

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791570

研究課題名(和文) 中皮腫に特異的なDNAメチル化を標的とした胸膜悪性中皮腫の早期診断法の開発

研究課題名(英文) Establishment of the high sensitive assay for detecting malignant pleural mesothelioma-specific DNA methylation

研究代表者

浅野 博昭 (ASANO, HIROAKI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：70534775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は悪性胸膜中皮腫で高率にメチル化しているマイクロRNA(hsa-miR-34b/c)のプロモーター領域に着目し、Methylation Specific PCR法と高感度なDigital PCR法を組み合わせ、患者血清中の微量な腫瘍由来DNAからこのメチル化を検出する検査法を確立した。この検査法の特異度は77%、感度は67%であった。今後、感度と特異度をさらに改善できれば、悪性胸膜中皮腫のスクリーニングや治療後の経過観察への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We established a high sensitivity assay for detecting microRNA(hsa-miR-34b/c) methylation in serum-circulating DNA from patients with malignant pleural mesothelioma using digital methylation-specific PCR. The specificity of this assay was 77% and sensitivity was 67%. Further investigation is required for improvement of both sensitivity and specificity by combining with other biomarkers for clinic application.

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：胸膜悪性中皮腫 マイクロRNA miR-34b/c DNAメチル化 デジタルPCR 血清DNA

1. 研究開始当初の背景

胸膜悪性中皮腫はアスベスト曝露後に30-40年を経て胸膜に発生する悪性腫瘍であり、疫学的には今後も発生が増加すると考えられている。また、職業被爆だけでなく、労働者の家族や工場の近隣住民など環境被爆という側面もあり、大きな社会問題になっている。現在、胸膜悪性中皮腫のバイオマーカーとして、ヒアルロン酸、CYFRA等が臨床応用されているが、早期診断には未だ不十分である。胸膜悪性中皮腫は早期発見例では治癒することもあるが、発症後の臨床経過は非常に早く予後不良な疾患であり、早期診断法の確立が急務となっている。

我々は、胸膜悪性中皮腫の約85%において、p53をクライアント蛋白に持つマイクロRNA hsa-miR-34b/cのプロモーター領域に高度なメチル化があり、hsa-miR-34b/cの発現が著しく低下していることを発見し、報告した(文献1)。さらに、このマイクロRNAの発現が低下した胸膜悪性中皮腫細胞株にhsa-miR-34b/cを導入すると、コロニー形成試験でコロニーの形成(増殖)を著しく抑制し、細胞周期分析ではsubG1、G1の増加を認め、アポトーシスが誘導された。また、遊走能、浸潤能も有意に低下した。これらはhsa-miR-34b/cのターゲットであるMET、CDK4、CDK6、CCND1、Bcl-2、c-MYC、E2F3などを抑制したためと判明した(文献1)。他の癌腫と比べて、p53変異が稀な胸膜悪性中皮腫ではhsa-miR-34b/cプロモーター領域の高度なメチル化によりhsa-miR-34b/cの発現が抑制されているため、アポトーシスが起こりにくくなっているものと考えられた。

以上より、hsa-miR-34b/cのプロモーター領域のメチル化を研究することは、胸膜悪性中皮腫の発生機序を解明するだけでなく、同部位のメチル化の頻度が非常に高いことを利用して、血清中や胸水中の微量なDNAから検出できるような高感度な測定系が確立できれば、早期診断につながり、胸膜悪性中皮腫患者の予後の改善につながると期待される。

2. 研究の目的

胸膜悪性中皮腫は臨床においてしばしば診断・治療に難渋し、治療後の予後も非常に不良な疾患の一つであり、早期診断法の開発が望まれている。本研究の目的は、胸膜悪性中皮腫の患者血清からhsa-miR-34b/cプロモーター領域のメチル化を検出する高感度な測定法を確立し、臨床において早期診断や治療後の経過観察に役立てることである。

また、胸膜悪性中皮腫の予備群と考えられている良性石綿胸水を有する患者の血清、健常者の血清でも測定し、結果を検討する。

3. 研究の方法

(1)血清DNAの回収とbisulfite処理

まず、血液1.5mLから微量の遊離DNAを効率よく回収する必要があり、種々の方法で血清DNAを回収し、収量を比較した。また、陽性コントロールとしてhsa-miR-34b/cプロモーター領域のシトシンの97.7%がメチル化している胸膜悪性中皮腫細胞株(NCI-H290)、陰性コントロールとしてメチル化をほとんど認めない腹膜中皮細胞株(LP9)の培養液の上澄みから遊離DNAを回収した。採取したDNAはメチル化解析に必要なbisulfite処理を行った。

(2)プライマー作製とデジタルMSP法の最適化

本研究では高感度かつ特異度の高い測定系が必要である。一般的に、腫瘍細胞のDNAのメチル化解析には、高感度なMethylation Specific PCR法(MSP法)がよく用いられるが、腫瘍由来の微量な血清DNAのメチル化を検出するにはしばしば感度が不十分であることが多い。近年、デジタルPCR法が開発され、DNAを希釈して多数のwellに分注してPCRを行うことで、通常のPCRでは検出不可能であった微量なサンプルを高感度かつ定量的に検出することができるようになった。本研究では、従来のMSP法とデジタルPCRを組み合わせてデジタルMSP法として検出感度の向上を図り、患者血清に存在する腫瘍由来の微量な遊離DNAからhsa-miR-34b/cプロモーター領域のメチル化を検出することを試みた。

プライマーの作製:Methylation Specific PCRの技術でリアルタイムPCR用プライマーを数種類作製し、どのプライマーが優れているか比較した。

デジタルMSPの最適化:DNAを希釈して分注し、1検体につき40wellでPCRを行い、メチル化DNAを含む陽性well数を調べた。PCR産物はTaqMan法とCYBR Green法で検出し、どちらが優れるか検討した。陽性コントロールとして胸膜悪性中皮腫細胞株(NCI-H290)、陰性コントロールとして腹膜中皮細胞株(LP9)を用いて測定系の最適化を行った。

(3)臨床検体への応用

胸膜悪性中皮腫患者(MPM)48例、良性石綿胸水患者(BAP)21例、健常者(HV)41例の血液を採取した。臨床検体の採取・使用においては、当施設の倫理委員会で承認された書式にて同意を得た。採取した血液より血清を分離し、実験に使用するまで-80で保存した。採取した血清より(1)の方法で、遊離DNAを回収してbisulfite処理を行い、デジタルMSPを行なった。各検体で陽性、陰性の判定にはReceiver Operating Characteristic(ROC)曲線を用いてカットオフ値を決定し、この測定系の感度と特異度を計算した。結果の比較・評価を行い、患者の血清DNAに含まれるhsa-miR-34b/cプロモーター領域のメチル化が胸膜悪性中皮腫のバイオマーカーになるかを検討した。

4. 研究成果

(1)種々の DNA 回収キットを比較したところ、血清から遊離 DNA を最も効率よく回収できたのは Epitect Plus DNA Bisulfite Kit であり、血液 1.5ml から平均 $4.8 \pm 1.8 \mu\text{g}$ の血清 DNA を回収し、bisulfite 処理することができた。

(2)DNA メチル化を検出するための MSP プライマーは、Forward : CGTACGGGGTCGAGAGAGT、Reverse : CTCGACCCGAAGTCCCACT が最適であった。Bisulfite 処理した DNA をもとに、このプライマーで増幅したデジタル PCR 産物の検出を行ったところ、TaqMan 法よりも CYBR Green 法の方が感度に優れており、PCR 産物の検出には CYBR Green 法を用いることとした。

標的部位がほぼ完全にメチル化した陽性コントロールの NCI-H290 では melting curve のピーク値 (T_m 値) は平均 78.25 ± 0.18 、陰性コントロールの LP9 では平均 75.01 ± 0.47 であった。これらの T_m 値の分布より $77.71-78.79$ ($T_m \pm 3SD$) を陽性 well と定義した (図 1)。

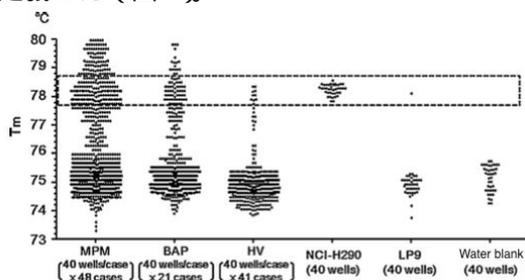


図 1 各群での T_m 値の比較 (文献 2 より引用)

(3)上述のデジタル MSP 法を用いて、MPM 患者の血清 48 検体、BAP 患者の血清 21 検体、HV の血清 41 検体の 3 群間で陽性 well 数を比較したところ、MPM 群では陽性 well 数が BAP 群、HV 群より有意に多かった (それぞれ $p=0.03$ 、 $p<0.001$ 、図 2)。また、BAP 群は HV 群と比較して陽性 well が有意に多かった ($p=0.01$)。

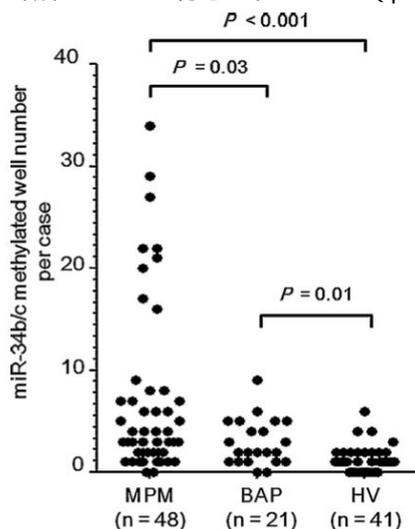


図 2 各群の陽性 well 数の比較 (文献 2 より

引用)

また、ROC 曲線を用いて最適なカットオフ値を検討したところ、40well 中に陽性 well が 3 つ以上ある検体をデジタル MSP 陽性とする感度は 67%、特異度は 77%であった (図 3)。もし、この測定系で特異度を 95%にするようにカットオフ値を設定すると感度は 38%と低くなり、逆に感度を 95%とすると特異度は 32%と低くなった。

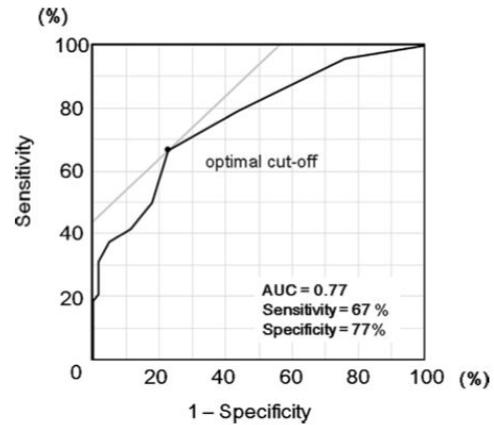


図 3 ROC 曲線 (文献 2 より引用)

以上の結果より、まず、デジタル MSP 法を用いて、計画通りに胸膜悪性中皮腫患者の血清中の腫瘍由来の微量な DNA より hsa-miR-34b/c プロモーター領域のメチル化を検出できたこと、陽性 well 数は MPM 群、BAP 群、HV 群の順に多く、これらの 3 群間では有意差があることが証明できた。スクリーニングの目的から、全 40well 中の陽性 well のカットオフ値を 3 とすると特異度は 77%、感度は 67%となり、中等度の検出能力を持つ測定系と思われる。早期診断、治療後の経過観察などの臨床応用には感度と特異度のさらなる改善が今後の課題であるが、他のバイオマーカーを組み合わせることで改善の余地があると考えられる。

また、良性石綿胸水の患者において hsa-miR-34b/c プロモーター領域のメチル化が健常者よりも多く認められたことは、胸膜悪性中皮腫の発生機序において分子腫瘍学的に興味深い結果であった。まれな疾患である悪性胸膜中皮腫において 48 例の血清を調べたこと、また悪性胸膜中皮腫の予備群としての良性石綿胸水患者の血清を同時に測定できたことは非常に貴重であると思われる。

<参考文献>

(1)Kubo T, et al. Clin Cancer Res 2011;17(15):4965-74.

(2)Muraoka T, Asano H, et al. Lung Cancer 2013;82(3):485-90.

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 1 件)

Muraoka T、Asano H(12 番目)、他 14 名、The degree of microRNA-34b/c methylation in serum-circulating DNA is associated with malignant pleural mesothelioma. Lung Cancer、査読あり、Vol.82、No.3、2013、485-490、DOI 10.1016/j.lungcan.2013.09.017.Epub 2013 Oct 10.

〔学会発表〕(計 1 件)

Takayuki Muraoka、Usefulness of sensitive digital PCR assay to quantify microRNA-34b/c methylation in the circulating serum DNA of malignant mesothelioma patients、American Association for Cancer Research Annual Meeting、March 31-April 4、2012、米国

〔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：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 博昭 (ASANO HIROAKI)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：70534775

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

豊岡 伸一 (TOYOOKA SHINICHI)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30397880

佃 和憲 (TSUKUDA KAZUNORI)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：20346430

宗 淳一 (SOH JUNICHI)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：90559890

村岡 孝幸 (MURAOKA TAKAYUKI)
岡山大学・大学病院・医員
(現在：屋島総合病院・外科)
研究者番号：なし