

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860266

研究課題名(和文) 胃がんにおけるHER2発現の腫瘍内ヘテロ不均一性に対するDNAメチル化異常の意義

研究課題名(英文) Investigation of the significance of alteration in gene promoter methylations for the cause of intratumoral heterogeneity of the expression levels of HER2.

研究代表者

尾山 武 (Oyama, Takeru)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：00515314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト進行胃癌の手術検体から、同一腫瘍内においてHER2発現が陽性および陰性の領域を含む症例を選び出し、そのそれぞれの領域を含む切片からRNAを抽出しマイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、apoptosis関連遺伝子を含む少数の遺伝子に関しては、その両領域間で4倍以上の発現の差が観察された。その値の検証のためにreal-time RT-PCR法を行ったが、RNAの分解のため、再現性のある結果を得ることが困難であった。より再現性の高い結果を得るためにgenomic DNAを用いたSNP arrayを行い、上述の両領域間で互いに増幅の程度が異なるいくつかの遺伝子の候補を得た。

研究成果の概要(英文)：The tumors with intratumoral heterogeneity of HER2 protein were selected from the surgical specimens of HER2 positive advanced gastric cancer. Total RNA were isolated from both HER2 positive and HER2 negative area in a tumor. Whole genome comparative analyses using gene expression arrays of these RNA revealed that the expression levels of some gene including apoptosis associated genes were more than four times as high as those in the other area. The results of these gene expression levels were attempted to be validate by quantitative real-time RT-PCR, but failed to confirm the values of these gene expressions. This might be due to RNA degradation by aging of the tissues and/or formalin fixation. To acquire more reproducible data, Genome-Wide human SNP array analyses were performed on the genomic DNA from the two areas. These analyses revealed the difference in the gene copy number of some genes including a homeobox as were confirmed using fluorescence in situ hybridization.

研究分野：人体病理学

キーワード：CGH gastric cancer heterogeneity HER2

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍内ヘテロ不均一性 (intratumoral heterogeneity) は一つの固形腫瘍の内部で様々な形質もつ細胞集団が存在するものであり、具体的には一つの腫瘍組織内で、互いに異なる遺伝子の変異やタンパク発現を有する細胞集団として観察される。特に、乳癌においては HER2 遺伝子の発現や増幅の腫瘍内ヘテロ不均一性が、その分子標的治療薬であるトラスツズマブ投与に対する無病生存期間が有意に短いという報告あり、分子標的治療薬に対する治療抵抗性の原因の一つとして考えられる。腫瘍内ヘテロ不均一性が生じる原因の一つとして考えられるのは、癌幹細胞仮説によれば、分化類似の形質を示す cancer stem cell、progenitor cells などの各段階の癌細胞が腫瘍内ヘテロ不均一性を生み出している可能性があり、さらにそれらは遺伝的には均一なためエピジェネティックな変化であると考えられる。腫瘍内ヘテロ不均一性を生じるメカニズムには、それに関連する遺伝子を含めて不明なことが多い。

## 2. 研究の目的

(1) 胃がんで観察される HER2 (ErbB2/neu) の発現に対する腫瘍内 (ヘテロ) 不均一性の原因として、これまで報告されている遺伝子変異の他に、後成的な遺伝子機能変化であるエピジェネティクス機構が関与する可能性を、特に腫瘍内の HER2 陽性および陰性部分での遺伝子プロモータ領域における DNA メチル化状態の相違を解析することにより、検討する。続いて HER2 関連遺伝子、既知の胃癌関連遺伝子に対しても同様に、腫瘍内の HER2 陽性および陰性部分に対して DNA メチル化異常の相違や遺伝子増幅などの遺伝子変異の状態を検索する。

(2) DNA メチル化異常が、HER2 の分子標的治療薬であるトラスツズマブ適応の病理学的判定時における腫瘍内 (ヘテロ) 不均一性の評価の一つとして利用できる可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

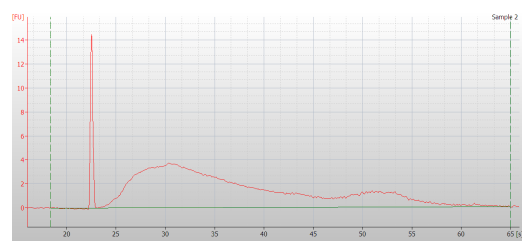
(1) ヒト胃癌の手術材料から HER2 発現の腫瘍内 (ヘテロ) 不均一性を示す検体の収集を行い、それらの HER2 陽性、HER2 陰性部分からレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) 法により組織片を採取し、HER2 の DNA メチル化異常の程度や部位に対する情報を得る。

(2) HER2 関連遺伝子、胃癌の既知遺伝子に対しても HER2 陽性、陰性部分の DNA メチル化状態を検索する。次いで HER2 陽性、陰性部に対して胃癌に関連した既知の遺伝子変異の解析も行う。さらに HER2 陽性、陰性部に対してマイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現の解析を行う。

(3) 胃癌における (ヘテロ) 不均一性を DNA メチル化異常の程度などにより分類し、トラスツズマブの治療後の患者に対して予後等について検索する。

## 4. 研究成果

本学附属病院すでに行われていたあるいは行われた進行胃癌の手術検体に対して、その臨床医学的・病理学的な情報に偏りが無いように十分な数のパラフィンブロックを入手した。これらの症例のうち抗 HER2 抗体に陽性のものを選び出し、さらに腫瘍内 (ヘテロ) 不均一性を示すものを 20 例選び出した。それぞれの検体から HER2 タンパク発現陽性領域と陰性領域に対し、Laser captured microdissection (LCM) 法を用いて、あるいはトリミングにより、間質細胞の混入が出来るだけ少なくなるように腫瘍細胞塊を選別し、それらからゲノム DNA、total RNA を抽出した。得られた DNA および RNA は、Agilent Technologies 社の 2100 バイオアナライザーにて分解の程度や量を測定した。(図 1)



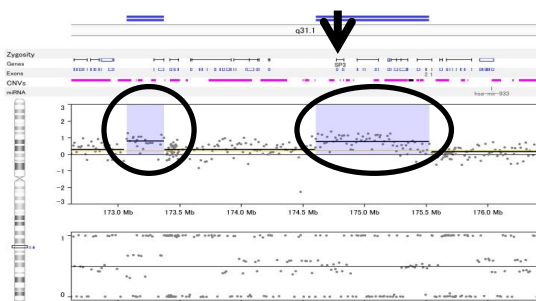
解析の結果、ホルマリン固定パラフィン包埋

図 1 FFPE 検体から得られた RNA の  
2100 バイオアナライザーによる解析

(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded: FFPE) 検体から得られた組織において RNA はかなり分解が進んでいた。

当初の計画では、HER2 陽性進行胃癌における HER2 陽性領域および HER2 陰性領域で HER2 およびその関連遺伝子のプロモータ領域における DNA メチル化の状態を methylation specific pcr (MSP) 法により比較し、さらにそれが mRNA 発現の差およびタンパク発現の差となることを確認する予定であったが、計画書の最後の方に書いてある HER2 陽性進行胃癌における HER2 陽性領域および HER2 陰性領域での mRNA の発現の差をマイクロアレイにより網羅的に比較を行い、そこで 10 倍以上の差が確認された遺伝子に対してプロモータ領域における DNA メチル化の状態の差を比較することを試みた。なぜなら、DNA メチル化の状態に変化があった遺伝子が、必ずしもその発現に関与しない可能性があるからである。さらに、これまで胃癌での報告がない遺伝子を含め網羅的な遺伝子解析が可能であることも実験を進める上で有利であると考えた。

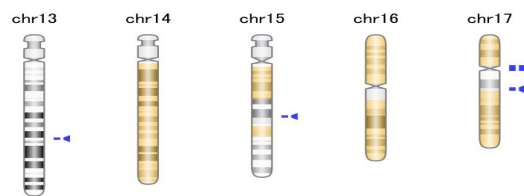
マイクロアレイは本学遺伝子実験施設において、Agilent Technologies社のマイクロアレイを用いて HER2 陽性領域および HER2 陰性領域から得られた mRNA 使い試みたが、FFPE 材料では RNA の分解が進んでいるため蛍光標識のラベリングが困難であった。そのため、FFPE 材料に対するマイクロアレイを株式会社東レに受託し、3Dgene という解析を行うことが出来た。その結果、両部分において多くの遺伝子発現は 3 倍以内であったが、ある apoptosis 関連遺伝子などでは 4 倍以上の発現の差が見られた。マイクロアレイにて HER2 陽性領域および HER2 陰性領域で発現の差があったものに対して real time RT-PCR などにより確認を行ったが、その結果にばらつきが見られた。そこで FFPE からの mRNA ではなく、genomic DNA を用いると解析結果が安定すると考え、Comparative genomic hybridization 法を用いて HER2 陽性領域および HER2 陰性領域のゲノムを比較した。り、両領域間の遺伝子増幅や遺伝子の欠失などの情報を得ることが出来た。(図 2)



(図 2) 胃癌の 2 番染色体上で遺伝子増幅が示唆された領域 (丸印) およびそこに含まれる遺伝子 (矢印)

HER2 陽性領域および HER2 陰性領域間での遺伝子増幅の程度が大きく異なる遺伝子は全ゲノム中においてもわずかな数であった。(図 3)。

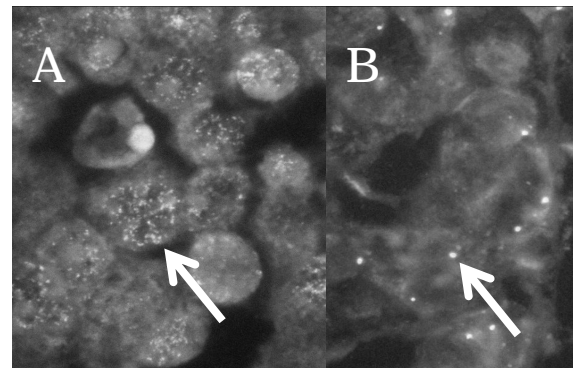
それらの中には、これまで胃癌関連遺伝子としてすでに多くの報告がなされているものも含まれていたが、報告が見当たらないものも見られた。



(図 3) OncoScan による遺伝子増幅の概観

のも見られた。

今後の課題としては、これまでに胃癌で遺伝子の過剰発現が報告されていないものに対して、120 例程度の他の胃癌検体での遺伝子増幅を Fluorescence in situ Hybridization (FISH) 法、Real-time quantitative PCR 法にて検索する。(図 4)



A: FISH 法により遺伝子増幅が確認された症例  
B: 増幅が認められない症例

(図 4) 胃癌における HER2 遺伝子の FISH

さらにその遺伝子発現の頻度、そのプロモーターにおける DNA メチル化の程度との相関に関する検討を行う。以上の結果をまとめ、国際的な学術雑誌への投稿を予定している。

## 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 3 件)

Ooi A, Oyama T, Nakamura R, Tajiri R, Ikeda H, Fushida Y, Nakamura H, Dobashi Y.

Semi-comprehensive analysis of gene amplification in gastric cancers using multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization.

Modern Pathology, 査読有, in press

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. Pathology International, 査読有, 64 (5): 231-6, 2014.

DOI: 10.1111/pin.12158.

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. *Human Pathology*, 査読あり, 45(4):725-34, 2014  
DOI: 10.1016/j.humphath.2013.11.004.

〔学会発表〕(計 6 件)

尾山 武、中村 律子、田尻 亮輔、大井 章史  
アレイ C G H 法による癌関連遺伝子発現の腫瘍内ヘテロ不均一性を示す部分間におけるゲノムコピー数異常解析  
第 73 回日本癌学会学術総会 2014/9/26、  
パシフィコ横浜、横浜

大井 章史、田尻 亮輔、中村 律子、尾山 武、池田 博子、土橋 洋。  
MLPAとFISHを用いた胃癌における増幅遺伝子の準網羅的検索  
第 73 回日本癌学会学術総会 2014/9/26、  
パシフィコ横浜、横浜

田尻 亮輔、尾山 武、中村 律子、大井 章史  
FISH 法を用いた膀胱尿路上皮癌における *CCND1* 遺伝子増幅の検索  
第 73 回日本癌学会学術総会 2014/9/26、  
パシフィコ横浜、横浜

大井 章史、田尻 亮輔、中村 律子、尾山 武、池田博子、土橋 洋  
Multiple ligation-dependent probe amplificationとFISHを用いた胃癌における遺伝子増幅の準網羅的検索。  
第 103 回日本病理学会総会 2014/4/24、  
広島国際会議場、広島

尾山 武、中村 律子、田尻 良輔、大井 章史  
ヒト胃癌における癌関連遺伝子発現の腫瘍内不均一性を示す部分間における遺伝子発現の相違。  
第 103 回日本病理学会総会 2014/4/25、  
広島国際会議場、広島

中村 律子、尾山 武、田尻 良輔、大井 章史  
腎癌における分泌型タンパク *Neil1/2* の発現機能解析  
第 103 回日本病理学会総会 2014/4/25、  
広島国際会議場、広島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
尾山 武 (Oyama Takeru)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号：00515314