

2003年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2004年 3月 7日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 董 博鳴 
所属機関名 東北大学加齢医学研究所
指導責任者氏名 近藤 丘
職 名 教授
所在地 〒980-8575 仙台市青葉区星陵町 4-1
電話 022-717-8521 内線 8521

1. 研究テーマ

オリゴマイクロアレイを用いた肺癌の発生進展に関わる遺伝子異常の網羅的解析

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 ・ 無 (学会名・演題)

1. 第44回日本肺癌学会総会

予後因子としてのCT腫瘍面積遺残率についての検討

2. 95th Annual Meeting of American Association for Cancer Research

Computed tomographic image of small lung adenocarcinoma is associated with cell proliferation and microvascularization

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ (雑誌名・論文名)

3. 今後の研究計画

1. 三回目のマイクロアレイの結果を詳細に分析し、正常気道上皮細胞と肺癌細胞の mRNA expression が違う gene を target gene として選定し、RT-PCR 法を用いて新しい肺癌に関連する癌遺伝子を同定する。
2. 当施設で切除された肺癌標本から癌細胞をマイクロダイセクションし、1で同定された癌遺伝子を同じ方法で検証する。
3. 遺伝子を単離した後、細胞株に導入し、機能の解析を行う。

4. 指導責任者の意見

研究者は、立案した研究計画に従い、30種類の肺癌細胞株と2種類の正常気道上皮細胞の培養を行い、これらから順次 RNA の抽出を遂行した。抽出した RNA を共同研究機関である中外製薬に委託し、マイクロアレイ解析に供した。用いたマイクロアレイには 12,000 以上の遺伝子がチップ上に配置されており、また、それぞれの遺伝子について、20 のプローブが配置されている。既に、アレイのハイブリダイゼーションが終了し、現在、得られた各遺伝子の expression pattern を解析中である。また、研究者は本研究を遂行しつつ、一方で、肺癌患者の CT 腫瘍面積遺残率と予後の関係についてさらに研究を深め、CT 所見と血管新生因子や細胞増殖因子、p53 遺伝子の状態との相関、ならびに予後との関連について検討を行い、CT 所見と相関する分子機構を明らかにした。これらの業績は、助成により期待された研究成果として十分なものであると考えられ、また、将来の研究テーマとしての継続性も有することから、研究者および日中両国にとって有益な研究を遂行することができたものと評価する。

指導責任者氏名

丸藤 正 印

5. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」に倣い、指定の用紙で作成して下さい。

研究発表または研究状況を記録した写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

オリゴマイクロアレイを用いた肺癌の発生進展に関わる遺伝子異常の網羅的解析

研究者氏名 董 博鳴

中国所属機関 中国医科大学第一附属病院胸部外科

日本研究機関 東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野

指導責任者 教授 近藤 丘

共同研究者名 佐藤 雅美、桜田 晃、堀井 明

要 旨

手術療法、化学療法、放射線療法など色々な治療方法はあるにもかかわらず、肺癌の治療成績特に進行癌の治療成績は良好とは言えない。遺伝子治療は肺癌の新しい治療法として期待されているが、肺癌に関する遺伝子異常に関しては、いまだ不明の点が多い。本研究においては、肺癌細胞株および肺癌切除標本から RNA を抽出し、オリゴマイクロアレイを用いて発現の状態を確認する。異常の認められる場合、RT-PCR と塩基配列法によって塩基配列の異常を検出する。さらに、遺伝子を単離した後、細胞株に導入することで、機能の解析を行う予定である。

Key Words lung cancer, oligo nucleotide array, cancer specific exon splicing

緒 言

肺癌の罹患率と死亡率はともに著しく増加している。21 世紀には、さらに増加することが推定されている。手術療法、放射線療法、化学療法などが行われるが、特に進行癌の治療成績は良好とは言えない。1996 年に Roth らがレトロウィルスベクターを用いて、正常 p53 遺伝子を 9 例の肺腫瘍に注入し、3 例で腫瘍が退縮したことを報告した。遺伝子治療は肺癌の新しい治療法として期待されている。しかし肺癌に関する遺伝子異常に関しては、いまだ不明の点が多い。肺癌で高頻度に見られるものは p53 と RB のみで他の遺伝子異常の頻度は低い。肺癌の組織型は多彩で、これら遺伝子異常もその組織型別に論じる必要がある。急速に進歩している遺伝子工学手法により、肺癌に関する遺伝子の同定も期待されるようになってきた。1998 年に Hibi らは SAGE 法(serial analysis of gene expression)を用いて、扁平上皮癌 2 検体と正常気道上皮 2 検体で約 16,000 種の unique mRNA の発現を確認し比較した。肺癌で過剰発現をされているものとして報告された 2 遺伝子 PGP9.5 と B-myb は他臓器癌に比べ肺癌での発現が亢進していた。一方正常気道上皮で優位に発現されているものの解析はまれで、扁平上皮癌以外の組織型についての報告も多く見られない。

cDNA マイクロアレイ技術の開発によって、同時に数千の cDNA あるいは RNA 断片が一枚のチップの上に同定されるようになってきた。今回我々は Oligo nucleotide array (Affymetrix Co.) を利用し、肺癌組織(培養細胞)と正常肺組織の約 1 万種の mRNA を調べた。従来の cDNA マイクロアレイ技術と異なって、一つの遺伝子の cDNA について 20 個の oligonucleotide を用いているから、肺癌と関係する exon splicing (遺伝子以上の様式の一つで、今までの文献報告は非常に少ない)の検索が可能になってきた(今まで、この手段で癌関連する exon splicing を検索することは世界でも報告されていない)。

対象と方法

(一) オリゴマイクロアレイ技術を用いて、正常肺組織と肺癌組織(肺癌切除標本)、肺癌培養細胞の gene expression の差をスクリーンする。正常肺組織、肺癌組織(手術切除標本)と肺癌培養細胞の mRNA を抽出

し、それぞれオリゴマイクロアレイにて、蛍光にラベルされたシーケンス既知の塩基配列（人類正常細胞に見られる全 mRNA の相補的な塩基配列）とハイブリダイゼーションさせる。蛍光色のパターンによって肺癌 mRNA と正常肺組織 mRNA の発現差を調べる。肺癌で過剰発現しているものと正常肺組織で優位に発現されているものを肺癌遺伝子領域と癌抑制遺伝子領域に仮想され、癌抑制遺伝子の候補としてステップ二に用いられる。

(二) 目的遺伝子領域のエクソン スプライシング タイプの同定。

(1). 各目的遺伝子領域の正常な cDNA 塩基配列を NCBI (National Center for Biotechnology Information)に検索し、全エクソン配列をカバーできるように RT-PCR プライマーを数 pair 設計する。

(2). 肺腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌、膀胱癌（コントロール グループ）の培養細胞それぞれ五種類を選んで培養する。

(3). Oligotex mRNA Midi kit(Qiagen Inc.)法を用いて、癌培養細胞と正常肺組織の mRNA を抽出する。

(4). (3)で得られた mRNA を鋳型として Superscript II RT(Life Technologies, Inc)法を用いて各癌培養細胞と正常肺組織の cDNA を逆転写する。

(5). (1)で設計したプライマーを使って(4)で得られた cDNA に RT-PCR をかける。

(6). 電気泳動法により RT-PCR 産物のバンドを検出する。

(7). 正常肺組織による RT-PCR 産物のバンドと異なる肺癌培養細胞の RT-PCR 産物バンドに対して、DNA シーケンスを施行する。

(三) 当施設に手術切除された肺腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌の切除標本を (二) の同様な方法で、目的領域のエクソン スプライシングを検索する。

結果

1. 初回オリゴマイクロアレイ：

肺癌 cell line A549、子宮内膜上皮癌 cell line Ishikawa 3-H-12、繊維芽細胞癌 cell line RB24KY および正常肺組織の mRNA を抽出し、Affymetrix 社が開発した oligonucleotide microarray にて、約 6500 個の sequence 既知の遺伝子の表現型を調べた。その中から表現型が異なる 23 個の遺伝子を可能な癌特別 exon splicing が存在する target 遺伝子として選択した。

2. 32 個の cell line を培養して、Oligotex mRNA Midi Kit 法を用いて whole RNA を抽出し、Superscript II RT 法で cDNA を合成しました。その中に、正常気道上皮細胞 2 種、肺腺癌 7 種、扁平上皮癌 7 種、大細胞癌 2 種、小細胞癌 5 種、膀胱癌 5 種、繊維芽細胞癌と子宮内膜上皮癌それぞれ 1 種が含まれている。

3. 一回目の oligonucleotide microarray の再現性も確認する目的で、20 例のヒト肺癌標本から癌細胞を micro dissection し、二回目の microarray を行った。heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein I の結果のように、probe1,2,3,4,8,9 の表現の強さに差が認められない部分がある一方で、probe5,6,7,10,11,12,13 のように表現の強さが異なっている部分も認められ、ある程度 exon splicing の情報を反映できると思われた。

(Fig.)

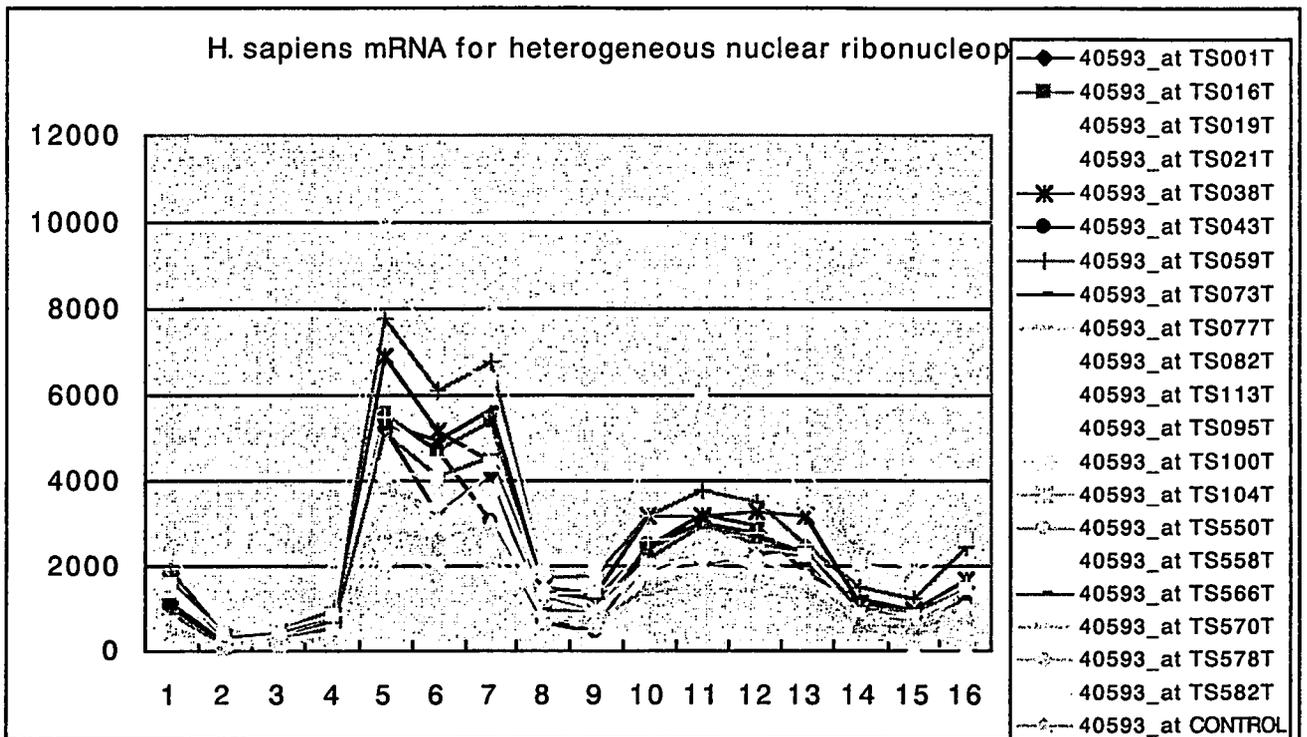


Fig. . Expression pattern of H. sapiens mRNA for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein

4. しかし最近、Affymetrix 社より、今回実験に使われた probe set の配列と遺伝子上の場所が公表され、すべての遺伝子において probe set が均等に全配列をカバーしているわけではなく、ノーコーディング 3' 側の非常に狭い範囲に限っているものもあることが分ってきた。こうした結果を踏まえて、さらに多くの遺伝子の spot されたマイクロアレイを用いて、2 種の正常気道上皮細胞と 30 種の肺癌と膀胱癌の癌細胞から mRNA を抽出し、3 回目の oligo nucleotide microarray を行った。正常気道上皮細胞と癌細胞の遺伝子発現の差を直接比較することで、よりはっきりした結果がより多くの遺伝子において得られることが期待されている。現在は三回目のマイクロアレイの結果を分析している段階である。

教室内での研究発表のスライドのコピーも添付致します。

Identification of Cancer Specific Exon Splicing in Lung Cancer

Department of Thoracic Surgery, IDAC, Tohoku University
 Department of Molecular Pathology, Tohoku University

Objective for this study

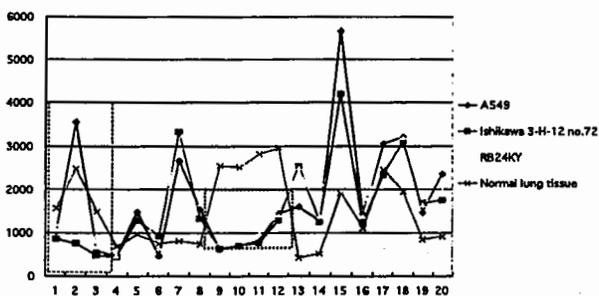
To find out the lung cancer specific exon splicing based on a gene screening method using oligonucleotide microarray

Materials and Methods 1

About 6,500 sequences known genes' expression patterns have been compared among the mRNAs of lung tumor cells line A549, endometrial cancer cell line Ishikawa 3-H-12, fibroblastic tumor cell line RB24KY and normal lung tissue using oligonucleotide microarray developed by Affymetrix.

23 genes who had different expression patterns were selected to be the candidates for cancer specific exon splicing searching undertaken in our experiment.

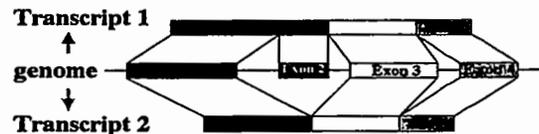
Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein1



Background 1

- The development and progression of lung cancer is a very complicated process that involves multiple genetic alterations.
- Genetic alterations related to canceration
 - Oncogene activation (K-ras, myc family, etc.)
 - Inactivation of tumor suppressor gene (p53, RB, p16, DPC4, bcl-2, etc.)
- Somatic mutation:
 - missense mutation.
 - non sense mutation.
 - frame shift mutation
- Loss of chromosome
- Epigenetic change of promoter
 - methylation
- Genetic alteration caused by translocation of chromosome
 - cancer specific exon splicing
- Mutation of gene of DNA repair enzyme

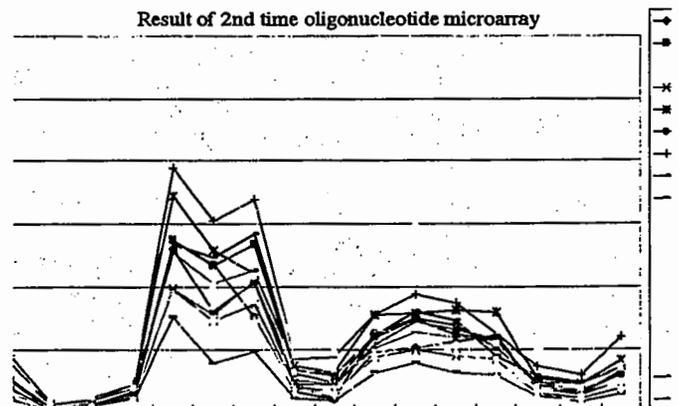
Background 2



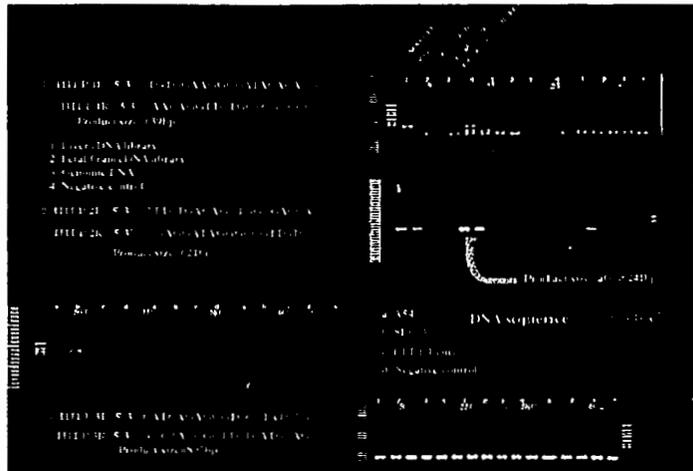
Materials and methods 2

- Preparation for RT-PCR : primer design and PCR condition.
- 32 cell lines (2 normal lung epithelial, 7 adenocarcinoma, 2 large cell carcinoma, 7 squamous cell carcinoma, 5 SCLC, 7 pancreatic cancer, 1 fibroblast, and 1 endometrial) are cultured and harvested when they were about 80% confluent.
- The whole RNA was isolated from cell pellets using the Oligotex Direct mRNA kit and the cDNAs were reversed using random primers kit (Superscript II RT).
- RT-PCR and DNA sequencing : cell lines

Result of 2nd time oligonucleotide microarray



Human transducin-like protein(HTLP) mRNA 16p13.3



Probes used to identify Heterogeneous Nucleolar Ribonucleoprotein

HG-U95 Probe Set, HG-U95 Probe Set, HG-U95A2 ID HG-U95A2 40593 at (Antisense) Probe Set Display

Order	Serial	Probe X	Probe Y	Probe Interrogation	Probe Sequence(5'-3')
1	604	466	3054		ATACCTGTTGTGAGACCCGAGGGCC
2	219	435	3112		TATTTTGTCTAACAGCAATCCAGGC
3	218	435	3113		ATTTTGTCTAACAGCAATCCAGGCT
4	466	469	3136		CTCAGTATTGTGACCCGGAGCCAC
5	548	437	3176		CATTCCGTTGCCTTACCCGATGGCT
6	497	511	3183		TTGCCTTACCCGATGGCTTGTGACG
7	294	369	3189		TACCCGATGGCTTGTGACCCGGAGA
8	497	191	3199		CTTGTGACCCGGAGAACCCGATTA
9	516	383	3201		TGTGACCCGGAGAACCCGATTA
10	276	433	3246		CTTGTGACCCGGAGAACCCGATTA
11	5	623	3249		GTCTAGCCCTGTGTTCTGTGAC
12	179	487	3250		TCTAGCCCTGTGTTCTGTGAC
13	629	75	3255		CTCTGTGTTCTGTGACCGCTGA
14	58	583	3283		GCAGGTTGGCCAGTCTACCTGGGA
15	550	547	3286		GGTTGGCCAGTCTACCTGGACTT
16	543	551	3294		AGTCTGTACCTGGACTTCCAATAA

Human cDNA for HLA-D class II antigen DO beta chain
Characteristics Length: 1322 BP, A Count:304, C Count:320, G Count:337, T Count:361

Sequence	Position
aa/ctattct	60
gtctggg/g	120
ccatgctca	180
actccacca	240
agatgtacg	300
cgatgctga	360
atggggctg	420
aacccaggt	480
actgctctg	540
agagggagg	600
agactgggt	660
atacctcaa	720
ggagaagat	780
gaatgctat	840
tgctgggct	900
aggtcaagt	960
ttaccatca	1020
ttccagccc	1080
ttccagccc	1140
ttccagccc	1200
ttccagccc	1260
ttccagccc	1320

Question:

What information can be provided by this kind of Probes?

To find: Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)?

Human cDNA for HLA-D class II antigen DO beta chain
Characteristics Length: 1322 BP, A Count:304, C Count:320, G Count:337, T Count:361

Sequence	Position
aa/ctattct	60
gtctggg/g	120
ccatgctca	180
actccacca	240
agatgtacg	300
cgatgctga	360
atggggctg	420
aacccaggt	480
actgctctg	540
agagggagg	600
agactgggt	660
atacctcaa	720
ggagaagat	780
gaatgctat	840
tgctgggct	900
aggtcaagt	960
ttaccatca	1020
ttccagccc	1080
ttccagccc	1140
ttccagccc	1200
ttccagccc	1260
ttccagccc	1320

RT-PCR and Sequences were performed on 15 human genomic DNA to find if SNPs exist among the area of probe 11-probe 13



Result: No new SNP was found!!!!

More tests are necessary to verify the result of oligo nucleotide microarray

- 2 normal lung epithelial cell lines and 30 cancer cell lines have been sent to the Roche company for the 3rd. Time Oligo nucleotide microarray test.
- Other RT-PCR and Sequence will be undertaken to prove the result of Oligo nucleotide microarray.