

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09178

研究課題名(和文) 胸腺癌に対するエピジェネティックな診断と治療

研究課題名(英文) Epigenetic diagnosis and therapy for thymic carcinoma

研究代表者

近藤 和也 (KONDO, Kazuya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：10263815

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)：胸腺上皮性腫瘍のDNAメチル化を網羅的に検索し、正常胸腺、胸腺腫と比較して有意に胸腺癌でDNAメチル化の多い7遺伝子(GNG4, GHSR, SALL3, HOXD9, GAD1, NPTX2, MT1)を抽出し、DNAメチル化、mRNA、蛋白発現を解析した。

解析した7つの遺伝子において、DNAメチル化は正常胸腺、胸腺腫と比較して胸腺癌で有意に高率であり、DNAメチル化が高いほど無再発生存率が悪く、腫瘍の悪性度と関連した。特に、GAD1遺伝子において、胸腺癌はDNAメチル化が高く、mRNA・蛋白の発現も高く、DNAメチル化が高いほど無再発生存率が悪かった。oncogenicな働きが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腺癌は、難治性であり、治療薬も限定されている。新薬を発見するため、新しいアプローチが必要である。私たちの研究は、網羅的にDNAメチル化を解析し、胸腺癌が“エピジェネティック(遺伝子変化を伴わない遺伝子発現の変化)な異常を多く有する腫瘍”であることを示した。特に、GAD1遺伝子は、DNAのメチル化頻度と蛋白発現が相関し、腫瘍の悪性度と関連する。治療の候補分子となることが推測された。

研究成果の概要(英文)：We performed genome wide screening of methylated CpG islands in thymoma and thymic carcinoma. We identified 92 CpG islands significantly hypermethylated in thymic carcinoma in relation to thymoma and selected GNG4, GHSR, HOXD9, SALL3, GAD1, NPTX2 and MT1 which are related to cancer. We examined the methylation, mRNA and protein expression. Methylation was significantly higher in thymic carcinoma than in thymoma and revealed a high discrimination between thymic carcinoma and thymoma in all 7 genes. Among the 7 genes, relapse free survival was significantly worse in tumors with a higher DNA methylation than in those with a lower DNA methylation. In GAD1, mRNA and protein expression were significantly higher in thymic carcinoma than in thymomas. Tumors with high GAD1 DNA methylation and high mRNA and protein expression had significantly shorter relapse free survival rates than those with low levels. It acts as oncogenic function.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：胸腺癌 DNAメチル化 網羅的解析 CpGサイト 癌抑制遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胸腺癌は胸腺腫と同様に胸腺上皮から生じる腫瘍であるが、難治性で予後が悪い腫瘍である。呼吸器外科手術の中で縦隔腫瘍の占める割合は、6.3%で、増加傾向にある。約半数を胸腺上皮性腫瘍が占める(胸腺腫 40%、胸腺癌 7%)。進行した胸腺癌は、難治性で予後が悪い。

進行胸腺癌の治療に様々な分子標的薬剤が試みられているが、効果は乏しい。胸腺腫は化学療法に対して比較的高い奏効率が報告されている(response rate 68%)。一方、胸腺癌は、いずれの化学療法も奏効率約 20~50%で胸腺腫と比較すると劣る。殺細胞性抗癌薬として、カルボプラチンとパクリタキセルが比較的良好な効果をあげている(objective response rate:ORR 22~36%)。分子標的薬剤として、EGFR 阻害薬、c-KIT 阻害薬は試みられたが、効果は乏しい。血管新生阻害薬スニチニブは胸腺癌で partial response (PR) 26%, stable disease (SD) 65%であった。レンバチニブは比較的良好な効果と報告している(ORR 38%)。現在、Src 阻害薬、mTOR 阻害薬、免疫チェック阻害薬などが検討されている。

epigenetic な異常を有する腫瘍に対して、epigenetic な治療が有用である。以前よりある種の腫瘍に対して、DNA methyltransferase (DNMT)阻害薬 と histone deacetylase (HDAC) 阻害薬の効果が期待されてきた。最近、各種癌に対する epigenetic な治療の標的となる酵素として、1) DNMT (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B など), 2) histone lysine methyltransferase (KMTs, EZH2, DOT1L, SETDB など), 3) histone lysine acetyl transferase (p300, CBP など)がある。epigenetic 機能の酵素の遺伝子異常や epigenetic な異常を多く有する腫瘍を検討し、epigenetic な治療の候補腫瘍を同定することは大切である。私たちの今までの研究より胸腺癌は胸腺腫と比較して DNA メチル化の頻度が高く、epigenetic な治療の候補となる可能性がある。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用い、網羅的に胸腺腫と胸腺癌の genetic な変化を検索する研究が行われているが、epigenetic な異常に関しては、ほとんど研究されていない。私たちの目的は、胸腺上皮性腫瘍の DNA メチル化を網羅的に検索し、胸腺癌で高頻度にメチル化した CpG island を同定し、これらの遺伝子の DNA メチル化、mRNA の発現、蛋白発現を検討し、胸腺癌の悪性度と関連する癌抑制遺伝子を発見し、新たな診断・治療の標的することである。また、epigenetic な治療の候補となるか、を検討することである。

私たちは今まで胸腺上皮性腫瘍の DNA メチル化に注目し、既知の癌関連遺伝子のメチル化を検索し、胸腺癌では、高頻度であることを報告してきた(Lung Cancer 2009 64:155-, 2013, 83:279-)。DNA メチル化が胸腺上皮性腫瘍の悪性度と関連がある可能性が予想された。既知の癌関連遺伝子のメチル化を検討した研究は他にも少数ながら存在する。

今回は、胸腺癌の悪性度と関連する未知の癌関連遺伝子を探索する。網羅的な手段を使用した genetic な研究はあるが、epigenetic な研究はまだ行われていない。私たちはすでに、胸腺癌と胸腺腫を Human Methylation 450K DNA Analysis Kit (illumina)を用いて 47 万の CpG site の DNA メチル化を網羅的に検索し、胸腺癌で高頻度にメチル化した 93 個 CpG island を同定している(Lung cancer 111, 116-, 2017)。この解析から胸腺神経内分泌腫瘍で特異的に DNA メチル化を認め、蛋白発現が低下する RASSF1A を同定した。また、肺腺癌と正常肺の網羅的な DNA メチル化を検索し、肺癌で有意に高率の 113 個の CpG island を抽出した。この中より、新たな癌抑制遺伝子 TR158 を同定した(oncotarget 8, 2890-, 2017)。

3. 研究の方法

私たちは、今までの研究で、胸腺癌(7例)と胸腺腫(8例)を Human Methylation 450K DNA Analysis Kit(illumina)を用いて 47 万の CpG site の DNA メチル化を網羅的に検索した。解析は Illumina Methylation Analyzer (<http://www.rforge.net/IMA/>) を使用し、胸腺腫と比較して有意に胸腺癌で DNA メチル化の多い 92 個の CpG island を抽出した(Lung cancer 111, 116-, 2017)。その中から、癌関連遺伝子と予想される 7 遺伝子 pick up した。

(1) 7 遺伝子 (GNG4, GHSR, SALL3, HOXD3, GAD1, PTX2, MT1A) の胸腺癌で高頻度のメチル化を示す CpG island の中で pyrosequence を行うための PCR primer および sequence primer を作成する。

(2) 凍結材料の胸腺癌 16 例と胸腺腫(30 例, A 型;5, AB 型;2, B1 型;4, B2 型;10, B3 型;9) について、DNA メチル化を検査し、胸腺癌で DNA メチル化の多い CpG island であるか、を確認する。

DNA を bisulfite 処理(メチル化シトシン シトシン、非メチル化シトシン チミンに変換)EpiTect® Bisulfite (Qiagen) を使用

7 の遺伝子について、Pyrosequence 法にて塩基配列を決定し、DNA メチル化の頻度(%)を測定する。PyroMark Q24 Advanced (Qiagen) を使用

胸腺癌、胸腺腫、正常胸腺組織で 7 遺伝子の DNA メチル化の頻度に有意な差は認められるかどうか、を検討する。

(3) pyrosequence にて、胸腺癌の高メチル化が確認できた遺伝子について、RT-PCR 法にて mRNA の発現を調べる。

RT iScript RT Supermix for RT-qPCR を使用

SYBR Green 法 (BIORAD) にて PCR 施行し、mRNA の発現を測定する。

Applied Biosystems 7500 を使用、house keeping gene として、GAPDH を使用

Primer は GHSR qHsaCED0038491, GNG4 qHsaCED0036757, HOXD9 qHsaCED0023285, SALL3 qHsaCEP0056180, GAPDH qHsaCEP0041396 を使用

(4) mRNA と DNA メチル化頻度に相関関係を認める場合は、その分子の抗体を購入し、免疫染色を行い、蛋白発現を調べる。LSAB 法 (labeled streptavidin biotinylated antibody) 使用 DNA メチル化頻度と mRNA と蛋白発現の関連から癌抑制遺伝子かどうか、を検討する。

(5) 7 遺伝子以外の遺伝子から胸腺癌の癌抑制遺伝子の候補を検討する。

7 遺伝子以外の遺伝子について、DNA メチル化の頻度グラフを作成し、promoter 領域に DNA メチル化を認める遺伝子は、primer を作成し、bisulfite 処理-pyrosequence 法で DNA メチル化を測定する。

mRNA の発現を測定し、mRNA と DNA メチル化頻度に相関関係を検討する。

mRNA と DNA メチル化頻度に相関関係を認める場合は、その分子の抗体を購入し、免疫染色を行い、蛋白発現を調べる。

4. 研究成果

GNG4, GHSR, HOXD9, SALL3 遺伝子について、胸腺癌の DNA メチル化の頻度は、正常胸腺と胸腺腫と比較して、有意に高値であった。また、DNA メチル化の頻度の高い腫瘍は、低い腫瘍と比較して、無再発生存率が有意に悪かった(International Journal of Oncology, 56, 315-, 2019)。

GHSR のリガンドと受容体の発現(RT-PCR)に関して検討した。variant form のリガンドと受容体で GHSR メチル化が有意に多いこと示した(Oncology Letters, 22, 793-, 2021)。

GAD1 遺伝子について、胸腺癌は 胸腺腫及び胸腺と比較して、GAD1 の DNA メチル化の頻度が有意に高く、mRNA および蛋白の発現量も高かった。DNA メチル化が高いほど無再発生存率が悪かった。oncogenic な働きが推測された(Oncology Letters, 21, 483-, 2021)。

NPTX2 において、DNA メチル化の頻度は正常組織、胸腺腫と比較し、胸腺癌で有意に高かった。mRNA と蛋白発現において、胸腺内分泌腫瘍が著明な高い発現を認めた。

MT1A において、DNA メチル化は胸腺腫、正常胸腺と比べて胸腺癌で有意に高率で、mRNA 発現は胸腺腫、胸腺癌と比べて正常胸腺で有意に高かった。MT1A は、癌抑制遺伝子的な機能をしていることが示唆された。

結論

解析した7つの遺伝子において、DNA メチル化は正常胸腺、胸腺腫と比較して胸腺癌で有意に高率であり、腫瘍の悪性度と関連した。GAD1 遺伝子は、oncogenic な働きが、MT1A は tumor suppress な働きが推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Soejima Shiho, Kondo Kazuya, Tsuboi Mitsuhiro, Muguruma Kyoka, Tegshee Bilguun, Kawakami Yukikiyo, Kajiura Koichiro, Kawakita Naoya, Toba Hiroaki, Yoshida Mitsuteru, Takizawa Hiromitsu, Tangoku Akira	4. 巻 21
2. 論文標題 GAD1 expression and its methylation as indicators of malignant behavior in thymic epithelial tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 483-494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12744	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tegshee Bilguun, Kondo Kazuya, Soejima Shiho, Muguruma Kyoka, Tsuboi Mitsuhiro, Kajiura Koichiro, Kawakami Yukikiyo, Kawakita Naoya, Toba Hiroaki, Yoshida Mitsuteru, Takizawa Hiromitsu, Tangoku Akira	4. 巻 22
2. 論文標題 GHSR methylation-dependent expression of a variant ligand and receptor of the ghrelin system induces thymoma tumorigenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 793-803
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.13054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 副島志帆, 近藤和也, 坪井光弘, 梶浦耕一郎, 六車京香, 川上行奎, 河北直也, 鳥羽博明, 吉田光輝, 滝沢宏光, 丹黒 章
2. 発表標題 胸腺上皮性腫瘍の悪性度とGAD1遺伝子のDNAメチル化と発現
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Bilguun Tegshee, Kazuya Kondo, Shiho Soejima, Kyoka Muguruma, Mitsuhiro Tsuboi, Koichiro Kajiura, Yukikiyo Kawakami, Naoya Kawakita, Toru Sawada, Hiroaki Toba, Mitsuteru Yoshida, Hiromitsu Takizawa, Akira Tangoku
2. 発表標題 Expression of variant ligand and receptor of Ghrelin system is related to tumorigenesis of thymoma
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 六車京香, 近藤和也, 副島志帆, Bilguun tegshee, 山下理子, 岸渕麗奈, 坪井光弘, 梶浦耕一郎, 川上行奎, 河北直也, 鳥羽博明, 吉田光輝, 滝沢宏光, 丹黒 章
2. 発表標題 胸腺上皮性腫瘍におけるMT1A遺伝子のDNAメチル化とmRNA発現
3. 学会等名 第40回日本胸腺研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉田 光輝 (YOSHIDA Mitsuteru) (30403710)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究分担者	宮本 直輝 (MIYAMOTO Naoki) (00865305)	徳島大学・病院・助教 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------