

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25年5月13日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21790140

研究課題名（和文） 大腸癌におけるDNAメチル化を指標とした薬剤耐性機序の解明

研究課題名（英文） Elucidation of drug resistance mechanism indicated by DNA methylation in colon cancer

研究代表者

鈴木 英雄（SUZUKI HIDEO）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00400672

研究成果の概要（和文）：

①抗EGFR抗体薬が投与された切除不能大腸癌患者においてExon25に存在するEGFR D944DのSNPが主要な副作用である皮膚毒性の発現と有意に相関していることを発見し、副作用の予測を可能とする個別化医療への応用が示唆された。

②早期胃癌患者の内視鏡治療前後の胃洗浄液 DNA を用いた網羅的解析により、MINT25 およびSOX17 遺伝子のメチル化が完全切除では有意に減少した一方、不完全切除ではその減少がみられず、胃洗浄液による遺残診断の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

①The SNP of *EGFR* D944D in Exon25 was statistically correlated with the expression of skin toxicity in unresectable colorectal cancer patients administrated anti-EGFR antibody, suggesting that application to personalized medication that enables the prediction of this side effect.

②By comprehensive analysis of DNA methylation in gastric washes before and after endoscopic treatment, methylation in *MINT25* and *SOX17* gene was reduced significantly after treatment with curative resection in early gastric cancer patients. This method may be useful for early detection of recurrence after endoscopic treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療、DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

手術不能、再発大腸癌に対する化学療法は近年、飛躍的な進歩が見られているが、依然として無効例や治療途中で薬剤抵抗性となる例が多く見られ、生存期間延長を妨げる大

きな要因となっている。これらの原因は遺伝子の変異やプロモーター領域のDNA異常メチル化、薬剤代謝酵素の遺伝子多型などが考えられている。これに対し、ジェネティックな変化とエピジェネティックな変化を網羅的

に解析することで、化学療法耐性機序を解明し、感受性や予後の予測が可能になるとの仮説を立て、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では切除不能大腸癌患者の病理組織、採血検体を用い、治療抵抗性・耐性に関連のある候補遺伝子の DNA メチル化と変異、薬剤代謝酵素の遺伝子多型を調査し、化学療法の効果と副作用、生命予後との相関を明らかにすることを目的とする。本研究により、大腸癌化学療法に関する薬物動態、耐性に関与する遺伝子が同定され、その分子機構が解明される可能性が高い。その結果は、個人に適切な癌治療を行なう化学療法の個別化や新たな標的薬の開発に繋がる研究成果が期待出来る。

しかしながら、大腸癌化学療法患者の治療前後の病理標本を入手することは想定以上に困難であったため、末梢血液から得られる DNA から薬剤代謝酵素の遺伝子多型を調査することとした。また、連携研究者の渡邊らは胃癌に対する内視鏡治療前後の胃洗浄廃液に含まれる胃細胞から高感度のメチル化解析を行う手法を開発した。以上より、①大腸癌で化学療法を受けた患者の抹消血液より抽出した DNA から薬剤代謝酵素の遺伝子多型 (SNP) を調査し、薬物療法の効果と副作用、生命予後との相関を明らかにすること、②早期胃癌患者の胃洗浄廃液から胃上皮細胞を収集し、内視鏡治療前後での DNA メチル化変異の解析も行うことで、遺残再発、異時再発のマーカーとしての臨床応用を目指すこと、を目的とした。これにあわせ、筑波大学附属病院倫理委員会の承認を得て、研究を継続した。

3. 研究の方法

(1) 当初は大腸癌化学療法の基本薬である 5-FU や CDDP、CPT-11 に関わる代謝酵素の SNP を計画していたが、近年使用頻度が増えている抗 EGFR 抗体薬 (Cetuximab, Panitumumab) に着目した。その理由は、同薬剤は K-ras 遺伝子の変異の有無で奏効率が異なることが分かっておりバイオマーカーの研究が盛んなことと、特有の副作用である皮膚毒性の有無で奏効率に差があるものの、そのマーカーはまだ特定されておらず新規性が高いと判断したためである。筑波大学附属病院で大腸癌化学療法が行われた患者の血液から DNA 抽出を行い、EGFR 代謝関連遺伝子として EGF5' -UTR 61A>G、EGFR-R521K、EGFR-D994D、Fc γ RIIa-131G>A、Fc γ RIIa-158 T>G を選択した。これらの SNP 解析を TaqMan プローブ法にて行い、診療録から、化学療法の奏効率、生存期間、主に皮膚毒性の有害事象を調査し、各 SNP 間での相関関係を調べた。

(2) 早期胃癌の内視鏡治療前後に胃内をよく洗浄し、その胃洗浄液から DNA を抽出した。この DNA に対し網羅的メチル化解析法である H/H-MCAMicroarray を用い、胃癌特異的に異常メチル化を認める候補遺伝子の選出を行うとともに、切除結果との比較を行った。

4. 研究成果

(1) 大腸癌化学療法が行われた患者の血液サンプルは目標 100 症例に対し、最終的に 83 例が収集できた。このうち、抗 EGFR 抗体薬が使用され、診療録より必要な情報が入手可能であった 32 例を解析対象とした。その結果、有効性や生存率との関連は 5 種類の EGFR 代謝関連遺伝子内の SNP 間では見られなかった。(下表)

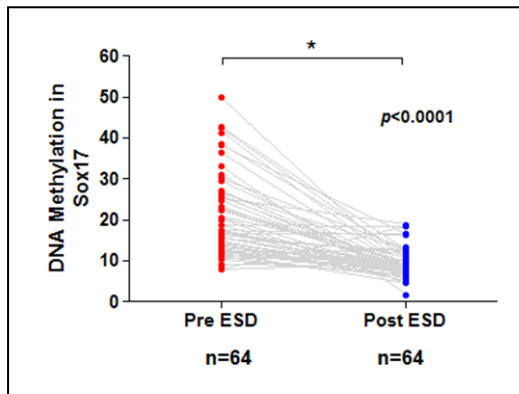
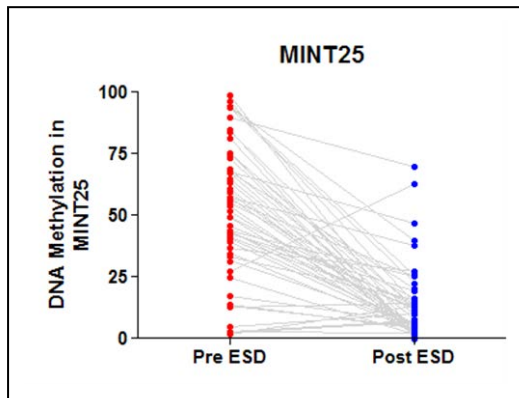
Gene		CR, PR	SD, PD	<i>P</i>
EGF5' -UTR 61A>G	A/A, A/G	3	12	0.287
	G/G	6	11	
EGFR -R521K	A/A	3	9	0.546
	A/G, G/G	6	14	
EGFR -D994D	C/C	5	8	0.248
	C/T, T/T	4	15	
Fc γ RIIa -131G>A	A/A, A/G	6	12	0.534
	G/G	3	8	
Fc γ RIIa -158 T>G	C/C	6	13	0.313
	C/A, A/A	2	10	

皮膚毒性に関しては、Exon25 に存在する EGFR D944D の C/C は C/T+T/T にくらべて有意に Grade3 が少ないことを発見した。この結果から、EGFR D944D の SNP を調べることで事前に副作用の有無を予測でき、個別化医療への応用が示唆された。(下表)

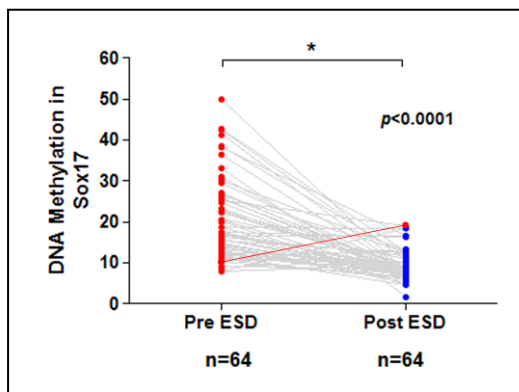
Gene		Gr0~2	Gr3	<i>P</i>
EGF5' -UTR 61A>G	A/A, A/G	11	4	0.589
	G/G	12	5	
EGFR -R521K	A/A	9	3	0.546
	A/G, G/G	14	6	
EGFR -D994D	C/C	12	1	0.038
	C/T, T/T	11	8	
Fc γ RIIa -131G>A	A/A, A/G	12	6	0.151
	G/G	10	1	
Fc γ RIIa -158 T>G	C/C	14	5	0.489
	C/A, A/A	8	4	

なお、生存期間と SNP との相関は今回の研究では確認されなかった。

(2)内視鏡治療前後の胃洗浄廃液 DNA を用いた解析により MINT25 および SOX17 遺伝子の同定に成功した。この 2 つの遺伝子メチル化異常は、内視鏡治療前の胃洗浄廃液で高メチル化を、治療後の胃洗浄廃液で著明なメチル化の低下を認めた。(下図)



さらに、内視鏡治療による断端陽性症例では治療後の胃洗浄廃液においても高メチル化を維持しており、追加開腹切除における病理組織にて遺残癌の確認がなされ、胃洗浄廃液による内視鏡治療後遺残診断が可能な可能性が確認できた。(下図)



現在、現在胃洗浄液を用いた胃癌異時再発診断に関する前向き試験を開始し、内視鏡治療適応である胃癌症例において、内視鏡治療前、治療直後、1年後、2年後、3年後、4年後の胃洗浄廃液を回収し異時再発診断が可能かを検証することとしている。

以上より、本研究から、抗 EGFR 抗体が使用される大腸癌化学療法の前皮膚毒性の事前予測と、内視鏡治療後胃癌患者の再発予測の可能性が示唆された。今後は多くの症例数での確認と他遺伝子の候補の探索を進めることで、消化器癌の個別化医療の推進につながるものと期待される。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Watanabe Y et al. Hypermethylation of Sox17 gene is useful as a molecular diagnostic application in early gastric cancer. *Tumour Biol* 2012, 33(2):383-93. 査読有
DOI: 10.1007/s13277-011-0278-y
- (2) 渡邊嘉行、鈴木英雄他 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 *生物物理化学* 2011, 55:5-8. 査読有
DOI:10.2198/sbk.56.5
- (3) Yamashita M, Watanabe Y, et al. DNA methylation of interferon regulatory factors in gastric cancer and noncancerous gastric mucosae. *2010, 101:1708-1716*. 査読有 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01581.x

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 渡邊嘉行 胃洗浄廃液を用いた胃がんメチル化マーカーの探索 第 23 回日本消化器癌発生学会総会 2012 年 11 月 16 日 徳島
- (2) Hama R, Watanabe Y et al. The Sox17 Gene Hypermethylation is Useful as a Molecular Diagnostic Application in Early Stage of Gastric Cancer. *American Association for Cancer Research* 2012. 2012 年 4 月 3 日, Chicago IL. (USA)
- (3) Watanabe Y et al. Usefulness of DNA methylation analysis using gastric washes as a treatment marker for early gastric cancer. *American Association for Cancer Research* 2011. 2011 年 4 月 3 日, Orland FL. (USA)
- (4) 細谷浩介、渡邊嘉行他 消化器内視鏡検査と分子生物学的診断の新たな展開 JDDW2010 シンポジウム 2010 年 10 月 14 日 横浜

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称

「胃粘膜洗浄液を利用した疾患関連マーカー検出方法」

発明者

学校法人聖マリアンナ医科大学、北海道公立
大学法人札幌医科大学

権利者

渡邊 嘉行、豊田 実、今井 浩三、篠村 恭久、
伊東 文生、時野 隆至

種類と番号、出願日

国際出願番号：PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5

9 9 5 3 国際出願日：平成19年5月15
日

優先権主張番号：特願2006-13487

8 優先日：平成18年5月15日

移行国および審査状況：日本、米国、欧州、
中国、インド、韓国（各国にて審査中）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 英雄 (SUZUKI HIDEO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00400672

(2) 研究協力者

渡邊 嘉行 (WATANABE YOSHIYUKI)

聖マリアンナ医科大学・

消化器肝臓内科・講師

研究者番号：90329243