

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 1 日現在

機関番号： 32713
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2009～2011
 課題番号： 21590797
 研究課題名（和文） H/H-MCA マイクロアレイを用いた食道癌治療法決定システムの開発
 研究課題名（英文） Identification of DNA methylation changes in esophageal cancer before/after chemoradiation therapy using an MCA-microarray and bisulfate pyrosequencing
 研究代表者
 伊東 文生（ITO H FUMIO）
 聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
 研究者番号： 90223180

研究成果の概要（和文）：今回我々は未知の遺伝子を含め、高メチル化/低メチル化異常を網羅的に解析する新たな手法を開発した。本研究には食道がんの治療効果に関連性のある新たなメチル化異常遺伝子を同定すべく、食道がん6症例（放射線化学療法前/後の腫瘍部/非腫瘍部生検12サンプル）を用い、CYP26C1遺伝子を網羅的メチル化解析から同定した。検証セットである食道がん34症例（124サンプル）を用い解析を行ったところ、CYP26C1遺伝子のメチル化は非腫瘍部と比較して有意に腫瘍部に高メチル化を認めた。

研究成果の概要（英文）：Tumor and adjacent normal tissue biopsy specimens were obtained before/after treatment from 34 patients (124 samples) treated with a uniform CRT protocol. We analyzed genomewide DNA methylation of 12 non-treated test samples (T and matched ADJ: 6 each) by methylated CpG island amplification and microarray (MCAM) method, and selected candidate genes that were highly methylated in T compared to ADJ. CYP26C1 was selected by unsupervised hierarchical clustering after MCAM in test samples, and was also ranked in the top 5 of both molecular & cellular function networks as a drug metabolism category. CYP26C1 DNA methylation was significantly higher in T than ADJ in both test and validation samples. CYP26C1 has a CpG island in promoter area, which is highly methylated in T of ESCC patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード： 食道癌、治療、化学療法、効果予測、網羅的メチル化解析

1. 研究開始当初の背景

食道がんの治療は「手術療法」又は「放射線化学療法」であるが、放射線治療後の救済手術療法が悲惨な成績であることから、現在では化学療法の先行後に「手術療法」もしくは「放射線化学療法」を選択している。しかし、食道がんにおける臨床的な最大の問題点は化学療法の効果予測が出来ないことにある（化学療法は限られた患者には非常に効果が高いが、そうでない患者には貴重な外科治療へのタイミングを失うことになり、悲惨な予後をもたらすことになる）。今回我々は未知の遺伝子を含め、高メチル化/低メチル化異常を網羅的に解析する新たな手法を開発した。すでに遺伝子メチル化異常が抗腫瘍剤効果に重要な関連性があることが報告されはじめており（MGMT とニトロウレア系薬、CHFR と微小管阻害剤など）、まさに我々の解析方法は新たな「カギ」となるメチル化異常を網羅的に突きとめるのに適任といえる。

2. 研究の目的

本研究は進行食道がん症例に対し我々が新たに開発した低メチル化/高メチル化解析アレイ法（H/H-MCA マイクロアレイ法）を行い、薬剤治療（抗腫瘍剤）感受性との関連性を明らかにすることにより抗腫瘍効果予測診断に応用することを目的とする。我々のメチル化解析手法は臨床検体に特化して開発され、メチル化の「あり/なし」ではなく、「高メチル化/低メチル化」を高精度に評価可能である。既存の網羅的メチル化解析法を明らかに凌駕する超網羅的メチル化アレイ解析である。すなわちプロモーターCpGアイランド解析に限らずエクソン、イントロン、非コーディング領域をも含むものである。

3. 研究の方法

- (1) 食道がん生検サンプルから gDNA を抽出し、H/H-MCA マイクロアレイ法を用いて薬剤感受性に関連のある候補遺伝子解析を選出。
- (2) 定量性に優れる Pyrosequencing 法を用い、メチル化候補遺伝子に関して確認解析を行う。
- (3) データを統計学的解析し、食道がん治療決定システムのプログラムを完成させる。

4. 研究成果

網羅的なメチル化マイクロアレイ解析を行った後、クラスター解析により CYP26C1 遺伝子の同定がなされた。本遺伝子は、薬剤代謝に関連が示唆され、治療効果予測との関連性に期待をもてる可能性があるものの、その遺伝子機能の詳細報告は極めて少ない。しかしながら、この解析結果はテストセットサンプルだけでなく、臨床検証セットである食道がん 34 症例（放射線化学療法前/後の腫瘍部/非腫瘍部生検 124 サンプル）においても同様に、CYP26C1 遺伝子のメチル化は非腫瘍部と比較して有意に腫瘍部に高メチル化を認めた ($p < 0.04$, $T: 60.7 \pm 7.6$, $ADJ: 44.5 \pm 11.5$)。興味深いことにいくつかの症例では、非腫瘍部においても高メチル化異常を呈しており、腫瘍部と非腫瘍部ともにメチル化レベルの低下が確認された ($T: p < 0.01$ (45.1 ± 18.3 to 31.6 ± 14.9), $ADJ: p < 0.0001$ (43.8 ± 10.3 to 30.5 ± 13.8))。この現象は、遺伝子グローバルなメチル化の指標となる LINE1 メチル化においても、腫瘍、非腫瘍部ともにメチル化レベルの上昇が認められた ($ADJ: p < 0.004$ (54.5 ± 17.7 to 67.0 ± 7.0))。以上より、食道がんにおいて、とくに腫瘍部に高メチル化異常を示す CYP26C1 遺伝子の同定に成功した。また非腫瘍部においても多数症例は高メチル化を示していたが、放射線化学療法後には、腫瘍部、非腫瘍部ともにメチル化レベルが低下することが確認できた。この現象は LINE1 メチル化においても同様の結果であった。この解析結果は、食道がんの特性である同時多発病変の影響による可能性が示唆され、腫瘍部のみを摘出治療を根治的に行うことが出来たととしても、周囲の非腫瘍部に CYP26C1 の高メチル化や LINE1 の低メチル化を認める場合には十分な注意が必要である可能性が示唆された。

図 1 網羅的メチル化解析 (MCAM)

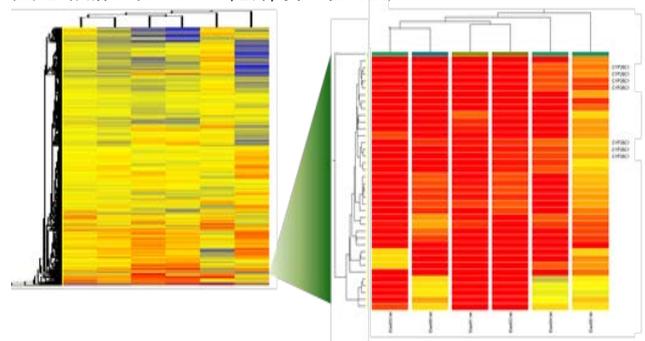
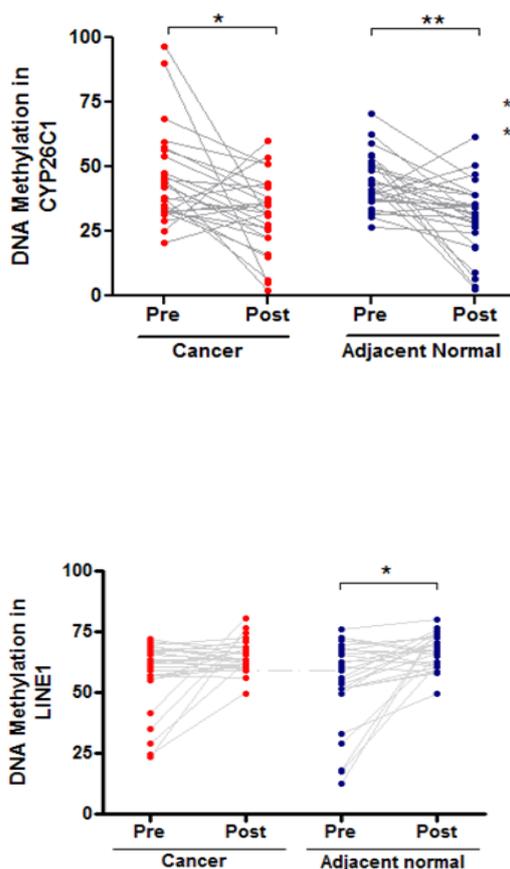


図2 検証セットにおける CYP26C1 遺伝子と LINE1 のメチル化解析
(Pre: 放射線化学療法前、Post: 放射線化学療法後)



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 5 件)

1. Tsuda T, Inaba H, Miyazaki A, Izawa N, Hirakawa M, Watanabe Y, Kitajima S, Hoshikawa Y, Gomi H, Kimura M, Itoh F. Prospective study of definitive chemoradiotherapy with S-1 and nedaplatin in patients with stage II / III (non-T4) esophageal cancer. *Esophagus* 8: 45-51, 2011. 査読 (有)
2. Watanabe Y, Castoro RJ, Kim HS, North

B, Oikawa R, Hiraishi T, Ahmed SS, Chung W, Cho M-Y, Toyota M, Itoh F, Estecio M R.H., Shen L, Jelinek J, Issa J-P J. Frequent alteration of MLL3 frameshift mutations in microsatellite deficient colorectal cancer. *PLoS ONE*, 6(8): e23320, 2011. 査読 (有)

3. Izawa N, Wu W, Sato K, Nishikawa H, Kato A, Boku N, Itoh F, Ohta T. HERC2 Interacts with Claspin and regulates DNA origin firing and replication fork progression. *Cancer Res.* ; 71(17) : 5621-5, 2011. 査読 (有)
4. Baba S, Oishi Y, Watanabe Y, Oikawa R, Morita R, Yoshida Y, Hiraishi T, Maehata T, Nagase Y, Fukuda Y, Nakazawa M, Ishigouka S, Hattori N, Suzuki H, Toyota M, Niwa H, Suzuki M, Itoh F. Gastric wash-based molecular testing for antibiotic resistance in helicobacter pylori. *Digestion* 84: 299-305, 2011. 査読 (有)
5. Oishi Y, Watanabe Y, Yoshida Y, Sato Y, Hiraishi T, Oikawa R, Maehata T, Suzuki H, Toyota M, Niwa H, Suzuki M, Itoh F. Hypermethylation of Sox17 gene is useful as a molecular diagnostic application in early gastric cancer. *Tumour Biol*, in press. 査読 (有)

[学会発表] (計 3 件)

1. 渡邊嘉行、伊東文生, マイクロアレイを用いた消化管がんの網羅的メチル化解析, 62th 日本電気泳動学会総会 シンポジウム 1, 2011/11/18, 横浜 (横浜市開港記念会館)
2. 渡邊嘉行、伊東文生, Identification of DNA methylation changes in esophageal cancer before/after chemoradiation therapy using a MCA-microarray and bisulfate pyrosequencing, 2010 A3 フォーサイト事業ミーティング 口演, 2011/7/9, 札幌 (ホテルニューオータニ札幌)

3. 津田享志、渡邊嘉行、伊東文生、
Identification of DNA methylation
changes in esophageal cancer
before/after chemoradiation therapy
using a MCA-microarray and bisulfate
pyrosequenci, ASCO2010 ポスター,
2010/6/4, Chicago

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊東 文生 (ITOH FUMIO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 90223180

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし