

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689061

研究課題名(和文)食道癌の新規治療法の開発を目指したLINE-1メチル化レベルの網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of LINE-1 hypomethylation level aimed at the development of new treatments for esophageal cancer

研究代表者

馬場 祥史(BABA, Yoshifumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：20599708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,100,000円、(間接経費) 6,030,000円

研究成果の概要(和文)：200例以上の食道扁平上皮癌のLINE-1メチル化レベルを解析し、LINE-1低メチル化症例は予後不良であることを明らかにした。CGHアレイ解析の結果、LINE-1低メチル化症例では、CDK6など癌関連遺伝子を含む領域において高頻度にコピー数の増幅・欠損を認めた。食道癌128例の免疫染色を行った結果、CDK6発現症例は統計学的に有意ではないものの予後が不良であり、またCDK6発現を交絡因子として解析したところ、LINE-1低メチル化の予後に対する影響は減弱した。LINE-1低メチル化症例においては、CDK6に代表とされるような癌関連遺伝子の増幅がおり、悪性度の獲得に繋がっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Using more than 200 ESCC specimens, we quantified the LINE-1 methylation by utilizing the bisulfite pyrosequencing technology. LINE-1 hypomethylation in ESCC is associated with a shorter survival, thus suggesting that it has potential for use as a prognostic biomarker. Result of CGH array, LINE-1-hypomethylated tumors showed highly frequent genomic gains at various loci containing candidate oncogenes such as CDK6. In our cohort of 129 patients with ESCC, cases with CDK6-positive expression experienced worse clinical outcome compared with those with CDK6-negative expression, supporting the oncogenic role of CDK6 in ESCC. In addition, we found that the prognostic impact of LINE-1 hypomethylation might be attenuated by CDK6 expression. LINE-1 hypomethylation in ESCC might contribute to the acquisition of aggressive tumor behavior through genomic gains of oncogenes such as CDK6.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：LINE-1 メチル化 予後因子 エピジェネティクス 食道癌 Pyrosequence

1. 研究開始当初の背景

ゲノムワイドな低メチル化 (global DNA hypomethylation) は、がん原遺伝子 (proto-oncogene) 発現や染色体不安定性などを介して、様々な癌種の発癌・浸潤転移において重要な役割を果たす。LINE-1 (long interspersed nucleotide element-1) は、繰り返しヌクレオチド配列であり、ゲノム全体の約 17% を占める。LINE-1 は多くの CpG 配列を含み、LINE-1 のメチル化レベルは、ゲノム全体のメチル化レベルの指標になるといわれている。LINE-1 低メチル化症例は予後不良であることは多くの癌種で報告されているが、食道がんにおける予後との関係は明らかになっていない。

2. 研究の目的

食道癌における LINE-1 メチル化レベルを Pyrosequencing technology を用いて評価し、予後、疫学的因子 (喫煙、飲酒) などの関係を網羅的に解析すること。

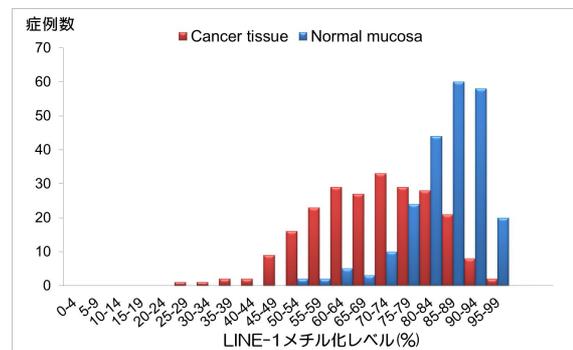
3. 研究の方法

当科で切除された食道扁平上皮癌 200 例以上のパラフィン包埋切片から Macro dissection により、腫瘍組織 (癌細胞) 及び正常上皮をそれぞれ回収する。その組織から DNA を抽出し、引き続き bisulfite 処理を行なう。そして、“Pyrosequencing technology” により LINE-1 メチル化レベル (=ゲノム全体のメチル化レベル) を定量的に測定する。その後、JMP program (SAS Institute, Cary, NC) を用いて、LINE-1 のメチル化レベル (腫瘍部、正常上皮) と、予後、臨床病理学的因子、学的因子との関係を網羅的に解析する。次に、LINE-1 メチル化レベルと DNA コピー数異常との関係を明らかにするために CGH アレイを行う。

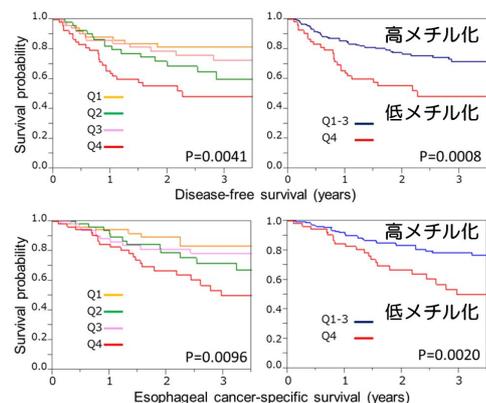
4. 研究成果

まず、Pyrosequencing technology により、パラフィン包埋ブロックを用いて食道癌 LINE-1 メチル化レベルが正確に測定できるかを検討した。Pyrosequence は、bisulfite PCR Pyro という行程からなるが、それぞれ行程を 5 回ずつ独立して行うことにより、その再現性を評価した。bisulfite 行程及び Pyro 行程の標準偏差は、それぞれ 1.44-2.90、0.63-3.25 と比較的低値であった。また、同一腫瘍から 5 枚の切片を作成することにより、同一腫瘍内の heterogeneity を評価したが、標準偏差は 1.37-3.31 であった。これらの結

果から、食道癌パラフィンブロックから作成された代表切片を用いて、Pyrosequence により LINE-1 メチル化レベルを測定することの妥当性が示された。Pyrosequence は多数のサンプルを迅速に測定することができ、臨床応用に非常に適したツールであることから、今回の結果は非常に意義があると考えられる。この結果を示した論文は、Ann Surg Oncol. に採択された。次に、この assay を用いて、食道癌 217 例の LINE-1 メチル化レベルを測定した。食道癌のメチル化レベルは、正常上皮と比べて有意に低値であった ($p < 0.0001$; $N=50$)。



癌部における LINE-1 メチル化レベルは、平均値 64.5; 中央値 65.0; 最小値 24.8; 最大値 91.8 であった。食道癌 LINE-1 低メチル化症例は、高メチル化症例に比べて有意に予後不良であった (log-rank $p=0.0008$; 単変量リスク比=2.32, 95%信頼区間 1.38-3.84, $p=0.0017$; 多変量リスク比=1.81, 95%信頼区間 1.06-3.05, $p=0.031$)。



Iwagami S, Baba Y et al. Ann Surg 2012

このことから、食道癌 LINE-1 メチル化レベルは、食道癌の予後予測因子となりうることを示された。食道癌は非常に予後の悪い疾患であるが、今回の結果は患者別の個別化治療に貢献できる可能性があり、非常に臨床的意義があると考えられる。この結果は、外科分野の一流誌である Annals of Surgery に採択

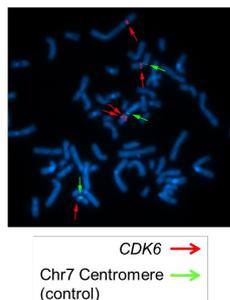
された。

次に、LINE-1 低メチル化と DNA コピー数異常の関係を評価するために、LINE-1 低メチル化食道癌症例と高メチル化症例を用いて CGH アレイ解析を行った。その結果、LINE-1 低メチル化症例では、CDK6 など癌関連遺伝子を含む領域において高頻度にコピー数の増幅・欠損を認めた(P=0.0013)。



また、食道癌切除症例において LINE-1 メチル化レベルと CDK6 発現は有意に相関していた (mRNA level : P=0.039、protein level : P=0.0001)。食道癌細胞株においても同様の結果が得られ、FISH によって CDK 遺伝子増幅と LINE-1 メチル化レベルとの関連が確認された。食道癌 128 例の免疫染色を行った結果、CDK6 発現症例は統計学的に有意ではないものの予後が不良であった (P=0.064)。また、CDK6 発現を交絡因子として解析したところ、LINE-1 低メチル化の予後に対する影響は減弱した (ハザード比 : 2.96 2.32)。これらの結果から、LINE-1 低メチル化症例においては、CDK6 に代表とされるような癌関連遺伝子の増幅がおり、悪性度の獲得に繋がっていると考えられた。

FISH
(LINE-1低メチル化細胞株)



これらの内容を、Clinical Cancer Research に発表した。

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5件)

Baba Y, Watanabe M, Murata A, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Yoshida N, Oki E, Sakamaki K, Nakao M, Baba H. LINE-1 hypomethylation, DNA copy number alterations, and CDK6 amplification in esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2014 Mar 1;20(5):1114-24. 査読有
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1645.

Baba Y, Murata A, Watanabe M, Baba H. Clinical implications of the LINE-1 methylation levels in patients with gastrointestinal cancer. Surg Today. 2013 Oct 23. [Epub ahead of print] 査読有
DOI:10.1007/s00595-013-0763-6

Suzuki M, Shiraishi K, Eguchi A, Ikeda K, Mori T, Yoshimoto K, Ohba Y, Ito Yamada T, Ito T, Baba Y, Baba H. Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL, and IGFBP7 in non-small cell lung cancer. Oncol Rep. 2013 Apr;29(4):1308-14. 査読有
DOI: 10.3892/or.2013.2266.

Iwagami S, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamaki K, Ohashi Y, Baba H. LINE-1 hypomethylation is associated with a poor prognosis among patients with curatively resected esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg. 2013 Mar;257(3):449-55. 査読有
DOI: 10.1097/SLA.0b013e31826d8602.

Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, Iwagami S, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba H. LINE-1 hypomethylation in noncancerous esophageal mucosae is associated with smoking history. Ann Surg Oncol. 2012 Dec;19(13):4238-43. 査読有
DOI: 10.1245/s10434-012-2488-y.

[学会発表](計6件)

馬場 祥史、渡邊 雅之、吉田 直矢、小澄 敬祐、原田 和人、村田 飛鳥、岩上 志朗、辛島 龍一、石本 崇胤、馬場 秀夫、「同時性・異時性頭頸部癌を有する食道癌症例における LINE-1 メチル化レベル」、第 65 回日本気管食道学会総会ならびに学術講演会、2013 年 11 月 1 日、品川プリンスホテル(東京都)

馬場 祥史、渡邊 雅之、村田 飛鳥、志垣 博信、三宅 慧輔、石本 崇胤、岩槻 政晃、岩上 志朗、吉田 直矢、馬場 秀夫、「食道扁平上皮癌における LINE-1 低メチル化と DNA コピー数異常、CDK6 増幅の関係」、第 72 回日本癌学会学術集会、2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

馬場 祥史、渡邊 雅之、村田 飛鳥、志垣 博信、岩上 志朗、石本 崇胤、岩槻 政晃、吉田 直矢、馬場 秀夫、「食道癌における LINE-1 メチル化レベルと DNA コピー数異常の関係」、第 24 回日本消火器癌発生学会、2013 年 9 月 5 日、石川県立音楽堂

馬場 祥史、渡邊 雅之、村田 飛鳥、志垣 博信、岩上 志朗、石本 崇胤、岩槻 政晃、吉田 直矢、馬場 秀夫、「Pyrosequence technology を用いた食道癌のエピゲノム解析」、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 12 日、マリンメッセ福岡

Baba Y, Watanabe M, Murata A, Shigaki H, Iwagami S, Iwatsuki M, Ishimoto T, Baba H. 「Relationship between LINE-1 methylation level, allelic imbalance and PIK3CA mutation in esophageal squamous cell carcinoma.」、AACR Annual Meeting 2013、2013 年 4 月 9 日、Walter E. Washington Convention Center (アメリカ・ワシントン)

馬場 祥史、「Prognostic significance of LINE-1 methylation level in esophageal squamous cell carcinoma.」、ASCO GI、2012 年 1 月 19 日、Moscone West Building (アメリカ・サンフランシスコ)

〔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

(1)研究代表者

馬場 祥史 (BABA, Yoshifumi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：20599708

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：