原著

Comparative genomic hybridization (CGH) 法を用いた 大腸癌臓器転移に関連するゲノムコピー異常の網羅的解析

順天堂大学下部消化管外科

神 山 博 彦   鶴 潯   条   石 戸 保 典
柳 沼 行 宏   笠 卷 伸 二   坂 本 一 博
進 藤 孝 之   丹 羽 眞一郎   鎌 野 俊 紀

Analysis of DNA Copy-number Aberrations related with Organ Metastases of Colorectal Cancer by Comparative Genomic Hybridization

Hirohiko KAMIYAMA, Jo UNOTORO, Yasunori ISHIDO,
Yukihiro YAGINUMA, Shinji KASAMAKI, Kazuhiro SAKAMOTO,
Takayuki SHINDO, Shinichiro NIWA and Toshiki KAMANO

Department of Coloproctological Surgery, Juntendo University School of Medicine

(目的) 大腸癌の臓器転移は大腸癌の予後規定因子として重要である。大腸癌臓器転移にかかわる遺伝子を抽出するため、CGH法を用いて大腸癌原発巣に生じたゲノムコピー異常を網羅的に解析した。(対象および方法) 当科で2003年4月から2004年12月に手術を施行した大腸癌症例43例(非臓器転移30例, 同時性肝転移8例, 同時性肝および肺転移5例)。手術で得られた大腸癌原発巣の新鮮凍結切片から, microdissectionにより腫瘍細胞のDNAを抽出し, CGH法で解析した。解析結果を臓器転移群と非臓器転移群とで比較検討した。

(結果) 大腸癌の同時性臓器転移群における3q13.3, 5p12, 14q24のゲノムコピーの増加が非臓器転移群に比べ, 有意に多く認められた。

(結語) 3q13.3, 5p12, 14q24のゲノムコピーの増加が大腸癌の臓器転移に関与している可能性が示唆された。

索引用語: 大腸癌 (colorectal cancer), 臓器転移 (organ metastases), 遺伝子 (gene), ゲノム (genome), CGH (comparative genomic hybridization)

緒 言

近年, 我が国では大腸癌は急激な増加をたどり, 大腸癌研究会¹⁾の発表したガイドラインによると全病期での累積5年生存率は69.9%であるが, 臓器転移を認めるStage IVでは13.2%と未だ惨澹たるものである。

一方, 癌はさまざまな遺伝子変化の蓄積によって発生することが明らかにされ, その生物学的悪性度を遺伝子変化によってとらえようとする試み

がなされてきた。特に大腸癌はVogelsteinら²⁾が提唱したadenoma-carcinoma sequenceにみられるようにその遺伝子変化の解析が明らかにされつつある癌の一つである。その遺伝子変化の解析はこれまでにsouthern blotting法やrestriction fragment length polymorphism (RFLP) 法などが試みられているが, 検索できる遺伝子や染色体領域が限られているという難点がある。さらに, 固形腫瘍では複雑な染色体異常を呈するため遺伝子変化の解析が困難とされてきた。しかし, 1992年に

Kallioniemiら³⁾によってfluorescence in situ hybridization (FISH)法をもとに開発された比較遺伝子競合comparative genomic hybridization (CGH)法は、これらの難点を解消した極めて優れた方法である。癌細胞の遺伝子変化には染色体の増加・減少に由来する比較的大きなものから、遺伝子を構成する一つの核酸の置換による小さなものまでさまざまなものがあるが、CGH法は遺伝子変化のうちでも染色体レベルでのゲノムコピーの増加・減少を検出し、その染色体領域を同定することができる。すなわち、固形腫瘍において腫瘍DNA中の染色体レベルでのゲノムコピーの増加・減少を一度に網羅的に検出し、しかも同時に全ての染色体上にそれらの領域を同定することができる。

そこで今回、このCGH法を用いて大腸癌の臓器転移に関わる遺伝子変化について解析した。

対象および方法

1) 患者と組織検体：当科で2003年4月から2004年12月に手術を施行した大腸癌症例43例を対象とした。内訳は、同時性肝転移8例、同時性肝・肺重複転移5例、非臓器転移30例である。全ての症例に当院の倫理委員会の定める遺伝子解析に関する説明を行い、同意を得ている。

手術で得られた大腸癌原発巣の腫瘍組織の凍結標本をクライオスタットで16 μ mの厚さに薄切し、組織切片スライドを作成した。ここからmicrodissectionにより癌細胞のみを選択的に採取し、癌組織のゲノムDNAを抽出した。

2) CGH解析：腫瘍DNAに緑色の、正常DNAに赤色の蛍光標識を行った後、単鎖化処理を行った。Cot-1 DNAの存在下に正常男性ヒトリンパ球分裂中期染色体に上記の腫瘍DNAと正常DNAをハイブリダイズさせた。これにDAPI (4, 6-diamino-2-phenylindole) で対比染色を行った後、CCDカメラ付の蛍光顕微鏡を使用して染色体蛍光画像を取り込んだ。各染色体の長軸上に緑色および赤色の蛍光強度曲線を描き、緑色の赤色に対する蛍光強度比を計算した。強度比1.0を基準線とし、1.2以上をゲノムコピーの増加、0.8以下をゲノムコピーの減少と判定した。

3) 統計処理：CGH解析によりゲノムコピーの増加・減少が判明した染色体領域ごとに臓器転移群と非臓器転移群とで統計学的な有意差を検定した。有意差の検定にはFisherの直接法を用い、P値0.05未満を有意差ありとした。

成績

臓器転移の有無別の背景はTable 1に示す如く、年齢、性別、腫瘍占居部位、組織型分類、深達度、所属リンパ節転移度に関して有意差を認めなかった。われわれのCGH解析でゲノムコピーの増加・減少を判定した393箇所の染色体領域のうち、3q13.3, 5p12, 14q24のゲノムコピーの増加が非臓器転移群に比べ、臓器転移群に有意に多く認められた (Table 2)。上記の染色体領域において各症例で認められたゲノムコピーの増加・減少をFig. 1に示す。ゲノムコピー異常の認められた染色体領域の平均数は、臓器転移群で1症例あたり増加16.1箇所、減少6.46箇所、非臓器転移群で増加16.3箇所、減少6.87箇所であった (Fig. 2)。

考察

CGH法の原理は、蛍光色素で標識した腫瘍細胞のDNAと正常細胞のDNAを正常細胞分裂中期染色体に競合的にハイブリダイズさせると、腫瘍DNAの特定の染色体領域にゲノムコピーの増加があればそれが腫瘍DNAの蛍光の増加として検出され、ゲノムコピーの減少があれば逆に正常DNAの蛍光の増加として検出されるというものである。これにより腫瘍細胞の遺伝子変化の特徴をとらえることができる。CGH解析結果の利用には主に二つの方法がある。一つは臨床病理学的事項との関連を統計学的に検討して診断や予後と関連する染色体異常領域を同定し臨床応用することであり、もう一つはその染色体異常領域のさらに詳細な分析から癌関連遺伝子を同定することである。

われわれはDNAの抽出に際し、microdissectionを行うことで腫瘍細胞以外のDNAの影響をできる限り少なくした。また、腫瘍組織検体からDNAを抽出しているため、培養細胞を用いた実験系に比べて特定の細胞集団が選択されるような偏

Table 1 Characteristics of the Patients and Tumors.

		CRC With Organ Metastases	CRC Without Organ Metastases
Age(SD)		13 65.6(9.99)	30 65.9(11.2)
SEX	Male	5	15
	Female	8	15
Tumor site	C	2	1
	A	1	8
	T	1	2
	D	2	1
	S	3	7
	Rs	2	4
	Ra	1	2
	Rb	1	5
Histology	well	4	14
	moderate	8	12
	poorly	0	2
	mucinous	1	1
	others	0	1
Depth	m	0	0
	sm	0	0
	mp	1	3
	ss(a1)	5	18
	se(a2)	5	7
	si(ai)	2	2
pN	0	2	14
	1	7	10
	2	1	3
	3	3	3

Table 2 Imbalances of 3q13.3, 5p12 and 14q24 in the two groups of Colorectal cancer.

Chromosome arms	3q13.3		5p12		14q24
	Gain/Total		Gain/Total		Gain/Total
CRC with Organ Metastases	3/13	p=0.02317	5/13	p=0.04155	3/13
CRC without Organ Metastases	0/30		3/30		0/30

りは少ないものと考えられる。全ての検体は腫瘍の表層部を約5 mm角のブロック状に採取して凍結標本を作成しているため、腫瘍細胞間の差はほぼないものと考えられる。しかし、今回の解析結果が経時的な遺伝子変化のうちの一時点での染色体異常の特徴をとらえたに過ぎない可能性は否定できない。

DeAngelisら⁴⁾は、Dukes C/D症例はDukes B症例に比べてゲノムコピーの異常が多く認められたとしている。すなわち癌の進行にしたがってゲノムコピーの異常が増えていく可能性を示唆している。癌の進展が遺伝子変化の蓄積によって起こるとすれば、臓器転移を有するような進行した癌細胞においてはゲノムコピーの異常がより増加するという結果は理解しやすい。しかし、われわれの

CGH解析結果においてゲノムコピー異常の認められた染色体領域の平均数は、臓器転移群と非臓器転移群の間に有意差は認められなかった (Fig. 2)。この結果は、癌細胞と周囲の間質や細胞との相互作用などの遺伝子変化以外の因子も癌の進展に関与している可能性を示唆していると考えられることもできるが、われわれの解析では非臓器転移群の中にリンパ節転移を有するものが含まれているため、両群間の検討が必ずしも癌の進展の程度を正確に反映していない可能性も否定できない。

われわれの解析では臓器転移に肝と肺を含めているため、純粋な比較はできないが、Nakaoら⁵⁾は大腸癌原発巣の検討から6q, 7q, 8q, 13q, 20qの増加が肝転移を有する群に有意に多く認められたことを報告している。また、Diepら⁶⁾は過去に報告

Fig. 1 Genomic aberrations in 3q13.3, 5p12 and 14q24.

Fig. 2 The mean number of genomic aberrations.

された大腸癌のCGH解析結果の集計から、7pの増加および15qの減少が臓器転移に関連している可能性があるとしている。われわれの解析結果ではこれらの染色体領域に関して臓器転移群と非臓器転移群との間に有意な差は認められなかった。

今回、われわれの解析では3q13.3, 5p12, 14q24のゲノムコピーの増加が臓器転移を有する大腸癌原発巣に有意に多く認められた。3q13.3に存在するIGSF11遺伝子は胃癌で高度に発現しており、接着分子の一つとされている⁷⁾。接着分子の動態は癌の転移・浸潤機構に重要な役割を果たしていることが予想される。5p12は卵巣癌の予後不良症例において増加しているとの報告があり⁸⁾、癌の進展に関連している可能性を示唆している。5p13-p12に存在するFGF10は、胚発生や細胞成長・形態発生・組織修復をはじめ腫瘍の成長や浸潤に関与するといわれるFGFファミリーのうちの一つであり、マウス乳腺における癌遺伝子であるとの報告がある⁹⁾。14q24.3に存在するFOSは細胞骨格の形成と維持に関与しているとされており、この転写因子fos1が基底膜を超える癌の浸潤に関与しているとされる¹⁰⁾。

これらの報告からも、われわれが初めて報告する3q13.3, 5p12, 14q24には大腸癌の臓器転移に関連する遺伝子が存在している可能性や大腸癌の予後不良因子に関連している可能性が示唆される。

ただし、肝・肺の各々の特徴についてはさらなる解析結果の蓄積と検討が必要である。

今後、分子生物学的なアプローチにより得られた知見と遺伝子解析で得られた情報が関連づけられ、大腸癌の発生および転移のメカニズムが解明されると考える。また、早期診断や転移の予測、予防医学、遺伝子診断や治療の分野で大腸癌の予後の向上に寄与することが期待される。

結 語

3q13.3, 5p12, 14q24のゲノムコピーの増加が大腸癌の臓器転移に関連している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 大腸癌研究会編：大腸癌治療ガイドライン．金原出版，東京，2005，19-23
- 2) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532, 1988
- 3) Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821, 1992
- 4) DeAngelis PM, Clausen OP, Schjolberg A, et al: Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by CGH and their associations with tumor DNA ploidy, genotypes and phenotypes. *Br J Cancer* 80: 526-535, 1999
- 5) Nakao K, Shibusawa M, Ishihara A, et al: Genetic changes in colorectal carcinoma tumors with liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization and DNA ploidy. *Cancer* 91: 721-726, 2001
- 6) Diep CB, Teixeira MR, Thortensen L, et al: Genome characteristics of primary carcinomas,

- local recurrences, carcinomatoses, and liver metastases from colorectal cancer patients. *Mol Cancer* 3 : 6, 2004
- 7) Katoh M, Katoh M: IGSF11 gene, frequently up regulated in intestinal-type gastric cancer, encodes adhesion molecule homologous to CXADR, FLJ22415 and ESAM. *Int J Oncol* 23 : 525-531, 2003
- 8) Partheen K, Levan K, Osterberg L, et al : Analysis of cytogenetic alterations in stage III serous ovarian adenocarcinoma reveals a heterogeneous group regarding survival, surgical outcome, and substage. *Genes Chromosomes Cancer* 40 : 342-348, 2004
- 9) Theodorou V, Boer M, Weigelt B, et al : Fgf10 is an oncogene activated by MMTV insertional mutagenesis in mouse mammary tumors and overexpressed in a subset of human breast carcinomas. *Oncogene* 23 : 6047-6055, 2004
- 10) Sherwood DR, Butler JA, Kramer JM, et al : FOS-1 promotes basement-membrane removal during anchor-cell invasion in *C. elegans*. *Cell* 121 : 951-962, 2005
-