

平成21年6月29日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590852

研究課題名（和文） 血清遊離メチル化DNAを用いた塵肺合併肺癌の早期発見

研究課題名（英文）Early detection of lung cancer using aberrant promoter hypermethylation in serum DNA from patients with silicosis

研究代表者

田端 雅弘（TABATA MASAHIRO）

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号：30243504

研究成果の概要：塵肺に合併する肺癌は業務上疾病に認定され種々の対策が講じられているが、従来の画像診断と喀痰細胞診による検診のみでは確実な早期診断が困難なことから塵肺に合併した肺癌患者の予後はきわめて不良である。このような状況の下、本研究では肺癌を合併していない塵肺患者に比して、塵肺肺癌患者で末梢血中に認められる遊離メチル化DNAの検出率が有意に高いことが確認され、従来の塵肺肺癌検診を補完する新たな早期診断法となることが期待された。血清を用いた診断は被検者の負担も軽く、将来の臨床試験を通じて塵肺肺癌死亡率の低下に寄与できるものと考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：癌、肺線維症

1. 研究開始当初の背景

肺癌はわが国を含めた先進諸国で癌死亡の首位を占め、いまだに増加傾向にある。肺癌の進展は速やかであり、症状発見症例ですでに治療困難なことも少なくない。進行肺癌に対する画期的に有効な治療法が存在しな

い現在では肺癌患者の予後改善のためには予防・早期発見が必須と考えられ、1970年代に米国では Mayo Clinic、Johns Hopkins、Memorial Sloan-Kettering において胸部X線と喀痰細胞診の併用による肺癌検診の臨床比較試験が行われた。しかし、この検診方法

により肺癌死亡率の低下が認められなかったことから、現在では世界的には肺癌検診は行われない傾向にある。新たな手段として低線量CTによる肺癌検診がわが国で10年ほど前から試みられており、肺癌発見率が10倍から100倍に上昇することが明らかとなった。今後、喀痰細胞診にくわえCT検診が肺癌検診の中心になると考えられるが、この方法にもX線被爆、経済効果、読影の煩雑さなど解決すべき問題は多い。一方、我々は肺癌患者血清中に肺癌細胞より遊離したと考えられるメチル化DNAが病早期から認められ、肺癌検診へ応用が可能と考えられることを報告してきた¹⁾。肺癌細胞では癌化の早期よりMGMT, p16INK4A, RASSF1A, DAPK, RAR- β などの遺伝子のプロモーター部位にメチル化が生じることが知られており、これらがごく早期から末梢血中に遊離DNAとして検出できることを利用したものである。血清を用いる肺癌検診は、簡便性やX線被爆がない点などから従来の検診に比して優れた点が多く、今後メチル化遺伝子の選択や検出法の最適化と実際の検診でのvalidationが必要ではあるが将来有望な検査方法と考えられる。その臨床応用のひとつとして、画像診断が比較的困難とされる塵肺に合併した肺癌（塵肺肺癌）の検出がある。塵肺に高率に肺癌が合併することは既に多く報告されているが、肺野に多彩な画像所見を有する塵肺患者において新たに出現した肺癌を検出することは現代の画像診断技術を用いても比較的困難な場合があり、血清メチル化DNAによる診断を加えることにより検出感度の上昇が期待される。

1)Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M et. al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung

cancer. *Clinic Cancer Res.* 2005;11:1219-25

2. 研究の目的

本研究では当施設および関連施設において塵肺患者と塵肺肺癌患者の血清中遊離メチル化DNAの出現率を前向きに比較検討することにより、血清中遊離メチル化DNA検出法の塵肺肺癌の診断への応用可能性を明らかにし、将来の臨床研究への基礎データを提供する。また、塵肺同様に肺癌を合併する職業性肺疾患として代表的な疾患である石綿肺に合併する肺癌に関しても同様の検討を行う。

3. 研究の方法

(1)症例の集積・血清保存：当院、及び研究協力施設にて各施設のIRBにて研究プロトコルの承認を受けた後、文書にて同意を得た塵肺患者、塵肺肺癌患者より10mLの全血を採取し、直ちに3000rpm、10分間の遠沈にて血清を分離し-80℃にて保存。各症例について喫煙歴、職歴等、癌の組織型・病期などを含む詳細なデータを採取し個人情報保護の面から本研究専用のコンピューターにてデータの管理を行った。

(2)塵肺の診断、およびその分類：分担研究者の谷本がすべての登録症例の胸部X線と胸部CTについてcentral reviewを行い、診断の確認、病型分類を決定した。

(3)血清中遊離メチル化DNAの検出：メチル化DNAの検出にはreal time PCRによるMethylation-Specific PCR法を用いる。採取保存された血清2mLより抽出されたDNAをTris-EDTA bufferに溶解し、DNA濃度を測定後メチル化の測定まで-80℃にて保存。抽出されたDNAをovernightでbisulfite処理を施し、非メチル化特異的配列、およびメチル化特異的配列にたいするPCRプライマーを用いて定量的PCRにてメチル化DNAの定量的検

出を行った。

4. 研究成果

最終的に平成20年度までに集積された症例のうち正常コントロール20例、肺癌を合併していない塵肺症例67例、塵肺肺癌症例11例の症例について解析および評価が可能であった。塵肺肺癌症例においては他の症例に比較して検討を行った5遺伝子のうち少なくともいずれか一つにメチル化が生じている頻度が有意に高い ($p=0.0006$) ことが確認できた。さらに、塵肺患者のうち5遺伝子のうち少なくともいずれか一つにメチル化が認められた場合肺癌を合併しているリスク比は9.77 ($p=0.009$) と高率であった。また、塵肺患者においては塵肺暴露歴が長いほど血清中遊離DNAのメチル化の頻度が高い傾向が認められ、特に30年以上の暴露歴のあるものにおいて5遺伝子のうち少なくともいずれか一つにメチル化が認められる頻度が有意に ($p=0.017$) 高いものであった。以上より、塵肺患者の血清中に遊離するDNAのメチル化の検出が肺癌合併の補助診断として使用できる可能性が示唆された。

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 1件)

①梅村茂樹、藤本伸一、平木章夫、玄馬顕一、瀧川奈義夫、藤原慶一、藤井昌学、梅村啓史、佐藤守、田端雅弘、上岡 博、木浦勝行、岸本卓巳、谷本光音

Aberrant promoter hypermethylation in serum DNA from patients with silicosis、Carcinogenesis、第29巻、1845-1849、2008年、査読有

[学会発表] (計 2件)

①藤本伸一、岸本卓巳

珪肺症患者の血清DNAを用いた癌抑制遺伝子のメチル化の解析、第56回日本職業・災害医学会学術大会、2008年11月、東京

②梅村茂樹、田端雅弘、肺がんにおける内視鏡下での分子生物学的アプローチ 小型肺癌の診断における血清DNAメチル化測定の有用性、第32回日本呼吸器内視鏡学会学術集会、2008年6月、大阪

[その他]

<http://www.med-gakkai.com/okaninai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田端 雅弘 (TABATA MASAHIRO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・准教授
研究者番号：30243504

(2) 研究分担者

木浦 勝行 (KIURA KATUYUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：10243502

谷本 安 (TANIMOTO YASUSHI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：60284098

瀧川 奈義夫 (TAKIGAWA NAGIO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：60325107

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

梅村 茂樹 (SHIGEKI UMEMURA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院
院生

岸本 卓巳 (TAKUMI KISHIMOTO)

独立行政法人労働者健康福祉機構 岡山労
災病院・副院長