

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790978
 研究課題名（和文）メチル化診断チップによる肺癌の分子診断法の確立と発癌リスク評価
 研究課題名（英文）Molecular diagnosis and carcinogenetic risk evaluation for lung cancer using methylation-specific DNA microarray
 研究代表者
 遠藤 誠（ENDO MAKOTO）
 山形大学・医学部・非常勤講師
 研究者番号：90420067

研究成果の概要（和文）：

繊維型 DNA チップにメチル化特異的プローブを搭載した「メチル化診断チップ」を作成し、肺癌手術検体の DNA を用いて 4 遺伝子の CpG 領域のメチル化率を定量的に解析した。*RUNX3* 遺伝子では扁平上皮癌よりも腺癌の癌部でメチル化率が有意に高く癌特異性が認められた。再発死亡例では癌部のメチル化率が高い結果であった。「メチル化診断チップ」を用いた肺癌のメチル化率の検索により予後不良群の同定が可能と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We developed a fiber-type DNA microarray on which methylated sequence probes were mounted, and quantitatively analyzed DNA methylation rates (MRs) of 4 cancer-related genes of CpG island using it. In recurrent group rates of methylated *RUNX3* was significantly higher than survivor. Analysis of DNA methylation status using DNA microarray could be a promising method for risk assessment in the recurrence of lung cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：メチル化、肺癌、メチル化診断チップ

1．研究開始当初の背景

(1) 遺伝子のメチル化

癌の発生・進展の過程では複数の癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常が蓄積している。近年のメチル化による発現制御の研究から、癌抑制遺伝子のエピジェネティックな制御すなわち DNA の構造異常を伴わずに（メチル化によって）不活化（発現抑制）されていることが明らかになった。

これまでの研究よりメチル化異常は癌の個性を規定しているばかりでなく、癌化のリスクに大きく関わっていることを示している。しかも、メチル化は点突然変異や欠失などの DNA の構造異常に比較して極めて高率に検出され、その多くで複数の癌抑制遺伝子のメチル化が検出されている。したがって、多くの遺伝子のメチル化の状態、程度を同時に解析できれば、癌の悪性度診断、予後予測、発癌のリスク評価などに極めて有用と考えられる。

DNA メチル化を中心とした遺伝子サイレンシング研究は、医療、医薬品開発において最も注目されている分野である。これまでのメチル化研究の結果から、癌組織においては通常複数の癌抑制遺伝子・癌関連遺伝子がメチル化を受けていること、メチル化は臓器特異的に発生、拡大することが確認され、メチル化を定量的に検出することが診断病理学に極めて有効であると考えられている。

(2) メチル化診断チップ

研究協力者（田村）は繊維型 DNA チップ（GenoPal™，三菱レイヨン社製）にメチル化

特異的および非メチル化特異的プローブを搭載した「メチル化診断チップ」を開発し、臨床検体のメチル化の状態を定量的に判定し、臨床応用にむけて基礎的検討を開始した。彼らがこれまでに解析してきた DNA メチル化により発現が制御される癌抑制遺伝子、癌関連遺伝子を中心に 22 遺伝子を搭載した「メチル化診断チップ」を作製した。

コントロール検体（0%，25%，50%，75%，100%メチル化 DNA）をテンプレートとして用いた検討で解析の定量性を確認し、検量線からメチル化率を算出することの妥当性を証明した。手術検体を用いた解析ではメチル化率 30%以上は癌に特異的な所見で、非癌組織に出現することはなかった。また、メチル化率 20%以上と判定された検体は、いずれの遺伝子についても MSP（methylation-specific PCR）の結果と完全に一致した。「メチル化診断チップ」と MSP の比較から、前者は定量性に優れ、癌特異的な高メチル化の検出に向いており、一方、後者は低メチル化も検出する感度に優れ、前者と組み合わせることによって発癌のリスク評価に応用可能と考えられる。

2．研究の目的

本研究は、繊維型 DNA チップ（GenoPal™，三菱レイヨン社製）にメチル化特異的および非メチル化特異的プローブを搭載した「メチル化診断チップ」を作成し、臨床検体のメチル化の状態を定量的に判定し、臨床応用することが目的である。

実際に手術で得られた肺癌組織材料を「メチル化診断チップ」および MSP 法により各組織亜型のサブグループ毎にチップに搭載した遺伝子のメチル化パターンを解析し、分子診断（診断自動化）の確立を目指す。

同時に担癌・非担癌患者の正常肺組織を用いて予後不良因子の解析や発癌リスク評価の可能性について検討する。

1) メチル化診断チップ GenoPal™（三菱レーヨン）に癌抑制遺伝子・癌関連遺伝子を搭載し、同遺伝子のコントロール検体の multiplex PCR 産物から得られた検量線を求め、各検体のメチル化率を算出する。

2) メチル化診断チップを用いて得られた肺癌患者における各搭載された遺伝子のメチル化パターンとメチル化率において、従来のメチル化検出法での結果と比較することにより、メチル化診断チップの定量性の信頼性を検証する。

メチル化診断チップで得られた解析結果が、定量的メチル化検出法 Real-time MSP 法で得られる実験結果と比較することにより、定量性および感度に優れているかを評価する。

3. 研究の方法

(1) 検体と処理方法

肺癌手術症例の摘出肺より病理組織診断用検体に加えて、分子診断用検体を informed consent を得たうえで 2-3 個採取し、1 個はマイクロダイセクション用にコンパウンドに包して凍結・保存する。

作成されたメチル化診断チップを用いて肺癌手術例 50 例とその対応する正常肺（計 100 チップ）を解析する。

(2) メチル化診断チップの解析

1) 凍結組織から DNA を抽出し、bisulfite 処理を行なう。癌抑制遺伝子・癌関連遺伝子

など 4 遺伝子・クローン（*LOX*, *p16*, *RUNX3*, *TIG1*）の転写に関わる CpG 領域を 5 組の multiplex PCR で増幅する。

2) PCR プライマーには CpG を含まないように設定することで、メチル化 DNA、非メチル化 DNA を同時に増幅できる。この際、一方のプライマーの 5' 端を Cy5 で、他方はリン酸標識しておく。PCR 産物を strandase 処理することで、Cy5 標識一本鎖 DNA を得る。専用の chamber 内で、繊維型 DNA チップ GenoPal™ の繊維内に充填したメチル化特異的および非メチル化特異的プローブ（60-80bp 程度の長さで、CpG あるいは TpG を 10 箇所程度含む）とハイブリ反応を行う。各遺伝子につき 1 対（メチル化特異的、非メチル化特異的）のプローブが搭載されている（4 遺伝子解析用チップでは 8 プローブ=8 スポット）。洗いの後、専用の検出器で各スポット上の Cy5 蛍光量を測定する。

3) コントロール検体（universally methylated DNA と universally unmethylated DNA の 0%, 25%, 50%, 75%, 100% 混合 template）の multiplex PCR 産物から得られた検量線 standization curve からメチル化率を算出する。

(3) Real-time MSP 法

手術検体から DNA を抽出、Bisulfite 処理をしたものを Real-time PCR にて増幅する。PCR 産物を生成、ハイブリダイゼーション、検出、解析した。解析は standization curve からメチル化率を算出する。

(4) 評価方法

1) 各遺伝子の癌部と非腫瘍部組織のメチル化率を求めるが、Real-time MSP 法では、cut-off 値によってメチル化率が異なることが予想される。メチル化診断チップで得られ

たメチル化率と従来の MSP 法でのメチル化率を比較することにより適正な cut-off 値を設定する。

2) 各遺伝子のメチル化パターンを比較し、肺癌の各組織亜系と臨床病理学的因子を比較検討する。これによりメチル化診断チップの結果を肺癌における予後予測因子や悪性度診断への応用が可能であるかを評価する。

4. 研究成果

(1) 肺癌組織におけるメチル化診断チップの実験用プライマーの作製

メチル化診断チップ GenoPal™ (三菱レーヨン) 注入用のプローブ、Cy5 標識プライマー、リン酸化標識プライマー作製を行った。癌抑制遺伝子・癌関連遺伝子のプローブを作成し、同遺伝子のコントロール検体の multiplex PCR 産物から得られた検量線を求め、最適なプローブかどうかを検討した。その結果、4 遺伝子の中から *RUNX3* 遺伝子の評価可能な癌抑制遺伝子と判断した。

(2) メチル化診断チップ GenoPal™ を用いた肺癌手術検体のメチル化解析

対象：肺癌手術例 50 例 (腺癌 25 例、扁平上皮癌 25 例) とその対応する非腫瘍組織において、*RUNX3* 遺伝子プロモーター領域近傍のメチル化をメチル化診断チップ GenoPal™ を用いて定量的に解析した。方法：手術検体から DNA を抽出、Bisulfite 処理をしたものを PCR にて増幅した。PCR 産物を生成、strandase 処理を行い、メチル化チップに搭載したプローベとハイブリダイゼーションさせ、検出、解析した。解析は standization curve からメチル化率を算出した。結果：*RUNX3* 遺伝子のメチル化率において、腺癌の癌部では 0-78.40% (平均 20.26%)、非癌部で

は 0-54.80% (平均 7.36%)、扁平上皮癌の癌部では 0-33.70% (平均 6.22%)、非癌部では 0-92.50% (平均 9.54%) であった。結論：*RUNX3* 遺伝子は扁平上皮癌よりも腺癌の癌部でメチル化率が有意に高く ($p<0.03$)、いずれの非癌部組織よりも高く、癌特異性があると考えられた。

(3) メチル化診断チップの定量性評価 (real-time-MSP 法との比較)

RUNX3 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を real-time quantitative methylation-specific PCR 法を用いて定量的に測定し、メチル化診断チップで得られたメチル化率と定量性について比較検討した。結果：real-time-MSP では肺癌部のメチル化率は 0.03- 57.71% (平均 8.50%)、非癌部では 0-12.29% (平均 2.44%) と癌部で有意に高い結果であった ($p<0.01$)。MSP 法を用いた *RUNX3* 遺伝子のメチル化解析の結果と照合し、cut-off 値は >10 に設定した。

組織型別では、腺癌の癌部のメチル化率は 0-57.71% (平均 8.50%)、非癌部では 0-12.29% (平均 2.44%) と癌部で有意に高い結果であった ($p<0.01$)。

(4) メチル化パターンと臨床病理学的因子の検討

RUNX3 遺伝子のメチル化率を再発死亡例 ($N=23$)、生存例 ($N=73$) に分けて比較検討した。同一検体の非癌部のメチル化率は $2.57 \pm 0.41\%$ であった。再発死亡例では $16.49 \pm 3.47\%$ 、生存例では $5.54 \pm 0.95\%$ で、有意に再発死亡例で癌部におけるメチル化率が高い結果であった ($p<0.01$)。

この結果から、病理病期 I 期の群において癌部のメチル化率を定量的に調べることで、予後不良群を同定でき、治療法の計画

を変え、肺癌全体の予後を改善させる可能性が考えられた。

(5) 考察

非小細胞肺癌の臨床検体のメチル化の状態を「メチル化診断チップ」を用いて、メチル化率の定量的な解析が可能であった。肺腺癌において *RUNX3* 遺伝子のメチル化率は予後因子であり、メチル化チップはその検出方法として有用であった。今後、他の癌抑制遺伝子・癌関連遺伝子の適切なプローブを作成が臨床応用への課題である。

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)

6．研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 誠 (ENDO MAKOTO)
山形大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：90420067