

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591860

研究課題名（和文）尿中メチル化DNA測定による新しい前立腺癌診断キットの開発

研究課題名（英文）Developing new diagnostic kit for prostate cancer through detecting methylated DNA in urine sample

研究代表者

榎田 英樹 (ENOKIDA HIDEKI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師

研究者番号：80347103

研究成果の概要（和文）：我々は前立腺癌でメチル化による発現抑制が見られる遺伝子をリストアップしその中でAPC、GSTP1、MT1Gに注目して、組織検体や尿検体からDNAを抽出しメチル化特異的PCR法で各遺伝子のプロモーター領域のメチル化を測定した。その結果、MT1Gメチル化は病理学的ステージと有意に相関した。これらのマーカーは前立腺癌と良性の前立腺肥大症を区別し、診断マーカーやステージングマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We screened methylated DNA by using oligomicroarray analyses of prostate cancer cell lines treated by a demethylating agent and focused on APC, GSTP1, and MT1G. Prostate tissues and urine samples were used for extracting their DNA, which were subjected to methylation specific PCR. The methylation status of MT1G was significantly associated with tumor stage. These markers may have potential abilities to distinguish prostate cancer from benign prostate hypertrophy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：泌尿器腫瘍学

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、尿、メチル化、診断

1. 研究開始当初の背景

前立腺特異的抗原（PSA）は検査法として感度は優れているが特異度が低く、多くの健常者が癌であることを否定するために、不快な生検検査を余儀なくされている。実

際、前立腺針生検による前立腺癌検出率は20-30%に過ぎず、医療経済上の観点からも満足できない。また前立腺癌患者において癌の進行度（ステージ）は治療方針を決定するのにきわめて重要であるが、初診時 PSA 値、

画像診断、触診および生検所見を用いたステージ予測と実際の手術病理所見との一致は50-60%に過ぎない。このため感度・特異度共に優れた非侵襲的な腫瘍マーカーの早急な開発が望まれる。

2. 研究の目的

近年、前立腺癌では癌抑制遺伝子や細胞間接着分子関連遺伝子のプロモーター領域がメチル化してその発現が抑制されていることが報告されている。我々は本研究において、前立腺癌でメチル化の頻度が高い遺伝子のプロモーター領域のメチル化を測定し、前立腺癌の診断を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) メチル化測定候補遺伝子プロファイルの作成: 脱メチル化剤で処理した前立腺細胞株で cDNA マイクロアレイ解析を行い、前立腺癌でメチル化している可能性がある遺伝子のリストを作成した。
- (2) 前立腺癌組織および尿中メチル化DNAの測定: パラフィン包埋前立腺癌組織および尿中DNAの抽出と重亜硫酸塩処理。メチル化特異的PCRによるメチル化DNAの定量的測定。
- (3) 統計解析

4. 研究成果

cDNA マイクロアレイでは、前立腺癌細胞株 LNCap・PC3 細胞の双方で脱メチル化剤 (5-aza-dC) 添加後に 1.5 倍以上発現が増加している遺伝子が 18 個検出された。adenomatous polyposis coli (APC), multidrug resistance one (MDR1), glutathione S-transferase pi (GSTP1) の前立腺癌におけるメチル化の頻度は病理学的悪性度に相関していたが、喫煙者においても有意に相関が見られ癌化の一因としての喫煙の影響が考えられた。Metallothioneins (MTs) は重金属との結合親和性が高いシステインリッチな低

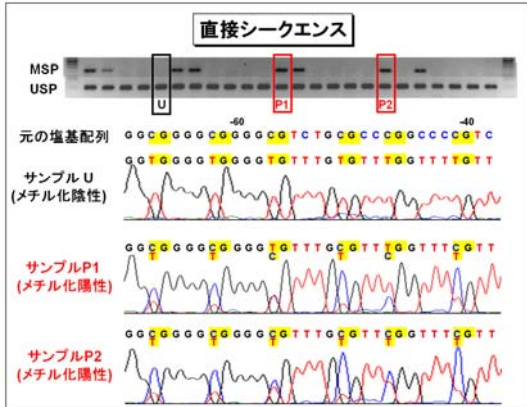
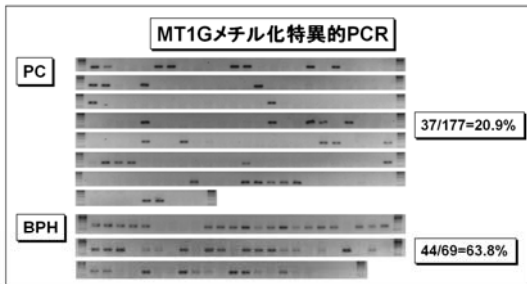
分子タンパクである。5-aza-dC 添加前後の PC 細胞株において、各 MTs の isoform の発現を RT-PCR にて測定したところ MT1G の発現パターンは特徴的であった。早期癌モデルである LNCap では 5-aza-dC 添加前後に MT1G の発現は変化せずメチル化の影響はないと考えられたが、ホルモン非依存性の PC3 と DU145 では 5-aza-dC 添加後に MT1G 発現が著明に上昇しておりメチル化の影響を受けていた。そこで臨床検体において MT1G の MSP を試行した結果、MT1G のメチル化陽性は BPH では 63.8% (69 例中 44 例)、PC では 20.9% (177 例中 37 例) に検出され有意差が認められた。代表的なサンプルを直接シーケンスして確認したところ MSP 陽性サンプルでは CG 配列部に C のピークが観察された。進行性 PC におけるメチル化陽性の頻度は限局性 PC に比べて有意に高かった。また免疫染色では ssDNA 陽性細胞数はメチル化陰性群では陽性群に比べて有意に高かったが (各 5.99 ± 1.35 , 4.08 ± 3.58 , $p=0.011$)、PCNA 陽性細胞数には差が認められなかった。前立腺癌の進行に MT1G のメチル化が密接に関与する可能性が示唆された。さらに我々は前立腺マッサージ後の尿から DNA の抽出し重亜硫酸塩処理を行い、GSTP1 遺伝子のメチル化を測定したところ、早期前立腺癌 60 例中 13 例 (感度 21.7%) において陽性であった。一方、良性疾患である前立腺肥大症では 30 例中 1 例のみが陽性 (特異度 96.7%) であった。前立腺マッサージ後尿中 DNA を用いた前立腺癌診断は技術的に可能であると思われた。現在、感度の向上に向けて実験を継続中である。

前立腺癌におけるメチル化遺伝子

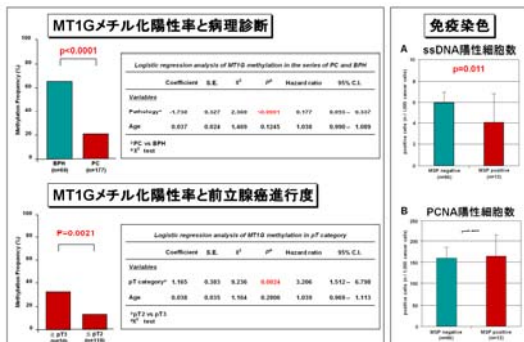
#	Gene symbol	メチル化頻度*	報告数
1	GSTP1	70-95%	91
2	APC	70-95%	30
3	AR	<20%	22
4	CD44	20-70%	14
5	MGMT	20-70%	10

6	MDR1	70-95%	9
7	EDNRB	< 20%	9
8	ESR	20-70%	11
9	PTGS2	20-70%	7
10	CDKN2A	< 20%	6
11	RARB	70-95%	6
12	TIG1	70-95%	6
13	CDH1	0-70%	5
14	DAPK1	< 20%	5
15	CCDN2	< 20%	4
16	RASSF1	70-95%	4
17	TIMP3	< 20%	4
18	CRBP1	70-95%	3

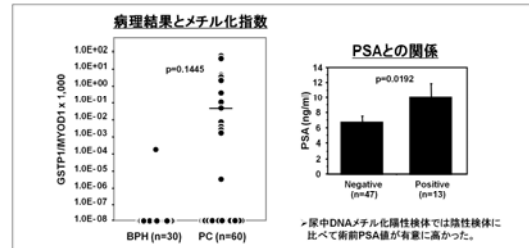
メチル化特異的PCR



MT1G メチル化測定



GSTP1 メチル化測定



	pT category			Gleason score		Total
	T1	T2	T3	≤6	≥7	
Number of PC sample	3	33	24	21	39	60
positive methylation of GSTP1 promoter	1	5	7	5	8	13
negative methylation of GSTP1 promoter	2	28	17	16	31	47
Percentage for positive methylation	33.3%	15.1%	29.2%	23.8%	20.5%	21.7%

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

1. Kawakami K, Yamamura S, Hirata H, Ueno K, Saini S, Majid S, Tanaka Y, Kawamoto K, Enokida H, Nakagawa M, Dahiya R. 査読有。 Secreted frizzled-related protein-5 is epigenetically downregulated and functions as a tumor suppressor in kidney cancer. Int J Cancer. 2011;128: 541-550.
2. Toki K, Enokida H, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, Yoshino H, Uchida Y, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。 CpG hypermethylation of cellular retinol-binding protein 1 contributes to cell proliferation and migration in bladder cancer. Int J Oncol. 2010;37:1379-1388.
3. Matsumoto M, Kawakami K, Enokida H, Toki K, Matsuda R, Chiyomaru T, Nishiyama K, Kawahara K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。 CpG hypermethylation of human four-and-a-half LIM domains 1 contributes to migration and invasion activity of human bladder cancer. Int J Mol Med. 2010;26: 241-247.
4. Kawakami K, Hirata H, Yamamura S, Kikuno

- N, Saini S, Majid S, Tanaka Y, Kawamoto K, Enokida H, Nakagawa M, Dahiya R. 査読有。 Functional significance of Wnt inhibitory factor-1 gene in kidney cancer. Cancer Res. 2009;69:8603-8610.
5. Mori K, Enokida H, Kagara I, Kawakami K, Chiyomaru T, Tatarano S, Kawahara K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。 CpG hypermethylation of collagen type I alpha 2 contributes to proliferation and migration activity of human bladder cancer. Int J Oncol. 2009;34:1593-1602.
6. 榎田英樹、山形仁明、松元貢、西山賢龍、新村研二、中川昌之。 査読無。「尿中メチル化 DNA の検出による前立腺癌の診断」日本腎泌尿器疾患予防医学研究会誌 2008 年 16 巻 1 号 89-92 頁
7. Enokida H, Nakagawa M. 査読無。 Epigenetics in bladder cancer. Int J Clin Oncol. 2008; 13:298-307.
8. Kagara I, Enokida H, Kawakami K, Matsuda R, Toki K, Nishimura H, Chiyomaru T, Tatarano S, Itesako T, Kawamoto K, Nishiyama K, Seki N, Nakagawa M. 査読有。 CpG hypermethylation of the UCHL1 gene promoter is associated with pathogenesis and poor prognosis in renal cell carcinoma. J Urol. 2008;180:343-351.

[学会発表] (計 3 件)

1. 榎田英樹「尿中メチル化 DNA の検出による前立腺癌の診断」16 回日本腎泌尿器予防医学研究会。2008 年 7 月 13 日、大阪。
2. 榎田英樹「前立腺癌の診断における Methylation Score の可能性」第 95 回日本泌尿器科学会総会、2008 年 4 月 16 日、大阪。
3. 榎田英樹「前立腺マッサージ後の尿中 DNA メチル化測定による前立腺癌の診断」第 95 回

日本泌尿器科学会総会 2008 年 4 月 16 日、大阪。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎田 英樹 (ENOKIDA HIDEKI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師
研究者番号: 80347103

(2) 研究分担者

中川 昌之 (NAKAGAWA MASAYUKI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 90164144

川元 健 (KAWAMOTO KEN)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・研究員
研究者番号: 80363620
(H21→H22: 連携研究者)

(3) 研究協力者

千代丸剛
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生
鏑野秀一
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生
吉野裕史
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生