

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460952

研究課題名(和文) DSB-HR食道がん放射線化学療法感受性予測診断システム構築

研究課題名(英文) DSB-HR diagnostic system predicting the sensitivity for chemoradiation therapy in esophageal cancer

研究代表者

前畑 忠輝 (Maehata, Tadateru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：90534199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌に対する放射線化学療法の治療効果予測診断システムの構築を目的として、治療感受性の「カギ」となる遺伝子のDNAメチル化異常を見つけ出すために高感度網羅的メチル化解析を行った。非癌部に比べ、癌部で有意にメチル化している37の候補アレブローブ(15遺伝子)を選出した。その中で最も多くのブローブが該当し、薬物代謝に関わるCYP26C1遺伝子が、食道癌特異的メチル化遺伝子候補として、抽出された。パイロシーケンス法による定量的メチル化解析において、放射線化学療法前後のCYP26C1遺伝子のDNAメチル化レベルの変化を明らかにした。分子マーカーとして今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chemoradiation therapy (CRT) is widely used for patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Our aim was to identify methylated genes in tumor tissues by using genome wide DNA methylation analysis and to determine if DNA methylation status in tumor and adjacent nontumor tissues changes after CRT. Thirty-seven of 36,579 probes corresponding to the 15 unique genes were selected as candidate genes that are hypermethylated in ESCC. The most frequently selected probes (7 of 37) corresponded the CYP26C1 gene. CYP26C1 methylation levels were significantly higher in tumor than nontumor tissues in both test and validation set samples. Interestingly, methylation levels of CYP26C1 in tumor tissues were decreased in a subset of patients with ESCC after CRT. These results suggest that CYP26C1 methylation can be restored to the normal methylation levels by CRT in ESCC patients and that these epigenetic alterations can be used as molecular markers of cancer screening and treatment.

研究分野：消化器内科学

キーワード：DNAメチル化 放射線化学療法 食道扁平上皮癌 バイオマーカー homologous recombination

## 1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌（以下、食道癌）に対する放射線化学療法（Chemoradiation therapy: CRT）は、低侵襲かつ機能温存を可能とする治療法であるが、治療前に根治または治療効果が望める症例の予測は困難である。

放射線化学療法の効果予測が出来ないことは、食道がんにおける臨床的な問題点のひとつである。我々は臨床サンプルに適したメチル化異常を網羅的に解析する新たな手法: Hyper/Hypo Methylation Sensitive MCA-Micorarray (H/H-MCAM) 法を開発した。

食道がん放射線化学療法の特徴である遺伝子二本鎖切断 Double Strand Break (DSB) に焦点を当てた研究は存在しない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、治療感受性の「カギ」となる DNA メチル化異常を網羅的に明らかにするとともに homo1ogous recombination (HR) 機構に焦点を当て DNA メチル化異常を明らかにすることを目的とする。

(2) 網羅的 DNA メチル化解析法である Methylated CpG island amplification Microarray (MCAM) 解析を用いて、食道癌に特徴的な DNA メチル化遺伝子を同定するとともに、放射線化学療法前後のメチル化レベルの変化を明らかにする。

(3) 最終的に、食道がんに対する放射線化学療法の治療効果予測診断システムを構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検体

食道扁平上皮癌の癌部に特異的な DNA メチル化異常を示す遺伝子を抽出する目的から、腫瘍部（放射線化学療法前/後）および非腫瘍部（治療前/後）の 4 点を生検により回収し、比較検討を行った。食道扁平上皮癌 34 症例の計 120 サンプルを用いた。

(2) 高感度網羅的メチル化解析 (Hyper/Hypo Methylation Sensitive MCA-Micorarray

H/H-MCA法)

H/H-MCAM 法は、メチル化シトシンに感受性のある制限酵素を用いた methylated CpG island amplification coupled with representational difference analysis

(MCA-RDA) 法とマイクロアレイ解析を組み合わせた方法である。

メチル化シトシンに感受性の制限酵素を用いた切断の後、特異的にアダプターをつけ PCR にてメチル化 CpG 断片のみ増幅する。PCR プロダクトを Cy3、Cy5 でラベリングした後、臨床サンプルおよび、低メチル化にも特化したカスタムアレイプローブを用いてアレイ解析した。

まず、癌に特異的な DNA メチル化遺伝子を見つけるため放射線化学療法前の症例（6 症例の癌部、非癌部 12 サンプル）を対象に、MCAM によるゲノムワイドな DNA メチル化解析をおこなった。

メチル化シトシンに感受性の制限酵素 XmaI により sticky-end で断片化し、特異的にアダプターをつけ PCR にてメチル化 CpG 断片のみ増幅した。PCR 増幅したもの（メチル化しているもの）を非癌部サンプルと癌部サンプルにそれぞれ作成し、Cy3、Cy5 にラベリングしたのちにカスタムメイドのマイクロアレイスライド（4x44K；1 スライドに 44,000 個のプローブが 4 つ搭載されたガラススライド）にハイブリダイズし、解析した。

Ingenuity Pathways Analysis (IPA)™ による解析も行った。

食道扁平上皮癌において高/低メチル化レベルを示す遺伝子を選定の後、治療抵抗性症例群により高レベルなメチル化を示す遺伝子を候補遺伝子として選出する。

(3) 食道扁平上皮癌細胞株における DNA メチル化および発現解析

8 種類の食道扁平上皮癌細胞株を常法により培養し、DNA、RNA を抽出した。DNA をメチル化解析、RNA をリアルタイム PCR を用いた発現解析に使用した。

食道扁平上皮癌細胞株を脱メチル化剤（5-aza-2'-deoxycytidine）、ヒストン脱ア

セチル化酵素阻害剤 (Trichostatin A, TSA) および両薬剤で処理後、RNA を抽出した。

(4) 選定した候補遺伝子の DNA メチル化解析定量的 DNA メチル化解析法であるパイロシーケンス法を用いた。細胞株、テストサンプル、検証サンプル (28 症例、112 サンプル) を用いて、選定した候補遺伝子の DNA メチル化が再現性のある結果を得る事ができるか解析を行った。

(5) パイロシーケンス法による HR 関連遺伝子の定量的 DNA メチル化解析

食道扁平上皮癌細胞株および食道扁平上皮癌サンプルを用いて、HR 関連遺伝子の定量的 DNA メチル化解析をパイロシーケンス法で行った。得られた結果から、候補遺伝子を選出した。

(6) 「食道扁平上皮癌に対する放射線化学療法の治療効果予測診断システム」の構築

得られた結果から治療効果予測診断に有効な候補遺伝子 (1. 食道扁平上皮癌特異的メチル化遺伝子、2. HR 関連メチル化遺伝子) を決定し、これによる感度、特異度を求め、「扁平上皮癌に対する放射線化学療法の治療効果予測診断システム」を構築する。

#### 4. 研究成果

(1) 食道扁平上皮癌に対する放射線化学療法の治療効果予測診断システムの構築を目的として、治療感受性の「カギ」となる遺伝子の DNA メチル化異常を見つけ出すために高感度網羅的メチル化解析を行った。

H/H-MCAM 法を用いて、テストサンプルつまり放射線化学療法前の食道扁平上皮癌 6 症例 12 検体 (癌部および非癌部) を解析した。非癌部に比べ、癌部で有意にメチル化している 37 の候補アレイプローブ (15 遺伝子) を選出した。

Ingenuity Pathways Analysis で、DNA メチル化されている遺伝子の機能分類を行った。Disease and Disorders カテゴリーでは、「Developmental Disorder」、Molecular and Cellular Functions では、「Cellular Development」、 「Cell Death」、 「Cellular Assembly and

Organization」 「Drug metabolism」、Physiological System Development and Function カテゴリーでは、「Organ Development」、「Tissue Morphology」、「Nervous System Development and Function」、「Connective Tissue Development and Function」、Canonical Pathways カテゴリーでは、「Thyroid Cancer Signaling」、「Role of Oct4 in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency」、「Neurotrophin/TRK Signaling」、「FXR/RXR (retinoid X Receptor, farnesoid X receptor) Activation」、「Human Embryonic Stem Cell Pluripotency」のように機能分類された。上記を踏まえ、最も多く (n = 7) のプローブが高メチル化に該当し、薬物代謝に関わる cytochrome P450, family 26, subfamily c, polypeptide 1 (CYP26C1) 遺伝子を食道扁平上皮癌に特徴的な DNA メチル化遺伝子候補として、さらなる解析の対象とした。

(2) CYP26C1 遺伝子は染色体 10 番長腕に位置し、7,434 bp、6 つのエクソンにより構成されている。UCSC Genome website、CpG island searcher 解析により、プロモーター領域に、CpG island (C+G content 64.4% observed CpG/expected CpG ratio 0.888, length 807bp) を有していた。転写開始点近傍にパイロシーケンスのプライマーを設計した。

(3) 食道癌細胞株の CYP26C1 メチル化と発現 TE1 (70%)、TE4 (85%)、TE6 (89%)、TE11 (91%)、TE15 (89%)、KYSE70 (88%)、TTn (84%) と、解析した全ての食道扁平上皮癌細胞株で DNA メチル化を認めた。また、正常食道粘膜における発現と比較して、検討した全ての細胞株において、CYP26C1 mRNA 発現の低下を認めた。脱メチル化剤処理による CYP26C1 再発現実験では、検討した TE10、T.Tn、KYSE70 細胞株いずれも脱メチル化剤処理で、CYP26C1 mRNA 発現の再発現、発現亢進を認めた。

(4) テストセット 6 症例の検討では、癌部で、非癌部に比べ、有意な CYP26C1 遺伝子 DNA

メチル化レベルの亢進を認めた。また、MCAM で認めたメチル化レベルとパイロシークェンスによるメチル化レベルは、有意な相関関係を認めた。

#### (5)放射線化学療法前後の CYP26C1DNA メチル化

検証セット 28 例で解析した。癌部で、非癌部に比べ、有意な DNA メチル化レベルの亢進を認めた。治療前後を比較すると、治療後に有意なメチル化レベルの低下を認めた。特に治療前のメチル化レベルの高い症例で治療後にメチル化レベルが低下した。

また、非癌部においても一部の症例で高メチル化を認め、癌部と同様に、治療後にメチル化レベルの低下を認めた。

LINE1 メチル化に関しては、癌部、非癌部ともに一部の症例で、治療前のメチル化レベルの低下を認め、このような症例では、治療後にメチル化レベルが回復した。

#### (6)パイロシークェンス法による HR 関連遺伝子の DNA メチル化定量解析

臨床検体でHR 関連遺伝子のDNA メチル化定量解析をパイロシークェンスで行うべく、食道扁平上皮癌細胞株を用いて、候補遺伝子を選定し、実験条件の至適化に成功した。

食道扁平上皮癌細胞株で選定した HR 関連遺伝子のメチル化定量解析をパイロシークェンスを用いて臨床検体で解析し、複数のマーカー候補を得た。

(7)治療前を Cy5 でラベリング、治療後を Cy3 でラベリングし、各サンプルで共通して治療前でのみ高度に検出されるものを拾い上げることで、背景因子に影響されず癌にのみ特異的なメチル化遺伝子を抽出することが可能となり得る。

食道扁平上皮癌に特異的メチル化遺伝子候補を絞り込むことに成功した。細胞発生、細胞死、薬物代謝に関わる遺伝子などの DNA メチル化が認められた。

レチノイン酸は、食道扁平上皮の正常な分化に重要である。CYP26C1 遺伝子は、all-trans-retinoic acid (ATRA) やその

stereoisomer である 9-cis-RA (preferred substrate)などのレチノイン酸代謝に関わっている。パイロシークェンスによる定量的メチル化解析においても、癌部で有意に CYP26C1 遺伝子メチル化レベルが高く、マーカー候補であると示唆された。

食道癌における DNA メチル化の標的遺伝子として CYP26C1 遺伝子を同定し、放射線化学療法前後のメチル化レベルの変化を明らかにした。分子マーカーとして今後の臨床応用が期待される。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

前畑 忠輝 (MAEHATA,Tadateru)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 90534199

##### (2)研究分担者

山本 博幸 (YAMAMOTO,Hiroyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40332910

伊東 文生 (ITO, Fumio)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90223180

渡邊 嘉行 (WATANABE, Yishiyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号: 90329243