

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 6 月 18 日現在

機関番号： 82634

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 平成 21 年 ~ 平成 23 年

課題番号： 21592212

研究課題名 (和文)

頭頸部癌における PGP9.5 の脳腫増殖抑制メカニズムの解明と臨床応用

研究課題名 (英文)

Hypermethylation of PGP9.5 has an important role in head and neck cancer

研究代表者 徳丸 裕

(Tokumaru Yutaka)

独) 国立病院機構東京医療センター (臨床研究センター)・聴覚・平衡覚研究部・研究員

研究者番号： 60245579

研究成果の概要 (和文)：

ゲノムに書かれた遺伝情報、つまり遺伝子の塩基配列が変化しないにもかかわらず個体発生や細胞分化の過程において遺伝子発現を制御する現象がエピジェネティクスである。癌におけるエピジェネティックな異常には、DNA メチル化の異常、ヒストン修飾の異常、そしてゲノムインプリンティングの異常などがあげられるが、特定の遺伝子や領域では高度にメチル化されており癌化に寄与していると考えられる。我々はエピジェネティックな変化に注目し、頭頸部癌において高頻度に DNA メチル化されている遺伝子、PGP9.5 を同定した。

これまでに治療を行った頭頸部癌患者の生検サンプルから DNA を抽出し、PGP9.5 の DNA メチル化を解析した。具体的には抽出した DNA を Bisulfite 処理すると、非メチル化シトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシン (5'-メチルシトシン) は変換されない。その塩基配列の違いを利用してメチル化の有無を PCR (methylation specific PCR, MSP) で検出する。特に本研究ではリアルタイム PCR をもちいた Quantitative MSP (QMSP) にて遺伝子のメチル化の有無、程度を測定する。本法を用いることによりメチル化の定量的な解析を行うことができ、かつ感度、特異度の高い解析が可能となる。対象は、当科にて治療を行った頭頸部癌患者 (78 例) で、部位別の内訳は下咽頭癌 32 例、中咽頭癌 19 例、喉頭癌 27 例である。すべての症例が放射線治療もしくは化学放射線治療により加療された。PGP9.5 の DNA メチル化解析は、生検サンプルから型の如く DNA を抽出し行った。PGP9.5 のメチル化は下咽頭癌では 18 例 (56.3%)、中咽頭癌では 7 例 (36.8%)、喉頭癌では 14 例 (51.9%) に検出され、臨床的に悪性度の高い下咽頭癌で最も高頻度に認められた。また p53 の遺伝子変異との関連を検討すると、PGP9.5 のメチル化と p53 の遺伝子変異は逆相関する傾向が認められた。臨床因子との関連では、PGP9.5 の methylation index は病期が進行するにつて、高い値を示していた。以上のことから、PGP9.5 のメチル化と頭頸部癌の悪性度との関連が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The abnormality of the epigenetics in the cancer includes the DNA methylation, histone-modification and abnormality of the genome imprinting and it is methylated highly in the specific genes and regions are highly methylated and is thought to contribute to cancerization. We focused on hypermethylation of genes in head and neck cancer and

identified gene, PGP9.5 which is frequently methylated in head and neck cancer. Then we extracted DNA from the biopsy sample of patients with head and neck cancer treated in our hospital and analyzed DNA hypermethylation of PGP9.5. Specifically, when Bisulfite treats the DNA which we extracted, the non-methylation cytosine is converted into uracil, but the methylated cytosine (5'-methylcytosine) is not converted. We detect methylation using the difference in the sequence in PCR (methylation specific PCR, MSP). We measured methylation status in this study in particular by Quantitative MSP (QMSP) using the real-time PCR.

In patients with head and neck cancer who were treated in our hospital, the primary sites were 32 hypopharynx, 19 oropharynx, 27 larynx. All cases were treated by radiotherapy or chemoradiotherapy. The methylation of PGP9.5 was detected in 18 cases (51.9%) in hypopharyngeal cancer and seven cases (36.8%) in oropharyngeal cancer and 14 cases (56.3%) in laryngeal cancer. In addition, a tendency to be inversely correlated had the methylation of PGP9.5 and the mutation in the gene of p53 when we examined the association with the mutation in the gene of p53. Furthermore the stage progressed, the methylation index of PGP9.5 showed increasing. These results support the notion that PGP9.5 has an important role in head and neck cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,400,000	420,000	1,820,000
22年度	1,200,000	360,000	1,560,000
23年度	700,000	210,000	910,000
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： 耳鼻咽喉科学

キーワード： 頭頸部外科学、頭頸部癌

1. 研究開始当初の背景

癌の発生においてジェネティックな変異が重要な役割を果たしていることはいうまでもないが、最近ではエピジェネティックな変異もまた注目されている。特にプロモーター領域の異常 DNA メチル化は多くの癌種において報告されており、癌抑制遺伝子、もしくは癌抑制に関わる pathway の発現抑制にプロモーター領域の異常 DNA メチル化が深く関与していると考えられる。一方頭頸部癌は初診時すでに進行した状態であることが多く、またその発生部位の兼ね合いから機能を温存しながら十分なマージンと共に腫瘍を切除することが困難で、その結果治療成績も満足するものではない。さらに頭頸部癌においてはその発生に関わる分子生物学的なメカニ

ズムがほとんど解明されておらず、そのためそれらをターゲットにした腫瘍マーカーの同定や治療法の開発が行われていない。我々は頭頸部癌において重要な役割を果たしていると考えられる癌抑制遺伝子もしくは pathway を解明するため、epigenetic な変異、とくに DNA メチル化に注目した。これまで我々は頭頸部癌、胃癌、食道癌等の消化器癌、前立腺癌、甲状腺癌における DNA メチル化を報告した。また我々は癌組織特異的なメチル化を指標として、molecular diagnosis の可能性を報告してきた。頭頸部癌の血液サンプルにおけるメチル化の同定や、肺癌におけるリンパ節の解析、前立腺癌における針生検など、DNA の異常メチル化は molecular marker として有用であると

考えられている。

2. 研究の目的

頸部癌における PGP9.5 遺伝子の働きを詳細に検討しその重要性を解明するとともに、臨床応用の可能性についても明らかにする。

3. 研究の方法

これまでに治療を行った頭頸部癌患者のパラフィン包埋サンプルから型の如く DNA を抽出し、PGP9.5 の DNA メチル化を解析する。具体的には抽出した DNA を Bisulfite 処理すると、非メチル化シトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシン (5'-メチルシトシン) は変換されない。その塩基配列の違いを利用してメチル化の有無を PCR (methylation specific PCR、MSP) で検出する。特に本研究ではリアルタイム PCR をもちいた Quantitative MSP (QMSP) にて遺伝子のメチル化の有無、程度を測定する。本法を用いることによりメチル化の定量的な解析を行うことができ、かつ感度、特異度の高い解析が可能となる。当院で治療した頭頸部癌患者であるので、TNM ステージ、病期などの臨床情報との関連を検討することが可能である。また化学療法や放射線治療の効果とメチル化の程度との相関についても解明し、stable clone を用いた *in vitro* の感受性試験の結果と比較する。感度の高い QMSP を用いることにより molecular marker としての有用性を示すことが可能かもしれない。また抗癌剤や放射線治療の効果や予後との関連を調べることにより、治療効果や予後予測の可能性を検討する。

4. 研究成果

当科にて治療を行った頭頸部癌患者 (78 例) を対象とした。部位別の内訳は下咽頭癌 32 例、中咽頭癌 19 例、喉頭癌 27 例である。すべての症例が放射線治療もしくは化学放射線治療により加療された。PGP9.5 の DNA メチル化解析は、生検サンプルから型の如く DNA を抽出し行った。PGP9.5 のメチル化は下咽頭癌では 18 例 (56.3%)、中咽頭癌では 7 例 (36.8%)、喉頭癌では 14 例 (51.9%) に検出され、臨床的に悪性度の高い下咽頭癌で最も高頻度に認められた。また p53 の遺伝子変異との関連を検討すると、PGP9.5 のメチル化と p53 の遺伝子変異は逆相関する傾向が認められた。臨床因子との関連では、PGP9.5 の methylation index は病期

が進行するにつて、高い値を示していた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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 徳丸 裕

(Tokumaru Yutaka)

独立行政法人国立病院機構

東京医療センター (臨床研究センター)

聴覚・平衡覚研究部・研究員

研究者番号: 60245579

(2) 研究分担者 藤井正人

(Fujii Masato)

独立行政法人国立病院機構

東京医療センター (臨床研究センター)

聴覚・平衡覚研究部・部長

研究者番号: 70129633

(3) 連携研究者 羽生 昇

(Habu Noboru)

独立行政法人国立病院機構
東京医療センター（臨床研究センター）
聴覚・平衡覚研究部・研究員
研究者番号：60365369