

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590342
 研究課題名（和文） 固形癌における Myc の増幅、特に受容体型チロシンキナーゼ遺伝子との同時増幅の解析
 研究課題名（英文） Gene Amplification of MYC and its coamplification with genes coding receptor tyrosine kinase in solid carcinomas.
 研究代表者
 大井 章史（001 AKISHI）
 金沢大学・医学系・教授
 研究者番号：50160411

研究成果の概要：胆嚢癌および乳癌について、DNA 転写物質をコードする *MYC*、容体型チロシンキナーゼをコードする *ERBB2*、*EGFR* の遺伝子の増幅を fluorescence *in situ* hybridization を用いて検索した。胆嚢癌では 97 例中 3 例に *MYC* の増幅があり、1 例で *ERBB2* と *EGFR*、1 例で *ERBB2* の同時増幅を認めた。乳癌では 91 例中 31 例に *MYC* の増幅がみられ、このうち 10 例に *ERBB2* の同時増幅をみとめた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子細胞病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：MYC、遺伝子増幅、受容体型チロシンキナーゼ、固形癌、FISH

1. 研究開始当初の背景

MYC 遺伝子は 8 番染色体短腕 (8q24) 上にあり、転写因子 MYC 蛋白をコードしている。MYC 蛋白は過剰発現すると、無制限の細胞増殖、分化の停止、遺伝子の不安定化、DNA 損傷因子に対する過剰反応等を引き起こし発癌に関与するとされている。MYC 蛋白の過剰発現の原因として、遺伝子増幅、染色体転座、突然変異、mRNA の半減期の延長などが知られ

ている。

最近のトランスジェニックマウスを使った研究では、皮膚、脾、リンパ球、肝、乳腺などに MYC を発現させると、それらの臓器に腫瘍を発生させることができ、さらに発現を停止させることによって癌化した細胞を休止期に導入できることが示されている。

(Review) (Cancer Res 2005; 65:4471-4474) (Shachaf and Felsner) このことは MYC が癌治療のよい

分子標的になることをしめしている。

サザンブロット、comparative genetic hybridization を用いた研究によって乳癌で *MYC* 遺伝子増幅が稀におこることが知られている。しかしながら、各種の固形癌について *MYC* 遺伝子の増幅と蛋白の過剰発現を包括的に調べた仕事はほとんど無い。一方、*ERBB2*, *EGFR*, *FGFR2* および *MET* 遺伝子 はそれぞれ染色体 17q12-q21, 7p12, 10q26, 7q31 に存在し、構造のよく似た受容体型チロシンキナーゼをコードしている。癌細胞ではしばしば *ERBB2*, *EGFR* の遺伝子増幅によって、これら受容体蛋白の過剰発現をきたし、無秩序な増殖がおこる。最近、遺伝子増幅によって過剰発現した *ERBB2* や *EGFR* 蛋白に対するモノクローナル抗体が開発され乳癌や大腸癌で臨床応用されている。

我々は研究当初から fluorescence in situ hybridization (FISH) 法の開発をてがけ、胃癌に始まって、乳腺、大腸、肺、胆道、食道の癌における *ERBB2*, *EGFR*, *MET*, *FGFR2* の遺伝子増幅と蛋白過剰発現の関係を明らかにしてきた (表 1 参照)。その過程で胃癌培養細胞株 SNU 16 と HSC 39 に *MYC* と *FGFR2* の同時遺伝子増幅があることを知り、胃癌から単離した細胞核を用いた FISH でも *MYC* と *ERBB2*, *MYC* と *MET* が同時増幅している症例を報告してきた (Hara, et al. 1998)。文献的には *MYC* と *ERBB2* の同時増幅は、乳癌で高頻度に観察され単独の増幅よりも予後が不良との報告がみられる (Al-Kuraya et al., 2004)。

2. 研究の目的

将来の *MYC* を対象とする分子標的療法の基礎的情報として、胆嚢癌および乳癌における *MYC* 遺伝子増幅と *MYC* 蛋白質の過剰発現の正確な頻度を知り、遺伝子増幅と蛋白過剰発現の関係を明らかにする。 *MYC* 研究の立ち遅れてきた原因のひとつは蛋白の半減期が 30 分と短く、免疫染色での検出が困難であったことである。本研究では免疫染色に加えて、Western blot を用いて蛋白過剰発現を検索し遺伝子増幅と蛋白過剰発現の関係を明らかにする。さらに *MYC* と *ERBB2* や *EGFR* との同時増幅の頻度、両者の相関、同時増幅のメカニズムをあきらかにする。我々はすでに、*MYC* と *ERBB2*, *MYC* と *EGFR* が胃癌では非偶発的に同時増幅していることを認めているが (Mod Pathol 2007, 20:622-31)、この現象がある種の固形癌に普遍的現象であるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

胆嚢癌

ホルマリン固定・パラフィン包埋され胆嚢癌 97 例について、免疫染色を用いて *MYC*, *ERBB2*, *EGFR* 蛋白の発現を検索する。FISH 法を用いて、*MYC*, *ERBB2*, *EGFR* 遺伝子の増幅をしらべる。複数の遺伝子の増幅が見られた症例では、標識蛍光色素のことなる DNA プローブをもちいた 2 色 FISH を行い。(i) 単一核における同時増殖か否か (ii) 単一核であれば、増幅コピー数や増幅の形態 (HSR or DM) について検討する。

乳癌

本学外科学教室と研究協力体制をとり、良質な臨床材料を用いて行った。すなわち新鮮材料を用いて Western blot 法を用いて *MYC* 蛋白の発現を検討し、免疫染色の結果と対比させた。

また、新鮮材料を用いて捺印標本作製し FISH をおこない *MYC* の増幅をみた。捺印細胞を用いた FISH では組織切片を用いた FISH と異なり、核の一部が切り取られる (nuclear truncation) ことが無く、癌細胞の核全体の観察が可能であった。ホルマリン固定・パラフィン包埋組織を用いた検索は胆嚢癌におけるものと同様に行った。

免疫染色：免疫染色に用いた抗体は、抗 *MYC* 抗体 (ポリクローナル、Santa Cruze, N-262; x30)、抗 *ERBB2* 抗体 (ポリクローナル、ニチレイ; x400)、抗 *EGFR* 抗体モノクローナル (internal domain 特異的、Novocastra) で pH7.0 クエン酸緩衝液、121°C、10 min 賦活化を行った。

Western blot: 凍結新鮮手術材料から tissue lysate を超音波組織破碎により調整し、上記の抗体を用いて Western blotting を行った。*MYC* 蛋白質に一致する 67Kd のバンドと β -アクトチンのバンド (42Kd) との比 (発現比) を求めた。*MYC* 増幅と発現の対照として胃癌由来培養細胞株 HSC39 を用いた。

FISH: 遺伝子特異的プローブ (*Myc*, P1-artificial chromosome clone RP1-80K22: *ERBB2*, bacterial artificial chromosomes RP11-62N23: *EGFR*, bacterial artificial chromosomes RP11-339F13) と各遺伝子の存在する染色体の中心節に特異的プローブ (VYSIS より購入) を用いた。単一遺伝子の増幅は各遺伝子と中心節のシグナル数を数え、*MYC* に関しては、その比 (遺伝子/中心節, 増幅比) >1.3 を増幅とし、*HER2* に関しては増幅費 >2.0 を cut off 値とした。複数遺伝子の同時増幅の検索は FISH プローブをニックトランスレーションによって、異なる蛍光色素 (SpectrumOrange™, SpectrumGreen™, SpectrumAqua™ のいずれか) で標識して用いた。

組織切片を用いた FISH の場合はカラー CCD カメラ (DP70) で記録、塗抹細胞を用いた FISH 像は白黒 CCD カメラ (Sensys) で記録し、それぞれパーソナルコンピュータに記録した。

4. 研究成果

胆嚢癌

MYC の増幅は 97 例中 3 例でみられた。このうち 1 例では、*MYC* と *ERBB2*, *MYC* と *EGFR* の同時増幅のある 2 種類の癌細胞が粘膜癌のことなる領域を占めているのが確認された。前者では十数個の増幅した遺伝子は 1-2 個の凝集を形成して見られ、後者では同じく増幅した遺伝子が核内にほぼ均等に分散してみられた。*MYC* と *ERBB2*, *MYC* と *EGFR* のシグナルに偶然と考えられる以上の重なりは見られず、増幅した遺伝子が同じ amplicon 上にある可能性は低いと考えられた。もう 1 例の症例では、*MYC* の凝集した増幅がみられたが、*ERBB2* や *EGFR* の増幅はみられなかった。残る 1 例では、*MYC* と *ERBB2* の同時増幅がみられたが、増幅遺伝子は 10 個以下であった。以上の結果は *MYC* の増幅による染色体不安定性が *ERBB2* あるいは *EGFR* の選択的な増幅をもたらす可能性を示唆した。

乳癌

研究期間中に 91 例の浸潤性乳管癌から新鮮材料を得ることができた。FISH の結果、増幅比 1.3 を cut-off 値とすると 91 例中 31 例 (34%) が *MYC* 遺伝子増幅陽性であった (*MYC* 増幅群)。その内訳は増幅比 5.0 以上は 3 例、2.0-5.0 が 7 例、1.3-2.0 が 21 例で、実際のコピー数を見ると、31 例のうち 15 例 (48.3%) では、染色体 8 番の遺伝子数より 1 個もしくは 2 個 *MYC* 遺伝子数が増加する軽度遺伝子増幅であった。その他 34 例では、*MYC* 遺伝子が 3 から 9 個で、同数のセントロ

メア8が認められポリソミー8と考えられた(ポリソミー8群)。別の1例でMYC遺伝子の欠損が見られた。残り25例ではMYC遺伝子とセントロメア8に数的異常は認められなかった(MYC正常群)。

Western blotは61症例で評価が可能であった。24の乳癌でMYC蛋白質を示唆する68kDaにバンドが認められたが、正常乳腺組織ではMYCのバンドが見られなかった。MYCno 67kDaとbアクチンの42kDaのバンドの密度比(発現比)は2.9-0.9で、陽性コントロールHSC39の発現比は3.6であった。

FISHの結果とWBの結果を比較すると、MYC増幅群およびポリソミー8群では、MYC正常群に比べて有意にMYC蛋白質過剰発現の頻度が高かった($p=0.012$, $p=0.018$)。

HER2の遺伝子増幅は91例中19例(21%)に見られた。また、MYC遺伝子とHER2遺伝子の同時増幅を示したものは10例で、二つの遺伝子増幅の間には統計学的に相関は認められなかった。2色FISHでは10例全てで単一細胞内に同時増幅が認められたが、同じアプ리콘上での増幅を示す所見は得られなかった。

以上の結果から、塗抹標本を用いた2色FISHは簡便で、数個の過剰遺伝子を同時に検出できるのでMYC遺伝子の増幅を検討する最適な方法であると考えられた。乳癌におけるMYC遺伝子の増幅は、過剰遺伝子が数個のものも多く、我々が胃癌や胆嚢癌で報告したような数十個の増幅はみられなかった。MYC蛋白質過剰発現は、MYC遺伝子数増加と相関がみられたが、ERBB2に見られるような緊密な関係はみられなかった。このことはMYCの発現が遺伝子増幅以外の制御を受けていることを示唆した。MYCとHER2の2色FISHによって今回はじめて両遺伝子が単一の乳癌細胞に同時増幅していることを直接証明で

きた。

今後はMYC遺伝子とHER2遺伝子の同時増幅の見られた症例と、HER2遺伝子の単独増幅の症例でtrastuzumabを用いた分子標的療法の結果に違いがあるかprospective studyで明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Akishi Ooi, Shioto Suzuki, Kumiko Nakazawa, Jun Itakura, Issei Imoto, Hiroyuki Nakamura, Yoh Dobashi. Gene amplification of *Myc* and its coamplification with *ERBB2* and *EGFR* in gallbladder adenocarcinomas. *Anticancer Res*, 29:19-26, 2009, 査読有
- ② Dobashi Y, Suzuki S, Matsubara H, Kimura M, Endo S, Ooi A. Critical and diverse involvement of the Akt/mTOR signaling in human lung carcinomas. *Cancer*, 115: 107-118, 2009, 査読有

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：50160411

2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤村 隆 (HUJIMURA TAKASHI)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号：50262580

井口 雅史 (INOKUCHI MASASHI)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：90401918

土橋 洋 (DOBASHI YOH)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90231456

西村 元一 (NISHIMURA MOTOICHI)
金沢大学・附属病院・特任教授
研究者番号：90208215