

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460452

研究課題名(和文) MLPAとFISHを用いたヒト固形癌における遺伝子増幅の網羅的研究

研究課題名(英文) Semi-comprehensive analysis of gene amplification in solid carcinomas using MLPA and FISH

研究代表者

大井 章史(Ooi, Akishi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50160411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子増幅は正常細胞が癌化する主な原因のひとつであり癌遺伝子増幅を知ることは分子標的治療を行う上で重要である。本研究では、日本人で頻度の高い胃癌、大腸癌、乳癌における46遺伝子についてmultiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)とfluorescence in situ hybridization を使って検索した結果、受容体チロシンキナーゼ遺伝子(ERBB2, FGFR1, FGFR2, EGFR, MET) 細胞増殖のG1-S制御遺伝子(CCNE1, CCND1, CDK6)、MYC, MDM2の増幅が見られた。

研究成果の概要(英文)：Gene amplification is a major type of genetic aberration found in human cancers of solid types. The amplified genes so far have been useful targets or will be potential targets for molecular therapies. In this study, cancers of the stomach, breast and colon, which are frequent among Japanese, were examined for amplification of 46 genes by multiplex ligation-dependent probe amplification followed by fluorescence in situ hybridization. The results showed that the genes coding receptor tyrosine kinases (ERBB2, FGFR1, FGFR2, EGFR, MET), regulatory genes of cell cycle progression (CCNE1, CCND1, CDK6, MDM2), and gene coding a transcription factor (MYC) were found frequently amplified in these tumors.

In conclusion, combination of MLPA and FISH analysis is a feasible approach for obtaining the semi-comprehensive genetic information that is necessary for personalized molecular targeted therapy.

研究分野：人体病理学

キーワード：遺伝子増幅 MLPA FISH 分子標的療法 胃癌 乳癌 大腸癌 脂肪肉腫

## 1. 研究開始当初の背景

癌原遺伝子が癌遺伝子に変わる主な機構として、突然変異、染色体転座、そして遺伝子増幅が知られている。遺伝子増幅が癌化に密接に関係している例として、乳癌における *ERBB2*, *CCND1*, *MYC*, *MDM2*, *TOP2A*, 大腸癌における *ERBB2*, *EGFR*, 胃癌における *ERBB2*, *FGFR2*, *MYC*, 脂肪肉腫における *MDM2*, *CDK4*, 神経芽腫における *N-MYC* 等が知られているが、他に多くの候補遺伝子が有る。これらの増幅遺伝子産物にたいする分子標的療法が導入され、あるいは臨床応用が検討されるにあたり、これらの遺伝子増幅の各種腫瘍における頻度、腫瘍内における均一性の有無、細胞内の同時増幅の有無を知ること、またこれらを簡便に知る方法の開発が焦眉の急であった。

遺伝子増幅の gold standard とされるのが fluorescence in situ hybridization (FISH) であり、組織切片上で、個々の細胞の遺伝子コピー数を直接知る方法である。標識蛍光を変えることにより、異なる遺伝子の増幅を同時に見ることが可能である。また、高度の遺伝子増幅をきたす染色体変化には、均一染色体領域 homogeneous staining region (HSR), 二重微小染色体対 double minute chromosomes (DMs) が知られており、分裂間期核を用いた FISH の像からこれらを推定することは可能である。

また、遺伝子のコピー数を簡便に検出できる方法として注目されたのが multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) であった。MLPA はホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出した DNA を用いて、polymerase chain reaction を使って、一度に多数の遺伝子増幅を検出できる方法である。例えば、乳癌の遺伝子増幅検索キット (SALSA MLPA P078-B1 Breast Tumour probemix, MRC-Holland) では、50 以上の検体について、39 の genomic sequences のコピー数が解析でき、10 個の遺伝子の増幅が一回の反応で検出できる方法である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒトの各種固形癌 (乳癌、胃癌、大腸癌、脂肪肉腫) で増幅が報告されている数十個の候補遺伝子の中から multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) を用いて、スクリーニングし、次に fluorescence in situ hybridization (FISH) をもちいて、これらの遺伝子の増幅の程度と増幅形態、同時増幅の有無を細胞単位、アンブリコン単位で解明する。これによって、増幅遺伝子を標的とする治療の有効性を評価する。また、in situ で個々の癌細胞の遺伝子変化を知ることによって、癌の clonality を明らかにして固形癌の進展の過程を追跡する。

## 3. 研究の方法

金沢大学附属病院で手術された乳癌、胃癌、大腸癌について、ホルマリン固定・パラフィン包埋組織から DNA を抽出し MLPA を行い、'amplification' および 'gain' とされた症例では、FISH 用いて増幅の有無を確認した。同時増幅の見られた遺伝子については、2 色 FISH をおこなった。新鮮材料の得られた症例では、捺印細胞標本を作製し、さらに高精度の FISH を施行した。また、脂肪肉腫については、MLPA を行わずに、免疫染色のみで症例をスクリーニングした。

### (1) 免疫染色

*ERBB2*, *EGFR* の遺伝子増幅に関しては、免疫染色によるスクリーニングが有効であることが確立しているため、ホルマリン固定パラフィン包埋組織を使った免疫染色を乳癌、胃癌、大腸癌全例について行った。また脂肪肉腫については、*MDM2* の発現を免疫染色でしらべた。免疫染色 2+ 及び 3+ については FISH で増幅を確認した。

抗体: 抗 *ERBB2* 抗体 (Nichirei, 100 倍希釈); 抗 *EGFR* 抗体 (Novocastra, 20 倍希釈); 抗 *MDM2* 抗体 (Calbiochem, 40 倍希釈)

### (2) Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

ホルマリン固定パラフィン包埋組織から DNA を抽出した。トレミングは HE 染色を施した連続切片を参考に可及的に癌細胞のみを選択して行った。

反応は MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands) より「以下の 5 種類の検出キットを購入して行った。

A. SALSA MLPA KIT P078-B1 Breast Tumour™: このプローブセットには、*ESR1*, *EFDR*, *ZNF03*, *FGFR1*, *ADAM9*, *IKBKB*, *PRDM14*, *MTDH*, *MYC*, *CCND1*, *CIORF30*, *CHD1*, *ERBB2*, *TOP2A*, *MAPT*, *BIRC5*, *CCNE1*, *AURKA* に対するプローブが含まれる。

B. SALSA MLPA probemix P078-C1 Breast Tumour™: このプローブセットは、とほほ同様であるが新たに *ZNF703* と *PPM1D* プローブが加わり、*TRAF4* が除かれた。

C. SALSA MLPA probemix P175-A2 Tumour-Gain™: このプローブセットには、*MDM4*, *MYCN-ALK*, *PDGFRA*, *KIT*, *KDR*, *DDHFR*, *EGFR*, *MET*, *SMO*, *BRAF*, *FGFR1*, *MYC*, *ABL1*, *RET*, *CCND1*, *CCND2*, *CDK4*, *MDM2*, *AURKB*, *ERBB2*, *TOP2A*, *AJRKAR* に対する 41 のプローブが含まれる。

D. SALSA MLPA KIT P231-A2 FGF10-FGFR2™: *FGFR2* と *FGF10* に対する検出キットである。

E. SALSA MLPA probemix P458-B1 Gastric cancer™: 胃癌に増幅の多くみられる 16 遺伝子 (*PIK3CA*, *EGFR*, *CDK6*, *MET*, *GATA4*, *FGFR1*, *MYC*, *PTP4A3*, *FGFR2*, *CCND1*, *KRAS*,



CCND1, CCNE1, CDK6 が分子標的として有力であることが示された。  
(表2) (論文は投稿中)

Table 3. Results of the MLPA analysis of 208 breast cancers

| Name of genes             | ESR1 | EGFR | ZNF703 | FGFR1 | ADAM9 | IKKB  | PRDM14 | MTDH  | MYC   | CCND1 | C11ORF30 |
|---------------------------|------|------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|----------|
| No. of 'amplified' tumors | 2    | 3    | 31     | 24    | 5     | 10    | 5      | 10    | 24    | 29    | 15       |
| No. of 'gain' tumors      | 9    | 18   | 101    | 30    | 21    | 32    | 45     | 58    | 70    | 52    | 11       |
| No. of 'normal' tumors    | 197  | 187  | 76     | 154   | 182   | 156   | 138    | 140   | 114   | 127   | 182      |
|                           | CDH1 | CPD  | MED1   | ERBB2 | CDC6  | TOP2A | MAPT   | PPM1D | BIRC5 | CCNE1 | AURKA    |
|                           | 1    | 3    | 17     | 27    | 3     | 1     | 1      | 6     | 3     | 1     | 1        |
|                           | 17   | 8    | 22     | 24    | 14    | 15    | 5      | 22    | 44    | 13    | 18       |
|                           | 190  | 197  | 169    | 157   | 191   | 192   | 202    | 180   | 161   | 194   | 189      |

### (2) 乳癌

外科手術された乳癌 208 例について MLPA キット (SALSA MLPA KIT P078-B1 Breast Tumour, SALSA MLPA probemix P078-C1 Breast tumour) を用いて遺伝子コピー数の解析をおこなった。(表3))FISH をもちいた解析は進行中である。

### (3) 大腸癌

大腸癌の肺転移巣 52 症例について MLPA キット (SALSA MLPA probemix P175-A2 Tumour-Gain) を用いて検索して、25 種類の遺伝子についてコピー数の解析を行った。(表4))FISH をもちいた解析は進行中である。

Table 4. Results of the MLPA analysis of 52 metastatic colon cancer of the lung

| Name of genes             | MYCN    | EGFR    | CCND1    | ERBB2    | MDM4    | ALK      | PDGFR   | MET      |
|---------------------------|---------|---------|----------|----------|---------|----------|---------|----------|
| Chromosomal locus of gene | 02p24.3 | 07p11.2 | 11q13.3  | 17q12    | 01q32.1 | 02p23.2  | 04q12   | 07q31.2  |
| No. of 'amplified' tumors | 0       | 4       | 0        | 2        | 0       | 0        | 0       | 0        |
| No. of 'gain' tumors      | 6       | 11      | 5        | 12       | 0       | 1        | 0       | 5        |
| No. of 'normal' tumors    | 46      | 36      | 47       | 38       | 52      | 51       | 52      | 47       |
|                           | SMO     | BRAF    | FGFR1    | ABL1     | RET     | CCND2    | AURKB   | TOP2A    |
|                           | 07q32.3 | 07q34   | 08p11.23 | 08q24.13 | 10q1.21 | 12p13.32 | 17p13.1 | 17q21.2  |
|                           | 0       | 0       | 2        | 0        | 0       | 4        | 0       | 0        |
|                           | 8       | 2       | 2        | 2        | 2       | 6        | 0       | 2        |
|                           | 44      | 50      | 48       | 50       | 50      | 42       | 52      | 50       |
|                           |         |         |          |          |         |          |         | 20q13.31 |
|                           |         |         |          |          |         |          |         | 0        |
|                           |         |         |          |          |         |          |         | 17       |
|                           |         |         |          |          |         |          |         | 35       |

### (4) 脂肪肉腫

当初の計画では、脂肪腫様腫瘍の遺伝子増幅を MLPA を用いて網羅的に検索する予定であったが、MDM2 と CDK4 以外の頻度の高い増幅遺伝子がないことが明らかになり、免疫染色と FISH を用いて両遺伝子の異常を検索した。

高分化型脂肪肉腫 48 例、脱分化型脂肪肉腫 5 例、悪性神経鞘腫 9 例中 2 例、粘液線維肉腫 10 例中 2 例に MDM2 遺伝子増幅を認めた。高分化型脂肪肉腫から得られた生検組織の診断に関して MDM2-FISH の所見が有効であることを実験的に証明した。(Int J Clin Pathol 2013)

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Ooi A. Oyama T, Nakamura R, Tajiri, Ikeda H, Fushida Y, Nakamura H, Dobashi Y. Semicomprehensive analysis of gene amplification in gastric cancers using multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence *in situ* hybridization. *Mod Pathol* 2015;28: 861-871. (査読あり)
2. Oyama T, Okamoto K, Nakamura R, Tajiri R, Ikeda H, Ninomiya I, Ooi A. Overexpression and gene amplification of both *ERBB2* and *EGFR* in an esophageal squamous cell carcinoma revealed by fluorescence *in situ* hybridization, multiplex ligation-dependent probe amplification and immunohistochemistry. *Pathol Int* 2015;65:608-13. (査読あり)  
*Pathol* 2014;45:725-734, 2014. (査読あり)
3. Tajiri R, Ooi A. Fujimura T, Dobashi Y, Oyama T, Nakamura R, Ikeda H. Intratumoral heterogeneous amplification of *ERBB2* and subclonal genetic diversity in gastric cancers revealed by multiple ligation-dependent probe amplification and fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Pathol* 2014;45:725-734, 2014. (査読あり)
4. Tajiri R, Inokuchi M, Sawada-Kitamura S, Kawashima H, Nakamura R, Oyama T, Dobashi Y, Ooi A. Clonal profiling of mixed lobular and ductal carcinoma revealed by multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence *in situ* hybridization. *Pathol Int* 2014;64:231-236. (査読あり)
5. Dobashi Y, Goto A, Endo T, Ooi A. Genetic aberrations as the targets of oncology research: Involvement of paraffin-embedded tissues. *Histol Histopathol* 2014;29:191-205. (査読あり)
6. Kimura H, Dobashi Y, Nojima T, Nakamura H, Yamamoto N, Tsuchiya H, Ikeda H, Sawada-Kitamura S, Oyama T, Ooi A. Utility of fluorescence *in situ* hybridization to detect *MDM2* amplification in liposarcomas and their morphological mimics. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6:1306-16. (査読あり)

〔学会発表〕(計 27 件)

1. 大井章史、尾山武、中村律子、田尻亮輔。池田博子、土橋洋。MLPAとFISHを用いた、進行胃癌の遺伝子増幅の準網羅的検索。第104回日本病理学会総会 2015/4/30-5/1, 5/2 名古屋国際会議場

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

大井 章史(Ooi,Akishi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：5 0 1 6 0 4 1 1