

平成 22年 6月 10日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790738

研究課題名 (和文) 横紋筋肉腫におけるインプリンティング異常の血清診断

研究課題名 (英文) Detection of imprinting abnormalities in rhabdomyosarcoma patients using tumor and serum DNA.

研究代表者

菊地 顕 (KIKUCHI KEN)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40453104

研究成果の概要 (和文)：

Melting Curve Analysis 法は、簡便かつ特異性が高く、標的遺伝子の methylation の分析に有用であった。横紋筋肉腫細胞株、腫瘍組織の両方で imprinting center の異常メチレーション、すなわち IGF2/H19 の imprinting 異常を検出できた。腫瘍組織において、imprinting 異常は IGF2 mRNA 発現に関与している事が示唆された。さらに、血清からも腫瘍の imprinting 異常を検出することができた。

研究成果の概要 (英文)：

In RMS cell lines and RMS tumor samples, we were able to detect a methylation abnormality in the imprinting center, in other words, imprinting abnormalities in IGF2 and H19 by Melting Curve Analysis. In RMS tumor samples, it was suggested that imprinting abnormalities correlate with the expression of IGF2 mRNA. Furthermore, we established a method to detect imprinting abnormalities in IGF2 and H19 in serum DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：(1)横紋筋肉腫、(2)インプリンティング、(3)IGF2、(4)血清遊離 DNA、(5)H19

1. 研究開始当初の背景

横紋筋肉腫 (RMS) は小児でもっとも頻度の多い軟部悪性腫瘍で、以前より第 11 番染色体の短腕 11p15 の LOH (ヘテロ接合性の消失) が報告され、11p15 領域に RMS の癌

抑制遺伝子の存在が示唆されていた (Cancer Biol Ther. 2002, 1(2):97-104)。これらの LOH の多くは母由来であり、親由来で発現に差のある遺伝子 (imprinting gene) と考えられた。

近年、この染色体座に imprinting gene である H19/IGF2 が見つかり、さらに 11p15.5 にある imprinting center の methylation が insulator CTCF の結合を抑制することで、IGF2 の発現をシスに亢進、H19 の発現をシスに抑制することがわかってきた (Nature. 2000, 405(6785):486-9)。インスリン様増殖因子 (Insulin-like Growth Factor; IGF) ファミリーは多くの悪性腫瘍で高発現が報告されており、腫瘍細胞の増殖に深く関与していると考えられている (Cancer Res. 2003, 63(16):5073-83)。我々は神経芽腫において IGF- I が MYCN mRNA を誘導し、さらに細胞増殖に関与していることを報告した (Misawa A, Hosoi H, et al. Cancer Res. 2000, 60(1):64-9)。

また RMS においても IGF が腫瘍増殖に強い関わりをもっている事 (J Clin Invest. 1994, 94(3):1235-4)、腫瘍発生に関与している事 (Int J Oncol. 2005, 27(4):1087-96) が報告されている。実際、我々は、横紋筋肉腫細胞株では正常筋組織、その他小児悪性腫瘍細胞株に比べ IGF2 が高発現している事を確認している (未発表データ)。

これらの結果は、RMS において、H19/IGF2 imprinting 異常、すなわち、11p15.5 imprinting center の methylation 異常が insulator CTCF を介して IGF2 の発現を亢進させ、RMS の増殖、発生に関与していることを示唆する。

いままで imprinting 異常の検出には父方 DNA、母方 DNA の SNP 多型、マイクロサテライト多型の差によって判断してきた。しかしこの場合、父母ともに同様の多型を持っていると評価不可能となり、感度に限界が出てくる。H19/IGF2 imprinting 異常は 11p15.5 imprinting center の methylation 異常に由来する事が知られている。そこで我々は Bisulphate 処理後の DNA の GC 比が methylation 程度によって差が生じることに着目し、腫瘍 DNA PCR 産物の融解温度の差により methylation 程度を測定する新たな手法、melting curve analysis 法の適応を着想した。この方法を用い 11p15.5 imprinting center の methylation を検索することで、DNA の親由来、つまり imprinting 異常を判別できる可能性を示唆する予備結果を得ている。

現在までに我々は、神経芽腫患児の血清 DNA を用いた MYCN 増幅判定法を開発し、神経芽腫 87 例での検討で、その感度 (100%) と特異度 (100%) の高さを報告した (Gotoh T, Hosoi H, et al. J Clin Oncol. 2005, 23(22):5205-10)。本研究ではこれらの経験を活かし、melting curve analysis 法を用いた血清 DNA による H19/IGF2 imprinting 異常の検出法を開発する。この方法が確立でき

ば、腫瘍摘出あるいは生検などの侵襲的外科的手術によることなく、より非侵襲的で簡便な血液検査で、H19/IGF2 imprinting 異常を検出でき、RMS の診断や新たな病期分類、また微小残存病変の検出と治療効果判定などに応用でき、患者の治癒と QOL の改善に活用できるものと期待できる。

2. 研究の目的

担癌患者の末梢血中には、がん細胞由来の遊離 DNA が存在する。本研究では、この血清中遊離 DNA (血清 DNA) に着眼し、RMS 患児の血清 DNA を用い、H19/IGF2 imprinting 異常を melting curve analysis 法という新たな手法を用いる事で、簡便、高感度に検出する方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) SYBR Green-1 real-time quantitative RT-PCR、 $\Delta \Delta C T$ 法を用い IGF2/H19 mRNA 発現量を検討する。

(2) Methylation specific PCR 法、COBRA 法、direct sequence 法、subcloning 法を用い 6th CTCF binding region の methylation 解析を行う。

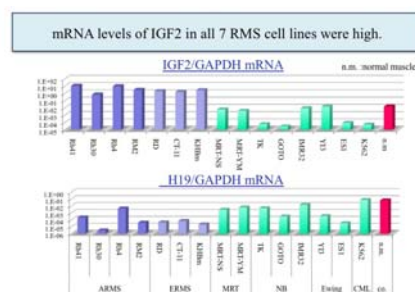
(3) Melting curve analysis 法と既知の方法の整合性の確認を行う。

(4) 臨床検体を用い Melting curve analysis 法で methylation の程度を測定、IGF2/H19 mRNA 発現との相関を検討する。

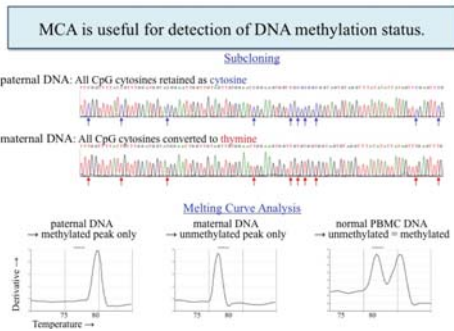
(5) 患者血清遊離 DNA を用い Melting curve analysis 法で methylation の程度を検討する。

4. 研究成果

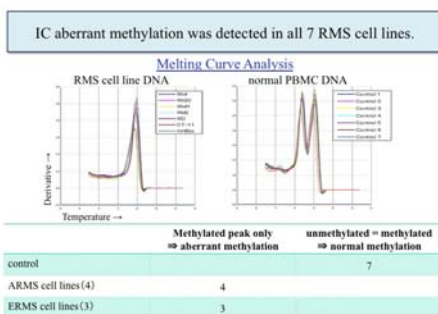
(1) RMS 細胞株 7 株全例で IGF2 が高発現していた。



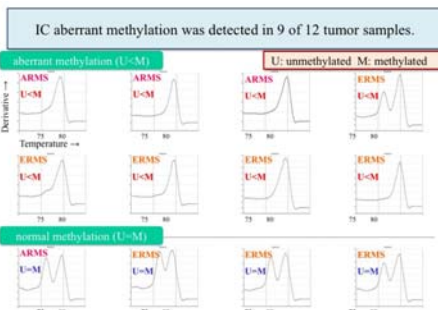
(2) Melting Curve Analysis 法は methylation 分析に使用可能であることが確認できた。



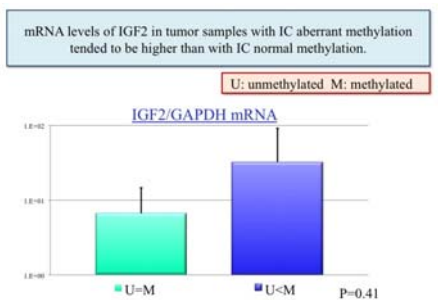
(3) RMS 細胞株 7 株全例で IGF2/H19 imprinting center の異常 methylation が認められた。



(4) RMS 腫瘍組織 12 例中 8 例で IGF2/H19 imprinting center の異常 methylation が認められた。

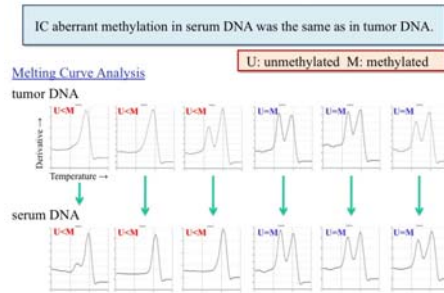


(5) IGF2 mRNA 発現は異常 methylation 例に高い傾向が認められた。



(6) 患者血清遊離 DNA においても腫瘍組織 DNA

と同様の異常 methylation を検出することができた。



Melting Curve Analysis 法は、簡便かつ特異性が高く、標的遺伝子の methylation の分析に有用であった。横紋筋肉腫細胞株、腫瘍組織の両者で imprinting center の異常メチレーション、すなわち IGF2/H19 の imprinting 異常を検出できた。腫瘍組織において、imprinting 異常は IGF2 mRNA 発現に参与している事が示唆された。さらに、血清からも腫瘍の imprinting 異常を検出することができた。

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)

Miyachi M, Kakazu N, Yagyu S, Katsumi Y, Tsubai-Shimizu S, Kikuchi K, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H. Restoration of p53 pathway by nutlin-3 induces cell cycle arrest and apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. Clinical cancer research. 査読あり. 15 巻, 2009 年, pp. 4077-4084

[学会発表] (計 2 件)

1. 菊地 顕. 横紋筋肉腫患者血清遊離DNAを用いた IGF2/H19 imprinting 異常の検出. 第 111 回日本小児科学会学術集会. 2008 年 4 月 26 日. 東京

2. Kikuchi K. Detection of IGF2 and H19 imprinting abnormalities in rhabdomyosarcoma patients using tumor and serum DNA. 40th International Society of Pediatric Oncology. 2008 年 10 月 2-6 日. Berlin, Germany

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 顕 (KIKUCHI KEN)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：40453104