

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790664

研究課題名(和文)

膵液・胆汁を用いた複数癌抑制遺伝子の新しいメチル化検出法の開発と臨床応用

研究課題名(英文)

Development of detection of methylation of multiple tumor suppressor genes and its clinical application.

研究代表者

依田 広 (HIROSHI IDA)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90437294

研究成果の概要(和文)：胆汁において RUNX3 メチル化検出が可能であることを示した。胆道癌細胞において新規ヒストン脱アセチル化阻害剤を用いて RUNX3 の発現が回復することを見出し、その作用機序や抗腫瘍能を解析した。臨床胆道癌検体において、ヒストンのアセチル化状態を半定量的に測定できた。胆汁や癌組織中の RUNX3 メチル化検出やヒストンアセチル化状態の解析が、癌診断と新規治療の効果予測マーカーとなりうることを示した。

研究成果の概要(英文)：Detection of methylation of RUNX3 in bile juice was developed. Expression of RUNX3 in bile duct cancer cells was restored by the treatment with a new histone deacetylase inhibitor. Anti-tumor effect by the drug was revealed. Analysis of RUNX3 histone acetylation as well as DNA methylation can be a prognostic marker of bile duct cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：RUNX3、DNA メチル化、膵液、胆汁

1. 研究開始当初の背景

膵癌・胆道癌は早期発見が困難であり、外科的切除が可能な症例でも 5 年生存率が 10-20%程度、切除不能例では化学療法をおこなっても 1 年生存率が 30-40%ときわめて予後不良な悪性疾患である。したがって、膵癌・胆道癌の発癌機序の解明、早期診断技術、および新規治療法の確立が急務である。

これまで我々は膵癌・胆道癌細胞株を用いた研究により、新規癌抑制遺伝子 RUNX3 が高頻度に発現低下しており、その機序として、RUNX3 Exon1 領域の DNA CpG シトシンメチル化に関わることを明らかにしてきた。さらに RUNX3 発現が消失した細胞株に RUNX3 を強制発現させると、p21 の発現誘導を介して細胞周期が停止することを示した。

以上より、RUNX3 が癌抑制遺伝子として膵

癌・胆管癌発癌に関わる可能性を示したが、臨床検体を用いた発現解析や臨床的に使用可能な抗腫瘍薬を用いた検討はなされておらず、RUNX3の胆道・膵癌における臨床的意義についてはいまだあきらかではなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では次のことを目的とした。

まず、胆管癌細胞・膵癌細胞株や臨床検体における RUNX3 発現解析をおこない、DNAメチル化やヒストンアセチル化の解析をおこない RUNX3 発現低下の分子機構の解明をめざす。

また、他部位の癌にすでに治験下にて投与が行われている新規ヒストン脱アセチル化阻害剤 Vorinostat による胆道癌細胞株における RUNX3 発現回復効果や抗腫瘍効果・作用機序の解析をおこない、新規抗腫瘍剤としての臨床応用の可能性を示すことを目指す。

さらに、内視鏡下に得られた胆汁・膵液中の RUNX3 を含む複数遺伝子の DNA メチル化検出を行い、癌診断のマーカーとしての有用性を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胆道癌・膵癌細胞株より RNA を抽出し、RT 反応ののち、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法により RUNX3 mRNA の発現を定量的に解析する。また胆道癌臨床検体において、抗 RUNX3 抗体を用いた免疫組織染色法にて RUNX3 のタンパクレベルでの発現解析をおこなう。

(2) 胆道癌・膵癌細胞株から DNA を抽出し、bisulfite 処理をおこなったのち、メチル化特異的プライマーを用いた PCR (MSP 法) により増幅反応をおこない、RUNX3 Exon1 CpG シトシンメチル化状態を評価する。また細胞株および臨床検体より核タンパクを抽出し、抗アセチル化ヒストン抗体にて免疫沈降反応したのち RUNX3 特異的プライマーを用いて PCR 法にて増幅反応することにより (ChIP-PCR 法)、RUNX3 プロモーター領域のヒストンアセチル化状態の半定量解析をおこなう。

(3) RUNX3 発現の低下している胆道癌・膵癌細胞株において、脱メチル化剤 5-Azacytidine や新規ヒストン脱アセチル化阻害剤 Vorinostat を作用させ、その RUNX3 発現回復効果をリアルタイム PCR 法や免疫細胞染色法により解析する。また濃度や時間依存性につき検討する。

(4) Vorinostat 作用による RUNX3 プロモーター領域のヒストンアセチル化状態の評価を Chip-PCR 法にておこなう。また、抗腫瘍効果について、細胞増殖アッセイにて解析する。

(5) 胆道癌細胞株へ Vorinostat や TGF- β を作用させ、TGF- β と RUNX3 の協調的下流遺伝子である p21 の発現をリアルタイム RT-PCR により解析する。また、TGF- β 反応性レポーターである 3TP-Lux を培養細胞株にトランスフェクションし、Votonostat や TGF- β を作用させ、ルシフェラーゼアッセイにてまた TGF- β シグナル伝達について定量的に評価する。また RUNX3 siRNA の共トランスフェクションにより RUNX3 の関与について評価する。

(6) 抗腫瘍剤 5-FU の抗腫瘍効果が、Vorinostat と TGF- β によって増強されるかどうかを細胞増殖アッセイにて評価する。また p21 mRNA の誘導能につきリアルタイム PCR 法にて評価する。

(7) 膵液・胆汁臨床検体より DNA を抽出する。RUNX3 および p16 のメチル化状態をメチル化特異的 PCR にて解析する。

4. 研究成果

(1) 膵癌細胞・胆管癌細胞株における RUNX3 mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法にて解析したところ、約 70% の細胞株にて発現が低下しており、高頻度に発現低下していることを観察した。胆道癌臨床検体における免疫組織染色にても 77% の症例において RUNX3 発現が低下していることが判明した。

- (2) RUNX3 発現低下を示す胆道癌・膵癌細胞株では MSP 法にて RUNX3 の Exon1 領域の CpG メチル化がみられた。また RUNX3 発現低下を示す胆道癌細胞株において胆道癌において、RUNX3 のプロモーター領域のヒストンの低アセチル化状態が観察された。また臨床検体においてもヒストンの低アセチル化状態を観察することができ、臨床検体において癌マーカーとなりうる可能性を示すことができた。
- (3) RUNX3 発現低下している細胞株に脱メチル化剤 5-Azacitidine とヒストン脱アセチル化阻害剤 Vorinostat を作用させたところ、前者では RUNX3 mRNA の弱い発現回復が、後者では RUNX3 mRNA の強い発現回復がみられた。両薬剤の併用による発現回復増強作用はみられなかった。また Vorinostat の RUNX3 発現誘導効果は濃度および時間依存性であり、複数の細胞株において 48 時間後、10 μ M が最適条件であった。さらに免疫細胞染色により RUNX3 のタンパクレベルでの発現回復を確認することができた。
- (4) 胆道癌細胞株へ Vorinostat を作用させ、ChIP-PCR にて解析したところ、RUNX3 のプロモーター領域のヒストンは高アセチル化状態となり、その効果は濃度および時間依存的であった。これにより、RUNX3 の発現低下に RUNX3 プロモーター領域のヒストンの低アセチル化状態が関与していることが示唆された。
- (5) RUNX3 発現低下胆道癌細胞株へ Vorinostat を作用させたところ、p21 の発現は濃度・時間依存的に上昇し、その効果は TGF- β により増強された。TGF- β 反応性レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイにて、TGF- β と Vorinostat は相乗的に TGF- β シグナルを活性化した。この活性化は RUNX3 siRNA にて阻害された。したがって、Vorinostat は RUNX3 発現誘導を介して TGF- β と協調的に TGF- β シグナル経路を増強することが示された。
- (6) 胆道癌細胞株に Vorinostat、TGF- β と 5-FU を作用させたところ、相乗的な p21 発現誘導と抗腫瘍効果がみられた。
- (7) 非癌症例の胆汁や膵液に、培養癌細胞を段階希釈して混和したものを疑似検体として用いたところ、RUNX3 や p16 の DNACpG シトシンメチル化を 100 コピー/ml 程度の感度で検出することができた。また、癌症例の胆汁・膵液検体のみならず非癌症例の検体でも DNA メチル化が陽性となる例がみられ、これは前癌状態を示唆するものと考えられたが、症例が少なく、今後の症例の蓄積と臨床経過の観察により臨床的意義を明らかにしていきたいと考えている。また膵液・胆汁からの DNA 抽出は検体によってはしばしば困難であり、これは液性条件の大きなばらつきによるものと思われたが、最適条件設定実験をおこない、検出感度のさらなる向上をはかっているところである。
- (8) 以上、胆道癌細胞株において新規ヒストン脱アセチル化阻害剤 Vorinostat を作用させると、RUNX3 の発現が回復することを示した。そしてその機構として RUNX3 プロモーター領域のヒストンの低アセチル化状態を介していることを明らかにした。また、Vorinostat による抗腫瘍効果には、RUNX3 発現誘導を介した TGF- β シグナル伝達の活性化、およびその下流にある p21 の発現誘導を介していることを示した。胆道癌臨床検体において RUNX3 プロモーター領域のヒストンのアセチル化が検出可能であり、胆汁中・膵液中においては RUNX3 メチル化検出が可能であることを示した。これらの手法は単に癌診断のマーカーとして有効であるのみならず、今後 Vorinostat 治療などの新規治療が可能となった場合に、効果予測マーカーとなりうることが示唆される。今後も引き続き胆汁・膵液中のメチル化等の状態を効率よく検出する技術開発および、その臨床的意義について発展的研究をおこなっていく予定である。

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3件)

- ① Sakakura C, Hamada T, Miyagawa K, Nishio M, Miyashita A, Nagata H, Ida H, Yazumi S, Otsuji E, Chiba T, Ito K, Ito Y.、Quantitative analysis of tumor-derived methylated RUNX3 sequences in the serum of gastric cancer patients.、Anticancer Research、査読有、Vol29、2009、2619-2625
- ② Nishio M, Sakakura C, Nagata T, Komiyama S, Miyashita A, Hamada T, Kuryu Y, Ikoma H, Kubota T, Kimura A, Nakanishi M, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba Y, Sonoyama T, Ida H, Ito K, Chiba T, Ito Y, Otsuji E、RUNX3 promoter methylation in colorectal cancer: its relationship with microsatellite instability and its suitability as a novel serum tumor marker.、Anticancer Research、査読有、Vol30、2010、2673-2682
- ③ Shio S, Kodama Y, Ida H, Shiokawa M, Kitamura K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T、Loss of RUNX3 expression by histone deacetylation is associated with biliary tract carcinogenesis.、Cancer Science、査読有、Vol 102、2011、776-783

[学会発表] (計1件)

塩 せいじ、依田 広、千葉 勉、ヒストン脱アセチル化阻害剤による胆道癌細胞株におけるRUNX3 発現回復およびTGF- β 経路の活性化、第51回日本消化器病学会大会、2009年10月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依田 広 (HIROSHI IDA)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：90437294

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし