

令和元年5月21日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08686

研究課題名(和文)胃癌におけるCCND1, CCNE1及びCDK6 遺伝子増幅の検索

研究課題名(英文) Analysis of gene amplifications of CCND1, CCNE1, and CDK6 in gastric cancers.

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：増幅遺伝子はしばしば分子標的の対象となる。本研究では、胃癌及び乳癌において、遺伝子増幅の報告のあるそれぞれ16遺伝子、22遺伝子についてmultiple ligation-dependent probe amplification と fluorescence in situ hybridizationを用いて増幅を検索した。胃癌ではCCNE1, CCND1、CDK4 遺伝子とERBB2, EGFR, KRAS遺伝子との同時増幅が高頻度にみられた。また乳癌では8p11-12、11q11.3 と 17q12-21上で複数の遺伝子増幅がおこっており、8p11 と 11q13上の遺伝子の同時増幅がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固形癌において増幅遺伝子はしばしば分子標的の対象となる。本研究では胃癌、乳癌において標的候補遺伝子の出現頻度と分布を明らかにし、創薬開発に貢献できた。また、分子標的療法を考えると、複数の遺伝子増幅が単一腫瘍細胞でおこっていることを念頭に入れることを喚起した。さらに、multiplex ligation-dependent probe amplification は比較的安価で網羅的に遺伝子増幅を知る手段であること、一方、fluorescence in situ hybridization は組織切片に適用することによって癌の'進化'の過程を終える手段であることを証明できた。

研究成果の概要(英文)：In solid cancers amplified genes are potential targets of molecular therapies. In this study the 16 genes and 22 genes reportedly amplified in gastric and mammary cancers were examined by multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization. In gastric cancers amplification of G1-S regulatory genes (CCNE1, CCND1 and CDK6) were co-amplified with ERBB2, EGFR and/or KRAS in single cancer nuclei. In breast cancers The frequencies of the amplification of four regions containing known driver oncogenes were as follows: 8p11 (ZNF703, FGFR1, ADAM9 and IKBKB), 8q24 (MYC), 11q13 (CCND1, C11ORF30), and 17q11-21 (CPD, MED1, ERBB2, CDC6, TOP2A, MAPT) exhibited amplification in 9.6%, 9.6%, 12.4%, and 12.1% of the tumors, respectively. Co-localization of the amplicon on 8p11 and the amplicon on 11q13 in single cells was frequently observed. Precise and feasible analysis of gene amplification status can be obtained using a combination of MLPA and FISH.

研究分野：人体病理学

キーワード：胃癌 乳癌 遺伝子増幅 MLPA FISH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、(1)突然変異、(2)染色体転座、そして(3)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*, *FGFR1*, *CCND1*, *MYC*, *TOP2A*, 大腸癌における *ERBB2*, *EGFR*, 胃癌における *ERBB2*, *FGFR2*, *MET*, *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、他にも多くの遺伝子増幅が有ると考えられる。中でも、乳癌、胃癌における *ERBB2* や、大腸癌における *EGFR* など受容体チロシンキナーゼ遺伝子は分子標的治療の対象として臨床的にも重要になってきている。

いまなぜサイクリン遺伝子か

最近の、single nucleotide polymorphism (SNP)や高解像の oligonucleotide array comparative genomic hybridization を用いた、胃癌の包括的遺伝子数解析では、receptor tyrosine kinase に属する (*ERBB2*, *EGFR*, *MET*, *FGFR2*) と同様に、cyclin E 遺伝子 (*CCNE1*), cyclin D1 遺伝子 (*CCND1*), cyclin-dependent kinase 6 遺伝子 (*CDK6*) の高頻度増幅が報告されている。[1-3]これらの細胞周期を調節する遺伝子の増幅は *ERBB2* 遺伝子増幅と相関するという報告があり[4-7]、さらに *ERBB2* 蛋白(HER2)に対するモノクローナル抗体 trastuzumab に対する反応を減弱させる可能性があるという報告もある。[6]。これらの Cell cycle mediator genes の増幅は胃癌の発生、進展及びその治療を考える上で重要な現象であることが明らかになりつつある。

1. Deng, N., et al., Gut, 2012. **61**(5): p. 673-84. 2. Rossi, E., et al., Hum Pathol. **42**(12): p. 1937-45. 3. Cancer Genome Atlas Research, Network, Nature, 2014. **507**(7492): p. 315-22. 4. Bizari, L., et al., Cancer Genet Cytogenet, 2006. **165**(1): p. 41-50. 5. Lee, J.Y., et al., Sci Rep, 2015. **5**: p. 9289. 6. Kim, J., et al., J Clin Invest, 2014. **124**(12): p. 5145-58.

2. 研究の目的

正常細胞では、Cyclin D1 及び Cyclin E は細胞増殖の G1 期に細胞内で産生され、Cyclin D1 は cyclin-dependent kinase (CDK4) あるいは CDK6 と、Cyclin E は CDK2 と特異的に結合して、これを活性化し細胞を S 期に導いた後、すみやかに分解される。ある種の癌細胞では、遺伝子増幅によるこれらの単独過剰発現が、無秩序な細胞増殖をおこすことが明らかになってきた。本研究では、multiplex ligation-dependent probe amplification を用いて、これら 3 遺伝子を含む 16 遺伝子の増幅を選別し、さらに fluorescence in situ hybridization を用いてこれらの遺伝子増幅を組織切片上で再構築することによって、これら遺伝子の胃癌の発生、進展、分子標的療法における重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

金沢大学附属病院・外科手術された胃癌 179 例について、ホルマリン固定・パラフィン包埋組織から DNA を抽出し MLPA を行う。遺伝子増幅の見られた症例では、対応する FISH プローブを用いて、個々の細胞レベルで組織像と比較できる精度の FISH を行う。*Cyclin D, E, CDK4* と同時増幅の見られた遺伝子については、2色 FISH をおこなう。*Cyclin D, E* および *CDK6* の蛋白の過剰発現を免疫染色で検出する。遺伝子増幅のない cyclin E 過剰発現症例に関しては *hCDC4* のシーケンスを行い点突然変異の有無をみる。

本研究を遂行中に、乳癌では *CCND1* の遺伝子座のある染色体 11q11.3 と *ERBB2* の遺伝子座のある 17q12-21 さらに、11q11 と 8p11-12 の同時増幅があることが明らかになったため、研究対象を拡大した。外科切除された浸潤乳癌 420 例を用いて、乳癌で増幅の報告されている 20 の遺伝子について multiplex ligation-dependent probe amplification kit を用いてスクリーニングし、cut-off 値を超える症例について fluorescence in situ hybridization (FISH) を用いて増幅

の確認を行った。

4 . 研究成果

179 例の胃癌のうち、35 症例で、G1-S 期を制御する遺伝子 (CCNE1, CCND1, CDK4) の少なくとも一つの遺伝子増幅がみられた。2 色 FISH を用いた検討では、このうち 13 例で、これらの G1-S 期を制御する遺伝子と、受容体チロシンキナーゼとシグナル伝達物質をコードする遺伝子 (ERBB2, EGFR, KRAS) のいずれかとの同時増幅が見つかった。さらに、早期癌と進行癌の比較によって、G1-S 期を制御する遺伝子の増幅は受容体チロシンキナーゼとシグナル伝達物質をコードする遺伝子の増幅に先行することが明らかになった。

浸潤性乳癌 420 例中 65 例 (15%) に、ERBB2 単独、もしくは ERBB2 と 17q12-21 領域にある遺伝子 (MED1, CDC6, TOP2A, MAPT1) との同時増幅がみられた。8p11 上の ZNF703, FGFR1, ADAM9, IKKB のいずれかの増幅は 31 例、11q13 上の CCND1 や C11ORF30, 8q24 上の MYC の増幅はそれぞれ、51, 41 例にみられ、ESR 1 の増幅は 3 例にみられた。また、上記の遺伝子の増幅が、さまざまな組み合わせで、癌細胞の同一核内、あるいは同一アンプリコン上でみられた。

MLPA と FISH による遺伝子増幅の解析はホルマリン固定パラフィン包埋切片から、アンプリコンの詳細な構成を知る有力な方法であると結論される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Ooi A, Inokuchi M, Horike S, Kawashima H, Ishikawa S, MD, Ikeda H, Nakamura R, Oyama T, Dobashi Y. Amplicons in breast cancers analyzed by multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization. Hum Pathol 85:33-43, 2019 doi: .org/10.1016/j.humpathol.2018.10.017 (査読有り)

Hum Pathol. 85:33-43, 2019. doi: 10.1016/j.humpath.2018.10.017. Epub 2018 Oct 30 (査読有り)

2. Ooi A and Oyama T. Detection of CCND1 gene copy number variations using multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization Methods Mol Biol. 2018;1726:101-109. doi: 10.1007/978-1-4939-7565-5_10. PMID: 29468547 (査読有り)

3. Dobashi Y, Tsubouchi H, Ninegishi K, Kitagawa M, Otani S, Ooi A. Regulation of p27 by ubiquitin ligases and its pathological significance in human lung carcinomas. Hum Pathol 66: 67-78, 2017. . doi: 10.1016/j.humpath.2017.05.022. Epub 2017 Jun 7. (査読有り)

4. Miyanaga S, Ojima E, Michiwa Y, Nakano T, Higashi K, Nishida H, Nishi K, Ooi A. A case of PYY-secreting neuroendocrine tumor of the rectum associated with severely increasing constipation. . AJSP: Reviews & Reports. 22:275-279, 2017 (査読有り)

5. Ooi A, Oyama T, Nakamura R, Tajiri R, Ikeda H, Fushida S, Dobashi Y. Gene amplification of CCNE1, CCND1 and CDK6 in gastric cancers detected by multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization. Hum Pathol. 61:58-67 2017. doi: 10.1016/j.humpath.2016.10.025. Epub 2016 Nov 15. (査読有り)

6. Ooi A. HER2 status examination of biopsy specimens from gastric mucosa. Letter to Editor J Gastroenterol Digest Dis 1 (1): 4 2016. (査読有り)

7. Goto A, Yoh Dobashi, Tsubochi H, Maeda D, Ooi A. MicroRNAs associated with increased AKT gene number in human lung carcinoma. Hum Pathol 56:1-10, 2016. Doi:10.1016/j.humpatol.2016.04011 (査読有り)

〔学会発表〕(計2件)

1. Ooi A, Inokuchi M, Nakamura R, Oyama T, Dobashi Y. Amplicons in breast cancers analyzed by multiplex ligation-dependent gene amplification and fluorescence in situ hybridization. 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama, Sep 27-29, 2018. Osaka.
2. 大井章史、中村律子、尾山武、池田博子、土橋洋. MLPAとFISHを用いた乳癌における遺伝子増幅の準網羅的検索. 第106回日本病理学会総会
2017年4月27-29日、京王プラザ

〔図書〕(計1件)

大井章史 退任記念業績集 「ある病理医の絵日記」 金沢大学医薬保健研究域医学系 分子細胞病理学講座 74頁 田中昭文堂 2019年3月

〔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：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。