

広大科研

19

17390104

0100453492

SAGE法で抽出した新規胃がん特異遺伝子の機能解析と
診断・治療への展開

(研究課題番号 : 17390104)

平成17年度～平成18年度 科学研究費補助金
基盤研究 (B) 研究成果報告書

広島大学図書

0100453492



平成19年3月

研究代表者 安 井 弥

広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授

平成17年度～平成18年度 科学研究費補助金
は し が き

研究課題

SAGE法で抽出した新規胃がん特異遺伝子の機能解析と診断・治療への展開

課題番号：17390104

研究種目：基盤研究（B）

研究組織

研究代表者：安井 弥（広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授）

研究分担者：中山宏文（広島大学大学院医歯薬学総合研究科助教授）

大上直秀（広島大学大学院医歯薬学総合研究科助手）

倉岡和矢（広島大学大学院医歯薬学総合研究科助手）

（平成18年3月31日まで：国立病院機構呉医療センターへの転出による）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	7,900,000	0	7,900,000
平成18年度	6,600,000	0	6,600,000
総計	14,500,000	0	14,500,000

研究発表

(1) 学会誌等

Matsumura S, Oue N, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, Imai K, Nakachi K, Matsusaki K, Chayama K and Yasui W

A single nucleotide polymorphism of the MMP9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer.

J Cancer Res Clin Oncol 131:19-25, 2005

Mitani Y, Oue N, Hamai Y, Aung PP, Matsumura S, Nakayama H, Kamata N and Yasui W

Histone H3 acetylation is associated with reduced p21^{WAF1/CIP1} expression in gastric carcinoma

J Pathol 205:65-73, 2005

Kondo T, Oue N, Mitani Y, Kuniyasu H, Noguchi T, Kuraoka K, Nakayama H and Yasui W

Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the PINX1 gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma

Oncogene 24:157-164, 2005

Ito M, Tanaka S, Takata S, Oka S, Imagawa S, Ueda H, Egi Y, Kitadai Y, Yasui W, Yoshihara M, Haruma K and Chayama K

Morphological changes in human gastric tumours after eradication therapy of Helicobacter pylori in a short-term follow-up

Aliment Pharmacol Ther 21:559-566, 2005

Hamai Y, Matsumura S, Kuraoka K, Matsusaki K, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, Imai K, Nakachi K, Toge T and Yasui W

A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of EGF gene is associated with occurrence and malignant progression of gastric cancer

Pathobiol 72:133-138, 2005

Kitadai Y, Kodama M, Cho S, Kuroda T, Ochiiumi T, Kimura S, Tanaka S, Matsumura S, Yasui W and Chayama K

Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes

Int J Cancer 115:388-392, 2005

Kuraoka K, Matsumura S, Sanada Y, Kanachi K, Imai K, Eguchi H, Matsusaki K, Oue N, Nakayama H and Yasui W

A single nucleotide polymorphism in the extracellular domain of TRAIL receptor DR4 at nucleotide 626 in gastric cancer patients in Japan

Oncol Rep 14:465-470, 2005

Tahara E Jr, Tahara H, Kanno M, Naka K, Takeda Y, Matsuzaki T, Yamazaki R, Ishihara H, Yasui W, Barrett JC, Ide T and Tahara E

G1P3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in gastric cancers and inhibits mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cell line TMK-1 cell

Cancer Immunol Immunother 54:729-740, 2005

Ito R, Oue N, Yoshida K, Nakayama H, Nakachi K and Yasui W

Clinicopathological significance and prognostic influence of cadherin-17 expression in gastric cancer

Virchow Arch 447:717-722, 2005

Motoshita J, Oue N, Nakayama H, Kuraoka K, Aung PP, Taniyama K, Matsusaki K and Yasui W

DNA methylation profile in differentiated type gastric carcinoma with distinct mucin phenotypes

Cancer Sci 96:474-479, 2005

Oue N, Mitani Y, Aung PP, Sakakura C, Takeshima Y, Kaneko M, Noguchi T, Nakayama H and Yasui W

Expression and localization of RegIV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: RegIV expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma
J Pathol 207:185-198, 2005

Shutoh M, Oue N, Aung PP, Noguchi T, Kuraoka K, Nakayama H, Kawahara K and Yasui W
DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in gastric cancer: expression of retinoic acid receptor b, cellular retinol binding protein 1 and tazarotene-induced gene 1 is associated with DNA methylation
Cancer 104:1609-1619, 2005

Aung PP, Matsumura S, Kuraoka K, Kunimitsu K, Yoshida K, Matsusaki K, Nakayama H and Yasui W
No evidence of correlation between single nucleotide polymorphism of DNMT3B promoter and gastric cancer risk in Japanese population
Oncol Rep 14:1151-1154, 2005

Kose K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Chayama K
Somatic mutations of mitochondrial DNA in digestive tract cancers.
J Gastroenterol Hepatol 20:1679-1684, 2005

Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shuto M and Nakayama H
Molecular-pathological prognostic factor of gastric cancer: a review
Gastric Cancer 8:86-94, 2005

Oue N, Aung PP, Mitani Y, Kuniyasu H, Nakayama H and Yasui W
Genes involved in invasion and metastasis of gastric cancer identified by array-based hybridization and serial analysis of gene expression (Review article)
Oncology 69S1:17-22, 2005

Yoshida K, Hamai Y, Suzuki T, Oue N and Yasui W
DNA methylation of CHFR is not a predictor of the response to docetaxel and paclitaxel in advanced and recurrent gastric cancer
Anticancer Res 26:49-54, 2006

Aung PP, Mitani Y, Sanada Y, Nakayama H, Matsusaki K and Yasui W
Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas
Virchow Archiv 448:428-434, 2006

Oue N, Mitani Y, Motoshita J, Matsumura S, Yoshida K, Kuniyasu H, Nakayama H and Yasui W
Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer
Cancer 106:1250-1259, 2006

Aung PP, Oue N, Mitani Y, Nakayama H, Yoshida K, Noguchi T, Bosserhoff AK and Yasui W
Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer
Oncogene 25:2546-2557, 2006

Sanada Y, Oue N, Mitani Y, Yoshida K, Nakayama H and Yasui W
Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype
J Pathol 208:633-642, 2006

Kobayashi T, Hino S, Oue N, Asahara T, Zollo M, Yasui W and Kikuchi A
Glycogen synthase kinase-3 and H-prune regulate cell migration by modulating focal adhesions
Mol Cell Biol 26:898-911, 2006

Motoshita J, Nakayama H, Taniyama K, Matsusaki K and Yasui W
Molecular characteristics of differentiated-type gastric carcinoma with distinct mucin phenotype: LI-cadherin is associated with intestinal phenotype
Pathol Int 56:200-205, 2006

Nakayama H, Enzan E and Yasui W

Lack of pericryptal fibroblastic cells adjacent to intestinal epithelial metaplastic glands
Histopathol 48:610-612, 2006

Hamatani K, Eguchi H, Takahashi K, Koyama K, Mukai M, Ito R, Taga M, Yasui W and Nakachi K
Improved RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed,
paraffin-embedded tissue specimens

J Histochem Cytochem 54:773-780, 2006

Sasao S, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W and Chayama K

Clinicopathologic and genetic characteristics of gastric cancer in young male and female patients
Oncol Rep 16:11-15, 2006

Kose K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W and Chayama K

Nuclear and mitochondrial DNA microsatellite instability in gastrointestinal stromal tumors
Pathobiol 73:93-97, 2006

Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, Yasui W and Kikuchi A

Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and
invasion

Cancer Res 66:10439-10448, 2006

Yasui W, Sentani K, Motoshita J and Nakayama H

Molecular pathobiology of gastric cancer (review)

Scand J Surg 95:225-231, 2006

Matsumura S, Oue N, Mitani Y, Kitadai Y and Yasui W

DNA demethylation of vascular endothelial growth factor-C is associated with gene expression and its
possible involvement of lymphangiogenesis in gastric cancer

Int J Cancer 120:1689-1695, 2007

Mitani Y, Oue N, Matsumura S, Yoshida K, Noguchi T, Ito M, Tanaka S, Kuniyasu H, Kamata N and Yasui W

Reg IV is a serum biomarker for gastric cancer patients and predicts response to 5-fluorouracil-based
chemotherapy

Oncogene (in press) 2007 Jan 22; [Epub ahead of print]

(2) 口頭発表

1) 国際学会

Aung PP, Oue N, and Yasui W

Screening of cancer specific gene and identification of MIA as a cancer specific gene and prognostic indicator
in gastric cancer

The 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, California (USA),
April 16-20, 2005

Aung PP, Oue N, Mitani Y, Nakayama H and Yasui W

Identification of MIA as a cancer specific gene and prognostic indicator in gastric cancer

The 6th International Gastric Cancer Congress, Yokohama (Japan), May 4-7, 2005

Sanada Y, Oue N, Mitani Y, Aung PP, Yoshida K and Yasui W

Down-regulation of claudin-18 and its prognostic impact in gastric cancer

The 15th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar " Current Progress of Cancer
Chemotherapy", Hiroshima (Japan), October 30, 2005

Oue N, Suzuki T, Yoshida K and Yasui W

MAGE gene expression is correlated with resistance to taxan in gastric cancer
The 15th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar " Current Progress of Cancer
Chemotherapy", Hiroshima (Japan), October 30, 2005

Oue N, Mitani Y and Yasui W

Expression and localization of Reg IV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: Expression of Reg IV is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation of gastric adenocarcinoma, The 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington, D.C., April 1-5, 2006,

Yasui W

Systematic collection of tissue specimens and molecular pathological analysis of newly diagnosed solid cancers among Atomic-bomb survivors

The Second Nagasaki Symposium of International Consortium for Medical Care of Hibakusha and Radiation Life Science. **Symposium** "Studies on atomic bomb survivors and related issues", Nagasaki (Japan), July 26-27, 2006

Yasui W, Aung PP and Oue N

Systematic search for novel biomarker of gastric cancer through SAGE data analysis

The 4th International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis, **Symposium C** "Gastric Cancer", Honolulu, Hawaii (USA), August 24-26, 2006

Oue N, Kikuchi A and Yasui W

High expression of h-Prune in gastric cancer with gastric phenotype: expression of h-prune is associated with poor survival in gastric cancer

The 11th International Congress of Metastasis Research Society jointed with the 15th Annual Meeting of Japanese Association for Metastasis Research, Tokushima (Japan), September 3-6, 2006

Yasui W, Aung PP, Nakayama H and Oue N

Molecular pathogenesis of gastrointestinal neoplasia: Stomach

The XXVI International Congress of the International Academy of Pathology, Symposium SYM48 "Gastrointestinal Pathology: Molecular pathogenesis of gastrointestinal neoplasia ", Montréal (Canada), September 16-21, 2006

Oue N, Mitani Y, Kamata N and Yasui W

RegIV overexpression inhibits apoptosis

The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Cancer Stem Cell", Hiroshima (Japan), October 22, 2006

Kuniyasu H, Oue N, Sasahira T, Mitani Y, Ohmori H and Yasui W

Increased peritoneal metastasis of RegIV-transfected MKN28 gastric carcinoma cells

The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Cancer Stem Cell", Hiroshima (Japan), October 22, 2006

Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, Yasui W and Kikuchi A

Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion

The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Cancer Stem Cell", Hiroshima (Japan), October 22, 2006

2) シンポジウム他 (国内学会)

安井 弥、大上直秀、中山宏文

分子病理診断：ゲノム・形態・臨床の架け橋：ゲノム医療時代において分子病理診断が果たす役割
第94回日本病理学会総会、シンポジウム、4月14-16日、横浜、2005

大上直秀、Aung PP、三谷佳嗣、國安弘基、安井 弥

新規転移遺伝子：ヒト悪性腫瘍におけるRegIVの発現プロファイルー RegIVは大腸癌の転移、ステージと関連しているー

第14回日本がん転移学会総会、ワークショップ6、6月2-3日、大阪、2005

Aung PP、大上直秀、三谷佳嗣、安井 弥

マイクロアレイ・遺伝子診断：MIAは胃癌の新規予後因子である

第14回日本がん転移学会総会、ワークショップ3、6月2-3日、大阪、2005

三谷佳嗣、大上直秀、吉田和弘、国安弘基、鎌田伸之、安井 弥

薬剤感受性（3）：胃癌におけるRegIVの発現と5FU耐性との関連

第64回日本癌学会総会、ワークショップW17-3、9月14日-16日、札幌、2005

真田雄市、大上直秀、松村俊二、松崎圭祐、吉田和弘、中山宏文、安井 弥

発がん感受性関連遺伝子(SNPs)：胃癌におけるclaudin-18の発現低下およびプロモーター領域における新規SNPの同定

第64回日本癌学会総会、ワークショップW7-5、9月14日-16日、札幌、2005

Aung PP、大上直秀、三谷佳嗣、中山宏文、安井 弥

発現プロファイルによるがん診断：SAGEデータに基づく癌（胃癌）特異的遺伝子の網羅的解析

第64回日本癌学会総会、ワークショップW15-3、9月14日-16日、札幌、2005

大上直秀、国安弘基、三谷佳嗣、夏越祥次、瀬戸山徹郎、野口 剛、安井 弥

消化器癌の発生- 病理、分子生物、遺伝子の知見を臨床へ：RegIVは胃癌、大腸癌の新規血清腫瘍マーカーである

第16回日本消化器癌発生学会シンポジウム1、10月13-14日、鹿児島、2005

真田雄市、大上直秀、Aung PP、吉田和弘、安井 弥

消化器癌の転移形成- 病理、分子生物、遺伝子の異常と臨床応用-：Claudin-18は胃癌の新規予後因子である

第16回日本消化器癌発生学会シンポジウム2、10月13-14日、鹿児島、2005

安井 弥

がん関連遺伝子に関する最近の話題- 特にエピジェネティクスについて-

第135回広島細胞診研究会・平成18年度日本臨床細胞学会広島県支部細胞検査士会総会、特別講演、4月9日、広島、2006

安井 弥

胃癌のトランスクリプトームダイセクション - 探索と展開-

第17回日本消化器癌発生学会、レクチャー、9月15日、名古屋、2006

大上直秀、本下潤一、仙谷和弘、安井 弥

胃型胃癌、腸型胃癌：SAGE法で同定した胃癌関連遺伝子と胃型腸型形質との関連

第17回日本消化器癌発生学会、シンポジウム、9月15日、名古屋、2006

安井 弥

臨床腫瘍学の基礎知識：がんの科学的基盤- 病理学-

日本癌治療学会第12回教育セミナー、10月20日、東京、2006

(3) 出版物

Yasui W, Oue N, Kitadai Y and Nakayama H

Part 2: Recent advances in molecular pathobiology of gastric carcinoma

Diversity of Gastric Carcinoma: Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy, ed. By Kaiyo Takubo, Michio Kaminishi and Ken-ichi Mafune, Springer-Verlag, 2005, Tokyo, pp51-71, 2005

安井 弥

胃癌の遺伝子診断

松島綱治、酒井敏行、石川 昌、稲寺秀邦・編、予防医学事典、朝倉書店、東京、pp263-265, 2005

大上直秀、伊藤玲子、安井 弥

網羅的遺伝子・タンパク解析：SAGE(Serial analysis of gene expression)

門田守人、松浦成昭・編、肝転移のすべて、永井書店、大阪、pp147-152, 2005

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

研究成果

<研究目的>

胃癌は、減少してきているとは言え、世界で4番目に発生頻度が高く、死因では肺癌に次ぐものであり、その制圧は極めて重要な課題である。精力的な分子病理学的研究の結果、そこでみられる増殖因子受容体、細胞周期調節因子、細胞接着分子などの異常は、癌細胞の特性である増殖、浸潤、転移を規定しており、エピジェネティックな機構の関与から、癌を「遺伝子発現病」ととらえることの重要性が明らかになっている。膨大なゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどのデータが蓄積されるポストゲノムでは、新規技術とバイオインフォマティクスから得られる情報により、臨床・予防への貢献が社会から求められている。ゲノム医療時代を担う病理学では、組織検体における遺伝子・分子・形態情報の関連を明らかにし、治療に直結する診断に還元することがその責務である。

検索し得るすべての遺伝子を体系的に解析する網羅的遺伝子発現解析において、定量性・再現性に優れた SAGE (serial analysis of gene expression) 法は、未知遺伝子の解析も可能である。本法は、mRNA の poly A テールから最も近い CATG 配列の下流約 10 塩基 (タグ) を PCR で増幅後、シーケンスしてタグの出現頻度と種類を解析するものであり、タグに対応する遺伝子を特定し、その出現頻度を数えれば発現量を正確に知ることができる。現在、NCBI の web サイト SAGEmap には、約 250 種類の細胞/組織の SAGE ライブラリーが登録・公開されており、その遺伝子発現プロファイルとの比較が可能である。申請者らは、この方法で、5 種類の胃癌のトランスクリプトーム解析を行い、世界最大の胃癌 SAGE ライブラリーを完成した (GEO Accession no. GSE545 : SAGE Hiroshima Gastric Cancer Tissue)。そこから、COL1A1、CDH17、APOC1、COL1A2、YF13H12、CEACAM6、APOE、REGIV、FUS などが高頻度に胃癌で過剰発現し、そのいくつかは悪性度と相関することを見出した。本研究の目的は、胃癌と種々の正常臓器の SAGE ライブラリーの比較から新しい特異的発現遺伝子を抽出し、標的治療および予防を視野に入れた胃癌の診断系を確立することである。

そこで、まず、臓器障害性のない治療標的となることを考慮し、胃癌 SAGE ライブラリーと心臓、肺、肝臓等の生存に必須の正常臓器のライブラリーを比較し、胃癌特異的遺伝子の候補を抽出する。次に、定量的 RT-PCR などを用い、胃癌および正常組織における発現を確認するとともに、新規胃癌特異的遺伝子については、機能解析により、分泌の有無、増殖、アポトーシス、浸潤への影響を検討する。また、モノクローナル抗体を作成し、病理組織診断への導入の可能性を検討するとともに、分泌蛋白については、ELISA による血清診断系の構築を行う。さらに、癌の悪性度や薬剤反応性などの個性を診断し、その結果と病理組織像を対比するためには、上記において抽出した癌特異的遺伝子の候補に加えて、癌の発生や薬剤感受性に関連する既知遺伝子を含むカスタムオリゴDNA アレイを作成する。尚、胃癌 SAGE ライブラリーは申請者ら以外では、2 例が登録されているのみであり、それに基づいた治療標的を念頭においた病理診断系の開発研究は国内外においてなく、本研究の最大の特徴である。さらに、本研究では、特異的遺伝子の SNP を含む遺伝子多型解析を行い、症例-対照研究および症例-症例研究によって、胃癌の発生および浸潤・転移との関連性を検討し、非癌部組織検体を用いた発癌リスク診断の基盤とする。

本研究の最終的な目標は、得られた成果を分子診断/遺伝子診断の形で病理診断の場に組み入れることであるが、その受け皿として、申請者らが実践してきた病理検体に対する分子病理診断システムを利用する。これは、遺伝子発現異常と形態学的変化との対比を行えるという特色を有しており、ゲノム、トランスクリプトームから形態異常までをも包括す

る「morphological genomics」の大きな推進力となるものである。多型解析を含む本研究は、「根拠および個性に基づいた癌の治療と予防」という社会からの要請に「癌ゲノム病理学」が答えるためのフロントラインに位置する研究であると確信する。

<研究計画>

SAGE 法で得た胃癌と種々の正常臓器における遺伝子発現プロファイルの比較から新しい胃癌特異的遺伝子を抽出し、標的治療および予防を視野に入れた胃癌の分子病理診断系、血清診断系を確立するために、次のことを行う。

- 1) 胃癌 SAGE ライブラリーと正常臓器ライブラリーの比較による新規胃癌特異的遺伝子候補の抽出
- 2) Recombinant 蛋白の調整およびモノクローナル抗体の作成
- 3) 免疫組織化学による蛋白の局在と臨床病理学的事項との関連解析
- 4) モノクローナル抗体を用いた ELISA 系の構築と血中レベルの測定
- 5) SAGE ライブラリーに基づいた胃癌組織解析用カスタムアレイの作成
- 6) 新規胃癌特異的発現遺伝子の機能解析
- 7) 胃癌特異的発現遺伝子の SNP の探索および分子疫学的検討
- 8) 新規胃癌特異抗体、胃癌用カスタムアレイの分子病理診断への導入

- 1) 胃癌 SAGE ライブラリーと種々の正常臓器ライブラリーの比較による新規癌特異的遺伝子候補の抽出

癌の発生・進展に関与し、且つ、癌には発現するが生存に重要な正常臓器には発現のない遺伝子は、治療を考える場合に、正常臓器へのダメージを与えることはない理想的な標的となり得る。そこで、まず、申請者らが作成した胃癌 SAGE ライブラリー (GEO Accession no. GSE545 : SAGE Hiroshima Gastric Cancer Tissue) と SAGEmap データベース中の主要な種々の正常臓器におけるライブラリーとを比較し、候補遺伝子をリストアップする。これらについて、実際の正常臓器 (心臓、肺、肝臓、脳、腎臓など 14 臓器) と 10 例程度の胃癌組織における遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法によって検討し、胃癌特異的に発現する遺伝子かどうかをスクリーニングする。胃癌にはほぼ特異的に発現することが確認できた遺伝子については、50 例の胃癌の癌組織 (T) と非癌部胃粘膜組織 (N) における発現を定量的 RT-PCR 法によって解析し、T/N 比と臨床病理学的所見との関連を検討する。

- 2) Recombinant 蛋白の調整およびモノクローナル抗体の作成

- 1) の中で、特にその配列から膜蛋白や分泌蛋白が想定されるものについて、ヒスチジンあるいは GST 融合蛋白質を作成する。タグを有するベクターに目的遺伝子を in frame で挿入し、大腸菌にトランスフォーメーション、単一コロニーを増殖、大量培養を行い、蛋白質の精製を行う。溶菌後は、担体 (Ni-NTA あるいはグルタチオン) を用いて、アフィニティーカラムにて目的蛋白質を精製、Factor Xa 等のプロテアーゼでタグを切り離し、目的蛋白質のみを得る。これについて、常法に従い、モノクローナル抗体を作成、液相系およびウエスタンブロット、免疫染色にて反応性、特異性を確認する。

- 3) 免疫組織化学による蛋白の局在と臨床病理学的事項との関連解析

- 2) の内、パラフィン切片において染色可能な抗体を用いて、全身諸臓器において発現のないことを確認すると共に、予後を含めた臨床病理情報の揃った約 200 例の胃癌について発現を検討し、関連解析を行う。さらに、腸上皮化生、腺腫等の前癌性病変、食道癌、大腸癌における発現も解析し、癌化過程における関与と鑑別診断マーカーとしての意義、他の消化管癌診断への可能性について検討する。

4) モノクローナル抗体を用いた ELISA 系の構築と血中レベルの測定

2) で準備したモノクローナル抗体の内、認識エピトープが異なり、且つ、液相系および固相化条件で反応性の高い2種を選定し、サンドウィッチ ELISA 系を構築する。胃癌細胞株の培養上清を用いた予備実験後、臨床血液検体について標的蛋白のレベルを測定する。この場合、検討する血清は、胃癌 100 例、非癌症例 100 例、食道癌 50 例、大腸癌 50 例を目安とし、臨床病理学的事項との関連を解析する。また、組織における発現レベルとの相関を確かめるために、定量的 RT-PCR、免疫染色で検討した症例の血清値を検討する。

5) SAGE ライブラリーに基づいた胃癌組織解析用カスタムアレイの作成とそれによる検索

これまでに、SAGEで抽出した164遺伝子に、既知のがん関連遺伝子、薬剤感受性マーカー遺伝子を加えた395遺伝子を搭載するカスタムオリゴDNAアレイを試作している。これを用いて、臨床検体を解析し、数理統計学的に、浸潤、転移、薬剤感受性を有意に判別できる遺伝子を絞り込む。これに、上記1) で抽出した胃癌特異的発現遺伝子を加えて新たなカスタムアレイを作成する。

臨床病理学的事項、治療・効果情報および予後の判明している多数例の胃癌について発現パターンを解析し、悪性度や薬剤感受性にかかわる癌の個性診断における有用性を検証する。

6) 新規胃癌特異的発現遺伝子の機能解析

胃癌細胞株を用い、強制発現系あるいは knock down 系によって、平成 17 年度に抽出された胃癌特異的発現態度を示す遺伝子の機能解析を行う。そこで、まず、癌細胞株パネルをスクリーニングし、発現の有無を確認する。次に、新規胃癌特異的発現遺伝子の全長 cDNA 発現ベクター、siRNA あるいはアンチセンスを調整する。これらを用いて標的遺伝子発現のない細胞株あるいは発現レベルの高い細胞株に対して導入あるいは処理する。機能解析としては、細胞外分泌の有無、MTT アッセイによる増殖能、DNA Ladder や Caspase 3/p85PARP 等の発現によるアポトーシス、invasion アッセイによる浸潤能などについて検討する。これらにより、癌化あるいは癌の進展に関わる遺伝子を同定し、治療標的となり得るか否かを知るとともに、診断標的としての意義が検証できる。

7) 胃癌特異的発現遺伝子の SNP の探索および分子疫学的検討

上記の研究により抽出された特異的遺伝子について、NCBIのdatabaseおよびIMS-JSTのJSNP databaseなどからSNPの有無を探索し、コーディング領域あるいは転写調節領域に存在するSNPを抽出する。健常者(約400例)および患者(それぞれ約200例)の末梢血または非腫瘍部組織を用いてSSCP、RFLP、DHPLC、sequencingによりSNP解析し、症例-対照研究を行う。さらに、症例-症例研究により、癌の個性とSNPとの関連解析を行う。これにより、胃癌のリスク診断の標的遺伝子多型か否かが分かり、予防につながる情報を得ることができる。

8) 新規胃癌特異抗体、胃癌用カスタムアレイの分子病理診断への導入

実践導入に関しては、広島市医師会臨床検査センターと共同で実践してきた分子病理診断システムに上記解析を組み込み、得られた結果をファイルするとともに追跡調査を行う。このシステムは、病理診断を行う組織検体をサンプルとして行うものであり、得られた胃癌特異的発現遺伝子の発現状況、遺伝子発現プロファイル、遺伝子多型情報と形態学的変化とを対比して解析することができる特徴を有しており、これを行ない、種々の遺伝子発現変化/多型を形態に還元することを目指す。尚、遺伝子発現プロファイルの検索のためには、ホルマリン固定される病理組織検体とは別個に臨床的に採取されたサンプルを用い、遺伝子多型の検索は、パラフィン包埋された非癌部組織について行う。

* 研究の倫理面での配慮

ヒト由来試料を用い、遺伝子発現解析および遺伝子多型解析を行う本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号、平成16年全部改定）および細則に定めるヒトゲノム・遺伝子解析研究に該当するため、上記指針に従って研究を実施する。即ち、提供者の人権及び利益の保護を最優先し、十分なインフォームド・コンセント、個人情報管理者の設置による個人情報の保護、研究実施担当者及び研究責任者の責務の明確化などを行い、広島大学医学部ヒトゲノム研究倫理審査委員会の承認の下に実施する。

<研究結果>

1) 胃癌と正常臓器の SAGE ライブラリー比較による新規癌特異的遺伝子候補の抽出：

我々の胃癌 SAGE ライブラリー (GEO accession no. GSE545) と正常 14 臓器のライブラリーとの比較と定量的 RT-PCR 法により、胃癌特異的発現遺伝子 9 個を同定した。具体的には、胃癌 SAGE ライブラリー (GSM8867、GSM8505、GSM7800、GSM9103) と SAGEmap データベース中の 14 の正常臓器 (大脳白質、小脳、視床、脊髄、心臓、肺、胃、大腸、肝臓、腎臓、腹膜、骨格筋、リンパ節、白血球) のライブラリーを比較し、胃癌ライブラリーで発現があり正常臓器で全く発現のない遺伝子を抽出した。遺伝子発現の実際の組織における mRNA 発現の確認は、定量的 RT-PCR 法によって行い、正常臓器における最高レベル(A) と癌におけるレベル(B)の比 (B/A) が 10 以上を高特異性とした。胃癌 SAGE ライブラリーと正常臓器ライブラリーの比較から、胃癌特異的発現遺伝子の候補として 54 遺伝子を抽出した。これらの全てについて、定量的 RT-PCR 法によって実際の 14 正常臓器と 9 例の胃癌組織における発現解析を行ったところ、9 遺伝子 (APIN、TRAG3、CYP2W1、MIA、MMP-10、DKK4、GW112、REGIV、HORMAD1) が高特異性であった。44 例の胃癌症例における発現解析では、TRAG3、CYP2W1、MMP-10、GW112、HORMAD1 が 40% 以上で過剰発現していた。GW112 および MIA の mRNA 発現レベルは、T grade、N grade、ステージと有意な相関を示した。

2) Recombinant 蛋白の調整およびモノクローナル抗体の作成：

上記 9 遺伝子の内、抗体の得られていないものについて、順次 Recombinant 蛋白を精製し、常法に従いモノクローナル抗体の作成を行っている。得られた各クローンについて、液相系、ウェスタンブロット、免疫染色にて反応性、特異性を確認した。

3) 免疫組織化学による蛋白の局在と臨床病理学的事項との関連解析：

抗体が利用できる MIA、MMP-10、DKK4 について、免疫染色で組織における発現を検討したところ、胃癌 151 例中、それぞれ 47 例 (32%)、68 例 (45%)、2 例 (1%) で陽性であった。MIA の発現は、T grade、N grade、ステージと有意に相関し、MMP-10 の発現は、T grade と有意に相関していた。さらに、進行胃癌症例において、MIA および MMP-10 の発現と不良な予後との間に有意な相関を認めた。

一方、REGIV 抗体を作成し免疫染色で発現を検討したところ、胃癌 (2936%、42/143)、大腸癌 (36%、13/36)、膵癌 (22%、5/23)、消化管カルチノイド (93%、14/15) に発現していたが、肺癌、乳癌には発現は全く認められなかった。胃癌における REGIV の発現は、腸型粘液形質および神経内分泌への分化と有意に相関していた。

4) ELISA 系を用いた血中レベルの測定：

胃癌患者血清（69症例）でMIAが20ng/ml以上の高値を示したのは、5.8%のみであり、いずれもステージ4であった。MMP-10ではcutoff値を200pg/mlとすると、陽性例は健常者および胃炎患者では15%、胃癌では94%であり、ステージ2以上では全例陽性であった。腹膜洗浄液では細胞診陽性サンプルのみで高値を示した。

また、REGIV 蛋白も ELISA によって血清中で捉えられる。胃癌患者では 36% (22/61) に対し、非癌対照者では 1% (1/101) のみが陽性であり、ステージ 1 から陽性になることから腫瘍マーカーとしては有用とみなされた。

5) SAGE データ解析による新規癌特異的遺伝子候補の抽出と機能解析：

胃癌と正常臓器の SAGE ライブラリーの比較と定量的 RT-PCR 法により抽出した新規癌特異的発現遺伝子の内、REGIV については、5-FU によるアポトーシスの抑制には、EGFR のリン酸化、caspase-9 を経由した caspase-3 の抑制が関与することを明らかにした。

MIA 導入胃癌細胞株 MKN-28 では、empty ベクター導入株と比較して、増殖に差はみられなかったが、浸潤能は有意に促進された。

一方、カスタムアレイを用いた 20 例の胃癌組織における遺伝子発現解析で、悪性度・進行度と相関する遺伝子として SPC18 を同定した。SPC18 については、定量的 RT-PCR にて発現がステージ・転移と相関することを確認した。SPC18 は、分泌蛋白前駆体のシグナルペプチドを切断する signal peptidase complex (SPC) の 5 つあるサブユニットのひとつであり、SPC21 とともに触媒サブユニットと考えられているが、そのがんにおける発現および機能は全く検討されていない。そこで、SPC18 発現ベクターを調整し、強制発現系において機能解析を行った。発現レベルの低い胃がん細胞株 MKN-1 に SPC18 を強制過剰発現させたところ、細胞増殖に変化はなかったが、invasion assay および wound healing assay において invasion および migration が明らかに促進された。

癌特異的遺伝子 DKK4 に関連して解析した WNT-5a については、その発現が胃癌の悪性度・予後と相関すること、細胞浸潤を促進することを確認した。

一方、新しい癌特異的発現遺伝子 X を同定し、細胞外分泌を確認し、ELISA による血清診断系を確立した。

6) 胃癌特異的発現遺伝子の SNP の探索および分子疫学的検討：同様に、SAGE データ解析に基づいて新しい胃癌の癌抑制遺伝子として同定した Claudin-18 (CLDN-18) 遺伝子において、5'UTR に G/A の SNP が存在することを新規に見出した。そこで、胃癌症例（約 150 例）と健常対照症例（約 300 例）についてジェノタイプ解析を行ったところ、A/G および G/G 型が胃癌症例で有意に高頻度であり、Odds ratio (OR) は 5.17 (2.01-13.3) であった。

7) 胃癌診断用カスタムアレイの分子病理診断への導入：

感度および再現性を高めるために作成した中空繊維配列体スライス法によるオリゴ DNA 3 次元マイクロアレイ (Ex-STOMACHIP、ver. 2) を用いて発現解析を行った。これは、207 遺伝子を搭載しており、SAGE 法で抽出した胃癌関連遺伝子 (47)、既知の浸潤・転移、予後に関連している遺伝子 (33)、DNA damage response / DNA repair に関連している遺伝子 (60)、薬剤感受性遺伝子 (40)、その他 (27) を含んでいる。23 例の胃がん組織について発現解析を行ない、GeneSpring の 1-way ANOVA により、T grade と有意に相関する 5 遺伝子、N grade と有意に相関する 7 遺伝子、Stage と有意に相関する 11 遺伝子を抽出した。これらには、既知の遺伝子としては CDKN2A や EGFR が含まれていた。定量的 RT-PCR により validation を行なった。

＜今後の研究の展開＞

SAGEデータの解析に基づいて、胃癌に特異的に発現し、正常臓器には発現の殆どない多くの遺伝子を同定した。その内、REGIVやMMP-10は高率に胃癌患者血清で高値を示し、優れた血清診断マーカーであることが判明した。さらに、詳細な発現解析および機能解析から、いくつかは浸潤能の促進やアポトーシスの抑制などの機能を持つことから、治療の新しい標的であることが明らかとなった。また、遺伝子多型と発がんリスクとの関連解析は、予防に関する重要な情報を与えるものである。癌特異的遺伝子として同定されたものの中で、未だ、抗体を用いた詳細な発現解析、血清値の測定、機能解析が完了していないものがあり、今後の課題である。さらに、カスタムアレイによる解析では、悪性度と関連する発現態度を示す遺伝子は同定出来たが、発現パターンによる癌の生物学的個性診断には至らなかった。搭載する遺伝子の変更が必要である。

主要論文別冊

Oue N, Mitani Y, Aung PP, Sakakura C, Takeshima Y, Kaneko M, Noguchi T, Nakayama H and Yasui W
Expression and localization of RegIV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: RegIV expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma
J Pathol 207:185-198, 2005

Aung PP, Oue N, Mitani Y, Nakayama H, Yoshida K, Noguchi T, Bosserhoff AK and Yasui W
Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer
Oncogene 25:2546-2557, 2006

Sanada Y, Oue N, Mitani Y, Yoshida K, Nakayama H and Yasui W
Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype
J Pathol 208:633-642, 2006

Mitani Y, Oue N, Matsumura S, Yoshida K, Noguchi T, Ito M, Tanaka S, Kuniyasu H, Kamata N and Yasui W
Reg IV is a serum biomarker for gastric cancer patients and predicts response to 5-fluorouracil-based chemotherapy
Oncogene (in press) 2007 Jan 22; [Epub ahead of print]

Mitani Y, Oue N, Hamai Y, Aung PP, Matsumura S, Nakayama H, Kamata N and Yasui W
Histone H3 acetylation is associated with reduced p21^{WAF1/CIP1} expression in gastric carcinoma
J Pathol 205:65-73, 2005

Kondo T, Oue N, Mitani Y, Kuniyasu H, Noguchi T, Kuraoka K, Nakayama H and Yasui W
Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the PINX1 gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma
Oncogene 24:157-164, 2005

Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, Yasui W and Kikuchi A
Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion
Cancer Res 66:10439-10448, 2006

Matsumura S, Oue N, Mitani Y, Kitadai Y and Yasui W
DNA demethylation of vascular endothelial growth factor-C is associated with gene expression and its possible involvement of lymphangiogenesis in gastric cancer
Int J Cancer 120:1689-1695, 2007

Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shuto M and Nakayama H
Molecular-pathological prognostic factor of gastric cancer: a review
Gastric Cancer 8:86-94, 2005

Oue N, Aung PP, Mitani Y, Kuniyasu H, Nakayama H and Yasui W
Genes involved in invasion and metastasis of gastric cancer identified by array-based hybridization and serial analysis of gene expression (Review article)
Oncology 69S1:17-22, 2005

Yasui W, Sentani K, Motoshita J and Nakayama H
Molecular pathobiology of gastric cancer (review)
Scand J Surg 95:225-231, 2006