

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791109

研究課題名（和文） 前立腺癌の悪性度に対する新規バイオマーカーの検索

研究課題名（英文） A new biomarker for the aggressiveness of prostate cancer

研究代表者

中山 雅志（NAKAYAMA MASASHI）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40379178

研究成果の概要：

現在、前立腺癌の治療法は多様化している。治療法を選択する際、最も重要な指標は癌の病理学的悪性度である。本研究では、新規マーカー遺伝子のプロモーター領域のメチル化が前立腺癌の病理学的悪性度を反映するかどうか検討を行なった。

cDNA Microarray より得られた新規バイオマーカー候補遺伝子のメチル化について病理組織検体を用いて解析した。しかし、有用な新規バイオマーカーを同定することはできなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌、バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

現在、前立腺癌の治療法は多様化している。手術、放射線治療、アンドロゲン除去療法以外にも、癌病巣が小さくかつ悪性度の低い癌に対しては無治療経過観察なども選択肢の一つとなる。治療法を選択においては、癌の病期以外に患者の年齢や全身状態など様々な要素が考慮される。現在、治療選択における最も重要な要素は、癌の病理学的悪性度を示す Gleason score である。

前立腺癌は有効な画像検査法がないため、

診断は系統的生検によって行われる。従って、癌が存在しているにもかかわらず、生検組織として採取されない **sampling error** の可能性が避けられない。また、前立腺癌は前立腺組織中に多数箇所存在することが多く、生検にて癌が検出された場合でも、生検標本中の癌が前立腺組織中に存在する癌の全貌を表しているとは限らない。実際、診断時の生検標本における Gleason score は、全摘標本における Gleason score と約 30%において異なることが報告されている。また、Gleason score は病理医の主観に頼る点が大きく、病

理医間で診断が異なる場合もある。

つまり、生検標本の病理組織診断以外で、客観的な評価が可能な前立腺癌の悪性度に対する診断法の開発が望まれている。

近年、前立腺癌を含む多くの癌において、特定の遺伝子のプロモーター領域にメチル化が認められることが報告されている。遺伝子のプロモーター領域のメチル化は、遺伝子の発現に関与しているため、発癌との関連が示唆されている。また、遺伝子のプロモーター領域のメチル化は、癌の診断に対するバイオマーカーとしても期待されている。

以上より、本研究では遺伝子のプロモーター領域のメチル化が、前立腺癌の悪性度に対する新規バイオマーカーになるか検討を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子のプロモーター領域のメチル化が前立腺癌の悪性度に対する新規バイオマーカーとなりうるか検討する。まず、前立腺癌組織より抽出した DNA を用いて、新規マーカー遺伝子のメチル化が癌の悪性度の指標となるか検討する。

新規バイオマーカー候補遺伝子の選出は、同一前立腺において悪性度の高い癌と低い癌が存在した症例より、それぞれの病変から抽出した RNA を用いて行った cDNA Microarray 結果を用いて行う。

更に尿や生検洗浄液を用いて新規マーカー遺伝子のメチル化が前立腺癌の病理学的悪性度を反映するかどうかに関して前立腺全摘除術を施行した症例を対象として検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) cDNA Microarray による候補遺伝子の選別

同一前立腺より悪性度の高い癌病変と低い癌病変を Laser microdissection 法を用いて切除し、RNA を抽出した。RNA を増幅した後、cDNA Microarray にて RNA の発現レベルを悪性度の高い癌病変と低い病変との間で比較検討した。悪性度の高い病変で発現が抑制されている遺伝子を新規バイオマーカー候補とし、Web 上のデータベースを用いて DNA のメチル化が遺伝子の発現に関与する遺伝子群を抽出した。

### (2) 前立腺癌組織中の候補遺伝子のメチル化の検討

前立腺癌組織における上記候補遺伝子のメチル化に関して検討を行った。

メチル化の検討は Methylation specific PCR 法を用いた。プライマーの設計は、Methyl Primer Expression ソフトウェア v1.0

(Applied Biosystem 社) を使用した。

市販の Universal Methylated DNA (フナコシ社) をポジティブコントロールとして用いて、PCR の条件設定を行った。

次に、前立腺癌組織中の候補遺伝子のメチル化の検討を行った。ホルマリン固定・パラフィン包埋された前立腺全摘標本より microdissection 法を用いて、悪性度の高い癌病変、悪性度の低い癌病変をそれぞれ 10 病変、非癌部 8 病変の計 28 病変を切除し、DNA を抽出した。データベースより抽出した遺伝子群のメチル化を Methylation specific PCR 法にて検討し、候補遺伝子の絞込みを行った。

### (3) 尿や生検洗浄液中の候補遺伝子のメチル化と癌の悪性度との検討

さらに尿や生検洗浄液を用いて、上記で得られた候補遺伝子のメチル化を調べ、前立腺癌組織の悪性度との関連を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) cDNA Microarray による候補遺伝子の選別

11 症例において、同一前立腺より悪性度の異なる癌病変を Laser microdissection 法を用いて切除し、RNA を抽出し増幅後 cDNA Microarray にて RNA の発現レベルを悪性度の高い病変と低い病変との間で比較検討した。結果、悪性度の低い癌に比べ高い癌で発現が 0.5 倍以下に低下していた遺伝子は合計 279 遺伝子あり、うち既知の遺伝子は 232 遺伝子であった。232 遺伝子の中で、プロモーター領域に CpG islands を有する遺伝子は 109 遺伝子であった。

これらの遺伝子に関して、これまでプロモーター領域のメチル化に関する報告がないか web 上で検索したが、調べえた限りにおいて報告は認められなかった。

次に、109 遺伝子の中の悪性度の高い癌と低い癌との発現比が比較的大きな遺伝子群より、プロモーター領域に CpG island を有する遺伝子を抽出し、Methylation specific PCR 用のプライマーを計 50 設定した。

市販の Universal Methylated DNA をポジティブコントロールとして用いて、PCR の条件設定を行った。50 のプライマーより、10 遺伝子を候補遺伝子とし選出した。

10 種の遺伝子は、sialyltransferase1 (SIAT1)、FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FOSBGOS3-2)、early growth response 1 (EGR1)、decidual protein induced by progesterone (C10orf10)、protein tyrosine phosphatase, receptor type, M (PTPRM)、phosphorylase kinase, gamma 2 (PHKG2)、sorbitol dehydrogenase (SORD)、WAP

four-disulfide core domain 2(WFDC2)、glycophorin C(GYPC)、immunoglobulin heavy constant gamma 3(IGHG3)とした。

## (2) 前立腺癌組織中の候補遺伝子のメチル化の検討

前立腺癌の手術にて摘除された前立腺標本より悪性度の高い癌病変、悪性度の低い癌病変をそれぞれ 10 病変ずつ、非癌部を 8 病変の計 28 病変を切除し、DNA を抽出した。いずれの病変もメチル化の検討に十分量の DNA を抽出することができた。上記で選出した 10 遺伝子に関して、Methylation specific PCR 法を用いてプロモーター領域のメチル化を検討した。

メチル化の判定は、PCR products を 3%アガロースゲルで電気泳動し、バンドの有無で行った。

各遺伝子のメチル化の結果は、sialyltransferase1(SIAT1)遺伝子においては、high grade cancer の 10 例中 1 例 (10%) にメチル化を認めたが、low grade cancer10 例中 0 例 (0%) とメチル化は認められなかった。しかし、非癌部 8 例中 1 例 (12.5%) にメチル化を認めた。

FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B(FOSBGOS3-2)遺伝子においては、high grade cancer の 10 例中 0 例 (0%)、low grade cancer10 例中 0 例 (0%)、非癌部 8 例中 0 例 (0%) と前立腺組織におけるメチル化は認められなかった。

early growth response 1(EGR1)遺伝子においては、high grade cancer の 10 例中 1 例 (10%) にメチル化を認めたが、low grade cancer10 例中 0 例 (0%) とメチル化は認められなかった。しかし、非癌部 8 例中 1 例 (12.5%) にメチル化を認めた。

decidual protein induced by progesterone(C10orf10)遺伝子においては、high grade cancer の 10 例中 1 例 (10%) にメチル化を認めたが、low grade cancer は 10 例中 0 例 (0%)、非癌部 8 例中 0 例 (0%) とメチル化は認められなかった。

protein tyrosine phosphatase, receptor type, M(PTPRM)遺伝子においては、high grade cancer の 10 例中 0 例 (0%)、low grade cancer10 例中 0 例 (0%)、非癌部 8 例中 0 例 (0%) と今回の検討では前立腺組織中にメチル化は認められなかった。

phosphorylase kinase, gamma 2(PHKG2)遺伝子においては、high grade cancer の 10 例中 2 例 (20%) にメチル化を認め、low grade cancer10 例中 0 例 (0%) とメチル化は認められなかった。しかし、非癌部 8 例中 1 例 (12.5%) にメチル化を認めた。

sorbitol dehydrogenase(SORD)遺伝子においては、high grade cancer の 10 例中 1 例(10%)、

low grade cancer10 例中 1 例 (10%) にメチル化を認めたが、非癌部 8 例中 0 例 (0%) とメチル化は認められなかった。

WAP four-disulfide core domain 2(WFDC2)遺伝子においては、high grade cancer の 10 例中 4 例 (40%)、low grade cancer10 例中 1 例 (10%) にメチル化を認めた。一方、非癌部では 8 例中 1 例 (12.5%) にメチル化を認めた。

glycophorin C(GYPC)遺伝子においては、high grade cancer の 10 例中 4 例 (40%)、low grade cancer10 例中 2 例 (20%) にメチル化を認めた。非癌部でも 8 例中 2 例 (25.0%) にメチル化を認めた。

immunoglobulin heavy constant gamma 3(IGHG3)遺伝子においては、high grade cancer の 10 例中 4 例 (40%)、low grade cancer10 例中 3 例 (30%) にメチル化を認めた。非癌部では 8 例中 3 例 (37.5%) にメチル化を認めた。

以下に、結果をまとめる。

Table 1. 前立腺組織における各遺伝子のメチル化の頻度

	High grade	Low grade	benign
SIAT1	1/10 (10.0%)	0/10 (0.0%)	1/8 (12.5%)
FOSB GOS3-2	0/10 (0.0%)	0/10 (0.0%)	0/8 (0.0%)
EGR1	1/10 (10.0%)	0/10 (0.0%)	1/8 (12.5%)
C10orf10	1/10 (10.0%)	0/10 (0.0%)	0/8 (0.0%)
PTPRM	0/10 (0.0%)	0/10 (0.0%)	0/8 (0.0%)
PHKG2	2/10 (20.0%)	0/10 (0.0%)	1/8 (12.5%)
SORD	1/10 (10.0%)	1/10 (10.0%)	0/8 (0.0%)
WFDC2	4/10 (40.0%)	1/10 (10.0%)	1/8 (12.5%)
GYPC	4/10 (40.0%)	2/10 (20.0%)	2/8 (25.0%)
IGHG3	4/10 (40.0%)	3/10 (30.0%)	3/8 (37.5%)

以上の結果より、WFDC2 と GYPC が新規バイオマーカーの候補遺伝子と考えられたが、両者を組み合わせても、sensitivity の増加は認められず、むしろ specificity は低下した。また、両者に PHKG2 を加えても検出感度の改善は認められなかった。

今回、悪性度の高い病変と低い病変でメチル化の頻度を検討したが、両群で有意差を認める遺伝子は同定できなかった。また、複数の遺伝子を組み合わせても、悪性度を予測することはできなかった。

## (2) 尿や生検洗浄液中の候補遺伝子のメチル化と癌の悪性度との検討

さらに、尿や生検洗浄液を用いて候補遺伝子のメチル化を調べ、前立腺全摘標本における癌の悪性度を比較検討する予定であった。

上記の遺伝子のメチル化に対するプライマーを用いて Methylation specific PCR 法を施行したが、尿から抽出した DNA を用いた場合、同一検体を用いて数回の実験を行った場合に再現性のある結果を得ることはできなかった。一方、生検洗浄液より抽出した DNA を用いた場合は、再現性のある Methylation specific PCR の結果を得ることができた。しかし、生検洗浄液と同一症例における癌組織中の遺伝子のプロモーター領域のメチル化は検討は現時点で施行できていないため、更に今後の検討が必要である。

今回の検討では適切な候補遺伝子が同定できなかったため、その次の段階である尿中または政権洗浄液中の候補遺伝子のメチル化の検討は行うことができなかった。

以上より、今回の検討においては残念ながら、前立腺癌の悪性度に対する新規バイオマーカーを発見することはできなかった。しかし、検討結果は新規バイオマーカーの存在を否定するものではない。今回検討できなかった遺伝子のメチル化や複数の遺伝子のメチル化の組み合わせにより、遺伝子のプロモーター領域のメチル化が、前立腺癌の悪性度を予測する新規バイオマーカーとなる可能性を期待して、今後も本研究を継続していきたいと思う。

#### 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)  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中山 雅志 (NAKAYAMA MASASHI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：40379178

(2) 研究分担者 なし  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし  
( )

研究者番号：