

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462036

研究課題名(和文) 癌における epigenetic 治療の可能性と p53経路の関係

研究課題名(英文) Relation of p53 pathway aberration to epigenetic treatment in human cancer

研究代表者

山下 継史 (Yamashita, Keishi)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：70406932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：包括的なDNAメチル化遺伝子の探索でp53経路のアポトーシス癌抑制遺伝子群が同定された。本研究では、原発癌における p53遺伝子変異とそれらの遺伝子の epigenetic 変化を調べた。p53経路の PGP9.5, NMDAR2B, CCNA1の3個の遺伝子のメチル化プロファイルを163例の原発胃癌で調べ、p53遺伝子変異との関係を明らかにし、p53経路が変異、epigenetic異常で障害されていることを証明した。また、抗癌剤によるアポトーシス誘導においてはepigenetic 療法の意義を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated p53 mutation in relation to such epigenetic alteration in primary gastric cancer. The methylation profiles of the 3 genes (PGP9.5, NMDAR2B, and CCNA1) involved in the p53 pathway were examined in 163 primary gastric cancers. The effect of epigenetic reversion with chemotherapeutic drugs on apoptosis was also assessed. p53 gene mutations were found in 44 primary gastric tumors, and super-high methylation of any of the 3 genes was only found in cases with wild type p53. Higher p53 pathway aberration was found in cases with male gender, intestinal type, and non-infiltrating type. Epigenetic treatment augmented apoptosis by chemotherapeutic drugs, partially through p53 transcription activity. In gastric cancer, p53 relevant and non-relevant pathways exist, and tumors with either pathway type exhibited unique clinical features. Epigenetic treatments were proved to induce apoptosis partially through p53 activation.

研究分野：外科

キーワード：胃癌 epigenetic p53 新規治療

1. 研究開始当初の背景

癌の発生には癌抑制遺伝子の発現低下が重要であることが知られていた。なかでもプロモーターDNA のメチル化により発現が低下する機序は、癌抑制遺伝子の発現低下を説明する主要な変化であり、癌の発生に極めて重要な意義を有すると考えられる。癌特異的メチル化遺伝子が次々に発表されていくなか、包括的遺伝子検索で high throughput にメチル化遺伝子同定する方法として、脱メチル化処理後マイクロアレイを行う方法 (pharmacological unmasking microarray) がわれわれによって独自に開発された (Yamashita K et al. Cancer Cell 2002)。この方法によって同定された新規遺伝子の特徴から、メチル化遺伝子の発現パターンとマイクロアレイのデータの関係が明らかになり、より頻度の高いメチル化遺伝子が次々に同定されることとなった。今回、研究を行う胃癌においても、新規メチル化遺伝子として Cyclin A1, (Tokumaru Y and Yamashita K et al, Cancer Res), PGP9.5 (Yamashita K et al. Cancer Cell 2005), NMDAR2B (Lee J and Yamashita K et al. Int J Cancer 2008) が同定され、実際のメチル化が確認された。注目すべきことは、これらの遺伝子が いずれも p53 経路に位置する遺伝子であったことであった。



2. 研究の目的

胃癌においては 30%以上の症例が p53 遺伝子に変異を有することが知られている。原発胃癌における p53 の遺伝子変異と p53 経路上の遺伝子メチル化の間にどのような関係があるかを明らかにすることが本研究の目的である。

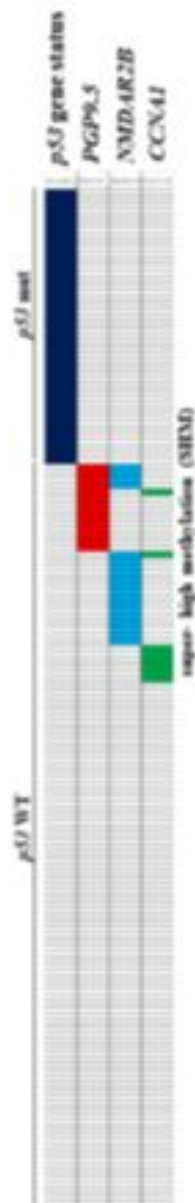
3. 研究の方法

- (1) 163 例の原発胃癌における PGP9.5, Cyclin A1, NMDAR2B のメチル化レベルを測定した。原発癌より DNA を抽出しバイサルファイト処理を行い、TaqMan probe を用いた定量的 PCR を用いて正確な定量値 (TaqMeth V) を算出した。同じ組織の DNA を用いて p53 変異についても SSCP 法で同定し、p53 WT あるいは p53 変異症例の TaqMeth V を比較した。
- (2) p53 遺伝子変異および 3 個の p53 経路遺伝子の SHM を示す症例を p53 aberration 症例と定義して、そうでない p53 non-aberration 症例との臨床病理学的特徴の比較を行った。臨床病理学的比較には予後も含めた。
- (3) p53 WT である胃癌株化細胞 NUGC4 において、epigenetic 抑制実験をおこなった。また、p53 変異を有する胃癌株化細胞 KATO III においても同様の実験を行った。

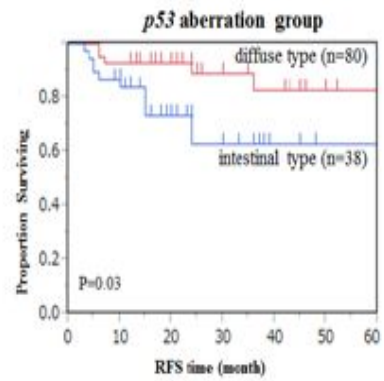
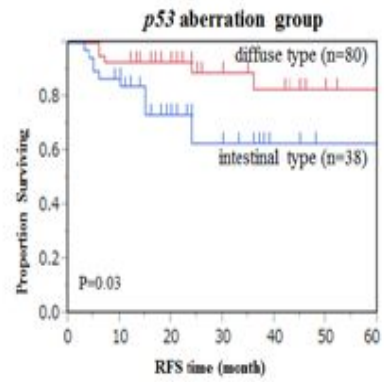
4. 研究成果

- (1) 163 例の原発胃癌組織において p53 WT 症例にのみ認める Super High methylation (SHM) が確認された。SHM を認めた症例は p53 変異症例とは厳密に排他的な関係にあり、p53 経路の不活化が DNA メチル化によって起こっている可能性があると考えられた。また、3 個の遺伝子はお互いに排他的関係にあるこ

とが多く、癌組織においては、p53 遺伝子変異を最小限の遺伝子変化で遂行していることが予想された。



- (2) p53 aberration 症例は男性 (p=0.003)、腸型組織型 (p=0.005)、および非浸潤型 (p=0.001)の胃癌に特徴的であった。P53 aberration 症例はリンパ節転移や遠隔転移、腹膜播種の頻度が低かった。予後に関しては stage II/III 症例で p53aberration group 症例は組織型の違いにより大きな予後の差を示した。



- (3) NUGC4 細胞株では、epigenetic inhibitor が化学療法による apoptosis を増強し、この際に p53 タンパクが誘導されていることが確認された。一方、KATO III 細胞では p53 活性は起こらないにも関わらず、強い apoptosis が認められた。
- (4) 以上の結果から考えると、胃癌においては p53 経路と p53 を介さない経路が apoptosis を誘導する経路としてあることが明らかになった。胃癌組織において、p53 経路の不活化が最小限の経路遺伝子の不活化で生じていることが確認されたが、こと化学療法に対する apoptosis の効果については、p53 の関連する経路と関連しない経路があり、epigenetic 療法そのものが、重要な癌治療の候補となることが考えられた。

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 1 件)

Waraya M, Yamashita K, Ema A, Katada N, Kikuchi S, Watanabe M. Exclusive Association of p53 Mutation with Super-High Methylation of Tumor Suppressor Genes in the p53 Pathway in a Unique Gastric Cancer Phenotype. PLoS One. 2015 Oct 8;10(10):e0139902.

doi: 10.1371/journal.pone.0139902.
eCollection 2015 (査読有)

[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

山下 継史 (YAMASHITA,Keishi)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 70406932

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: