

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861245

研究課題名(和文)喫煙肺腺癌特異的なエピゲノム異常を指標にした新規診断・治療標的遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of a novel tumor-suppressor gene through methylome analysis in smoking-associated lung adenocarcinoma

研究代表者

梶浦 耕一郎(KAJIURA, Koichiro)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：60596253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙関連肺腺癌のエピゲノム異常を臨床検体を用いて網羅的に探索した。TRIM58は癌部で有意にメチル化が高く、喫煙者群でメチル化が高い傾向にあった。Pyrosequencingにて同様に癌部で有意にメチル化が高かった。RT-PCRでは癌部で有意にmRNAの発現が低下していた。免疫染色でも癌部には蛋白発現が低下していた。肺癌培養細胞株A549にトランスフェクションし、セルカウントやMTTアッセイで増殖抑制が認められた。また、SCIDマウスに皮下移植を行うと、有意に腫瘍増殖を抑制した。肺癌においてTRIM58はDNAメチル化により不活性化する癌抑制遺伝子であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We explored aberrant DNA methylation of lung adenocarcinoma possible to be induced by smoking with surgical specimen. Comprehensive analysis of epigenome alternation showed TRIM58 gene was hypermethylation on promotor region in cancer tissue significantly. It is tendency that hypermethylation in smoker cohort compare to non-smoker cohort. Pyrosequencing showed similar result. Real time RT-PCR showed mRNA expression is lower in cancer tissue than in normal tissue significantly. Immunostaining showed protein expression level is lower in cancer tissue than in normal tissue. We transfected TRIM58 in A549. Cell count and MTT assay showed cell growth inhibition in A549 transfected TRIM58. We transplanted this A549 cell line to subcutaneous in SCID mice, The growth of A549 transfected TRIM58 was inhibited significantly. TRIM58 is thought to be tumor suppressor gene and inactivated by DNA methylation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺腺癌 エピゲノム メチル化 喫煙

1. 研究開始当初の背景

一般に癌は様々な遺伝子に異常が生じそれらが蓄積することにより進展するが、遺伝子異常の背景には塩基配列、転座、コピー数の増減などのゲノム構造異常と、これらを伴わないエピゲノム異常がある。非小細胞肺癌でも、ゲノムレベルでは EGFR、p53、K-ras などの遺伝子変異や EML4-ALK 融合遺伝子が報告されており、エピゲノム異常としては hMLH1、APC、MGMT、p16、RASSF1、FHIT などの癌抑制遺伝子のプロモーターの DNA メチル化による発現消失が認められている。我々のグループでも、肺扁平上皮癌での高頻度の癌抑制遺伝子の異常メチル化(p16:26%, APC:44%, MGMT:20%)を報告している(Lung Cancer, 2006, Mol Carcinog, 2011)。

これまで喫煙と関連する肺癌として扁平上皮癌と小細胞肺癌が示されていたが、最近のフィルター付きタバコ、低タール低ニコチンのタバコの普及により肺腺癌の一部も喫煙と関連性があることが明らかになってきている。本邦のコホート研究では、非喫煙者を1とした場合の喫煙者の肺腺癌リスクは、男性で2.8倍、女性で2.0倍と高くなることが報告されている。非喫煙者の肺腺癌では EGFR 変異や EML4-ALK などのゲノム異常が認められ、これらの異常に依存して比較的エピゲノム異常を含めた他のドライバー変異を必要としないことからこれらの異常を標的とした分子標的治療の有効性が認められる。一方、喫煙者の肺腺癌では KRAS 変異などがドライバーとして知られるものの、同時に癌抑制遺伝子のゲノム・エピゲノム異常による不活性化をはじめ様々な異常が蓄積しており、分子標的治療を考える場合でも、多種類の標的遺伝子異常を単独あるいは多数の組み合わせで標的とできるような手段や薬剤を開発して治療法のアルゴリズムを構築する必要があると考えられる。我々のグループも、KRAS 遺伝子変異の頻度が、非喫煙者肺腺癌の6%に対し、50pack-year以上の喫煙者では18%で、喫煙量の増加とともに増加すること(Cancer Res, 2004)、肺腺癌で喫煙量と p53 遺伝子異常頻度が相関することを報告した(J Surg Oncol, 1996)。

最近、次世代シーケンサーを用いた非小細胞肺癌のゲノム異常の網羅的解析から、次々に新たなドライバー遺伝子異常候補が同定

され、肺癌形成や病態の分子機序やサブグループごとの遺伝子異常とその組み合わせの特徴なども報告されてきているが、エピゲノム異常に関してはまだ詳細かつ網羅的な検討は少ない。

さらに、規模配列解析能力と多くの情報科学者を備える拠点型研究でも、癌細胞に検出される膨大な数の「Passenger 変異」と真の「Driver 変異」とを区別することは容易ではないこともわかってきている。

このような背景から、(1) non-random なエピゲノム異常の標的となり活性化、不活性化を受ける遺伝子候補をゲノムワイドに検出し、(2)候補遺伝子異常の生物学的意義の確認によりアノテーションを確定することを目的とする研究は、喫煙関連肺腺癌の個別化医療のアルゴリズムを考えるうえで、予防や診断マーカーの提供のみならず、特異的分子標的治療薬や広くエピゲノム修飾に働く治療薬開発とその適応症例選別のバイオマーカー選択にも有用な新規の情報を提供しようと考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

肺腺癌でも、既に次世代シーケンサーによる大規模解析でゲノム異常の網羅的探索とこれによる新規ドライバー遺伝子変異の同定がなされている。ドライバー遺伝子変異は、EGFR、KRAS、BRAFのように互いに排他的なものがある一方で、喫煙関連肺腺癌で認められる KRAS 変異癌では KRAS 以外にも多種のゲノム・エピゲノム異常を同時に持つことから、エピゲノム異常標的遺伝子も既知の遺伝子に加えて新規のもの同定が見込まれるが、喫煙関連肺腺癌の DNA メチル化標的を網羅的に検討したものは少なく、さらに標的遺伝子候補がカタログ化されてもこれらについて臨床病理学的ならびに機能的なエビデンスを付加する作業はほとんどなされていないのが現状である。このため、網羅的探索から候補遺伝子のアノテーション付けまでを行うことで喫煙関連肺腺癌の病態発生と進行に関与する DNA メチル化異常標的遺伝子候補同定を目指す本研究は、予後の悪い喫煙関連肺腺癌の早期あるいは予後診断や治療アルゴリズムの構築に向けた橋渡しになり得る点で特色があり、喫緊に取り組むべき意義ある課題である。

予防や早期診断、分子標的治療薬とコンパニオン診断薬開発のためのシーズとなる標的遺伝子やその異常の提示から、診断ツールや総合的治療アルゴリズムの開発につながる事が期待される点でも、意義がある。

3. 研究の方法

(1) 年齢・性別・病理学的所見・進行病期を一致させた喫煙者と非喫煙者の癌部と非癌部の DNA と RNA を手術検体の凍結標本より抽出する。

(2) DNA は bisulfite 処理後、infinium methylation assay で 47 万の CpG サイトを網羅的に解析する。

DNA をバイサルファイト処理し、非メチル化 C U, メチル化 C C に変換し、HumanMethylation 450K BeadChips を使用して、infinium methylation assay を行う。iScan で BeadChip をスキャンし、47 万の CpG サイトのメチル化の有無を調べる。

(3) 非喫煙者と喫煙者の癌部と非癌部を対比させつつ、メチル化レベルの差が大きい CpG サイトを抽出する。メチル化のパターンや場所や量を検討し、メチル化で活性が変化するとと思われる候補遺伝子をピックアップする。

非喫煙者と喫煙者の癌部・非癌部を対比させつつ、メチル化レベルの差の大きい CpG サイトを抽出する。その CpG サイトがどの遺伝子領域に存在するかを調べ、メチル化異常標的遺伝子候補を同定する。候補遺伝子に関してはその遺伝子上にある CpG サイト毎のメチル化レベルと場所（プロモーター領域かどうか）を調べる。高メチル化ならびに低メチル化サイトの両方において検索する。

(4) Real-time PCR にて癌部・非癌部での発現変化を確認する。

RNA を cDNA に変換し、メチル化異常標的遺伝子候補に関して、個々に臨床検体で発現変化するかどうかを確かめる。また、培養細胞にて脱メチル化やヒストン脱アセチル化を行い、エピゲノム修飾がとれたときに発現が回復するかを調べる。

(5) メチル化解析

候補遺伝子に関して、臨床検体や培養細胞によるメチル化解析 (pyrosequencing) によりメチル化の validation を行うとともに、より多くの臨床検体で確認する。

(6) 候補遺伝子の免疫染色を行う。

FFPE組織標本で候補遺伝子の発現状況を免疫染色で確認する。

(7) 培養細胞を用いて候補遺伝子の強制発現やノックダウンを行う。

培養細胞をもちいて候補遺伝子の強制発現やノックダウンを行い、腫瘍細胞が増殖/浸潤もしくはアポトーシスするのかを検討する。Cell カウントや MTT assay、アガロースゲルによるコロニー形成を観察する。

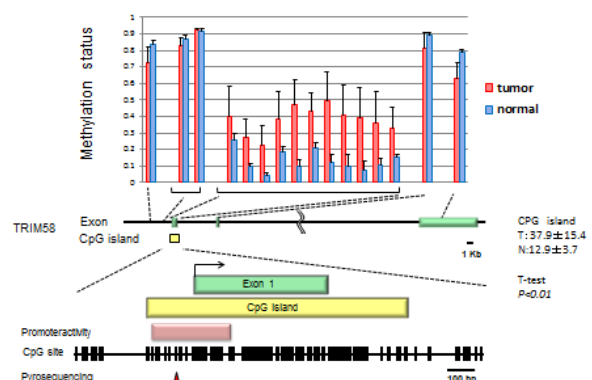
(8) SCID マウスに皮下移植を行い CT volume metry を行う。

SCID マウスに前述のトランスフェクションした細胞株を皮下移植し、増殖を観察する。

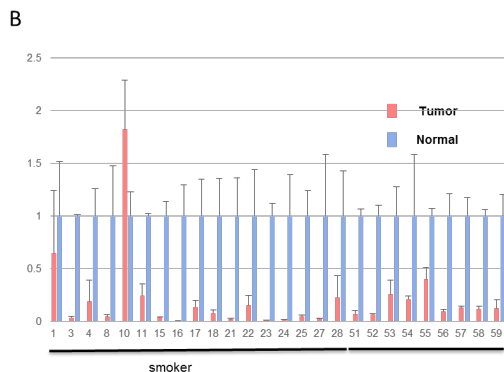
以上の解析を踏まえ、喫煙関連肺腺癌におけるエピゲノム異常を解析し、癌関連遺伝子を同定するとともに、治療にも関連する情報が得られると考えられる。

4. 研究成果

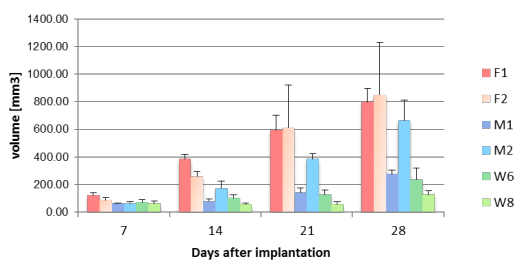
喫煙が発症要因になっている可能性のある肺腺癌（喫煙関連肺腺癌）のエピゲノム異常を探索するために、臨床検体を用いた網羅的な CpG サイトの DNA メチル化及び発現解析により探索した。Infinium methylation assay にて DNA メチル化を網羅的に検索したところ TRIM58 は癌部正常部比較のメチル化は total 群で tumor : $37.9 \pm 12.9\%$ 、normal : $15.4 \pm 3.7\%$ (t-test $p < 0.0001$)、smoker 群で、tumor : $45.1 \pm 9.7\%$ 、normal : $14.5 \pm 3.6\%$ (t-test $p < 0.0001$)、non-smoker 群で、tumor : $30.7 \pm 14.8\%$ 、normal : $11.3 \pm 2.0\%$ (t-test $p < 0.0001$) であり、癌部で有意にメチル化が高く、より smoker 群でメチル化が高い傾向にあった（下図）。



Pyrosequencing にても同様に癌部で有意にメチル化が高かった。Real time RT-PCR では癌部正常部比較で (/normal tissue) では smoker 群で 0.12 ± 0.08 、non-smoker 群では 0.12 ± 0.05 と喫煙に有無に関係なく、癌部で有意に mRNA の発現が低下していた (下図)



免疫染色でも癌部には発現が低下しており、蛋白レベルでも発現抑制が認められた。TRIM58 の発現のない肺癌培養細胞株である A549 に mutant-TRIM58 と wildtype-TRIM58 を transfection した。Cell カウントでは wild-TRIM58-A549 で増殖抑制が認められた。MTT assay でも同様の結果であった。また、これらの A549 を SCID マウスに皮下移植を行い、CT volumetry した。28 日後の大きさは control 群 $825 \pm 237\text{mm}^3$ 、mutant 群 $470 \pm 88\text{mm}^3$ 、wildtype 群 $230 \pm 56\text{mm}^3$ と有意に腫瘍増殖を抑制した。



これらの実験結果により肺癌において TRIM58 は smoker に有意な DNA メチル化を伴い、DNA メチル化により不活性化する癌抑制遺伝子であると考えられた。

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0件)

[学会発表](計1件)

梶浦耕一郎、井本逸勢、増田清士、田嶋 敦、近藤和也、丹黒 章
Identification of a novel tumor-suppressor gene through methylome analysis in smoking-associated lung adenocarcinoma
第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日-5 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[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：
出願年月日：
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

梶浦 耕一郎 (KAJIURA, Koichio)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：60596253

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：