癌に更に変化が加わって低分化腺癌になると考えられた。

進行癌の early events が早期癌の変化とどのくらい重なるのかを検討するために早期癌と進行癌で比較すると、これも stemline でよくみられた 8p、8q、17p の変化が両者で共通していたことから、多くの進行癌は早期癌に由来することが分かった。一方、18q の loss、7p と 15q の

gain が進行癌で有意に多く、逆に 4q loss は早期癌に多い傾向があった。これらが早期から進行期への進展に関与していることが推定された。

このように microdissection によって未分化型胃癌でさえ CGH 解析ができるようになり、多数箇所のサンプリングによって、その進展や組織像の変化を染色体異常と関連づけて理解できるようになって来た。そのさい、染色体変化の腫瘍内多様性について信頼性の高いデータを得るためには、stemline すなわちサンプル間で共通の変化に注目し、その G/R 比の shift size から各サンプルでの間質のコンタミネーションの程度を常にモニターし、それがサンプル間でそろっていることを確認した上で、サンプル間の違いに言及すべきであることが分かった。

今後の研究の展開

- CGH では nick translation による標識が標準的に用いられているが、その場合、近 4 倍体腫瘍での 1 コピーの染色体減少を検出することが困難である。これを検出するために、標識方法を再検討する必要がある。
- lineage 解析のツールとして CGH を捉えなおし、個々の腫瘍の組織像の variation だけでなく、今後は腫瘍の分類上の組織型がどの程度 lineage (genetic pathway) から異なっているのかを明らかにしていきたい。従来から用いられている胃の分化型、未分化型の分類についても、両者は胃癌として共通の lineage に属し分化度が異なるだけなのか、根本的に lineage (genetic pathway) から異なるのかについて、決着をつけるためには、マーカー遺伝子によるスポット的な解析でなく、本研究のような網羅的方法が必要である。
- 今回の研究では十分達成できなかった点に胃癌のプロイディ解析がある。染色体解析は構造やコピー数の異常だけでなく、染色体総数の情報が加わってはじめて完結する。今後、これまで行ってきた胃癌症例で ploidy 情報を追加し、解析を進めて行きたい。