

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：20101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22790655
 研究課題名（和文） エピゲノムのアプローチによる未分化型胃癌の早期診断体系の構築

研究課題名（英文） Diagnostic systems of diffuse type gastric cancer using by epigenomic approach

研究代表者

山本 英一郎 (EIICHIRO YAMAMOTO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60567915

研究成果の概要（和文）：

胃炎および胃癌背景粘膜における網羅的なメチル化解析により新規胃癌関連遺伝子 RASGRF1 のメチル化は分化型胃癌および未分化型胃癌いずれの背景粘膜においても高頻度にメチル化しており、RASGRF1 のメチル化は胃癌リスク予測マーカーとして応用しうると考えられた。

さらに DNA メチル化が胃癌発症リスクの予測マーカーとして有用であるかを前向きに検証したところ、胃体部非癌胃粘膜における miR-34b/c のメチル化レベルは、内視鏡治療後の異時性多発胃癌を予測するマーカーとして有用であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Using methylated-CpG island amplification coupled with CpG island microarray (MCAM) analysis, RASGRF1 methylation was significantly elevated in gastric mucosa from patients with either intestinal or diffuse type gastric cancer (GC). Our data suggest that RASGRF1 methylation could be a useful biomarker with which to identify individuals at high risk for GC.

We evaluated the clinical utility of DNA methylation as a biomarker of metachronous GC risk by performing a prospective study. Our results suggest that methylation of miR-34b/c in background gastric mucosae may be a useful marker to predict metachronous GC risk.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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：癌、メチル化、マイクロアレイ、遺伝子診断、癌予防

1. 研究開始当初の背景

未分化型胃癌の発癌経路はいまだに不明な点が多い。分化型胃癌は *Helicobacter*

pylori (*H.pylori*) 感染による萎縮、腸上皮化生を経て発癌するが、未分化型胃癌は関連が明らかではなく異なる経路が存在すると

考えられている。

高度の萎縮、腸上皮化生は分化型胃癌の高危険群として認識され早期診断に有用である。一方で未分化型胃癌は臨床病理学的高危険群が不明であり、またリンパ節転移なども早期の段階からきた可能性が高い。

発癌の分子機構を明らかとし、分子レベルから早期診断、発癌リスク診断への新たな診断体系を構築することは極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

未分化型胃癌の新規診断体系を構築することを目的とする。

未分化型胃癌の発癌過程におけるエピゲノム異常を解明し研究基盤を確立する。臨床応用に向けて発癌リスク予測となる新規分子マーカーの同定、臨床病理学的特徴との関連を明らかとする。

3. 研究の方法

臨床検体の採取

- Methylated CpG Amplification microarray (MCAM)によるゲノム網羅的なメチル化解析
- 発癌リスク予測となる新規遺伝子の同定とパイロシーケンス法による検証
- 新規遺伝子の機能解析
- DNAメチル化が胃癌発症リスクの予測マーカーとして有用であるかを前向きに検証

4. 研究成果

未分化癌発生の分子機構の解明と発癌リスク予測の分子マーカーの同定を目的とし胃炎および胃癌背景粘膜におけるメチル化異常を網羅的に解析した。

その結果、分化型胃癌、未分化型胃癌の背景胃粘膜に共通して高いメチル化を示す遺伝子の一群を同定した。その一群より複数の遺伝子を選択し、パイロシーケンス法を用いてメチル化を定量的に解析した。RASGRF1は分化型胃癌、未分化型胃癌両方の背景粘膜において最も高頻度にメチル化されており、RASGRF1に注目し解析を進めた。

RASGRF1は胃癌細胞株および胃癌組織いずれにおいても高頻度にメチル化し、かつmRNAの発現とメチル化との間には逆相関を認めた。臨床検体153例を解析した結果、非胃癌症例の胃粘膜に比べ、胃癌症例の背景粘膜において有意に高いRASGRF1のメチル化を認めました。ROC曲線による検討でRASGRF1のメチル化レベルにより、両者を鑑別しうる可能性が示された。機能解析によりRASGRF1は胃癌細胞株の増殖と浸潤を抑制した。これらの結果からRASGRF1は胃がん抑制遺伝子として機能する可能性が示唆された。

本研究の結果、分化型胃癌と未分化型胃癌に共通するメチル化異常を示す遺伝子群が同定された。このことは、二つの異なる型の胃癌発生に共通するプロセスが存在する可能性を示唆していると考えられた。胃癌および背景胃粘膜において高頻度にメチル化する新規胃癌関連遺伝子としてRASGRF1を同定した。以上の結果から、RASGRF1のメチル化は分化型胃癌および未分化型胃癌いずれの背景粘膜においても高頻度にメチル化しており、RASGRF1のメチル化は胃癌リスク予測マーカーとして応用しうると考えられた。

DNAメチル化が胃癌発症リスクの予測マーカーとして有用であるかを前向きに検証した。早期胃癌の内視鏡治療を施行した129例を対象とし、プライマリーエンドポイントは異時性多発胃癌の発症とした。異時性多発胃癌の定義は「内視鏡的治療切除後の経過観察期間中に、新規に診断した胃癌病変」とした。内視鏡治療前に試験参加の同意を得て胃前庭部・胃体部大彎の非癌胃粘膜から生検組織を採取した。新シドニーシステムによる病理評価とメチル化解析を行った。メチル化はパイロシーケンス法を用いてmiR-34b/c、SFRP1、SFRP2、SFRP5、DKK2、DKK3遺伝子を定量的に解析した。

経過観察期間中に17例(13%)の異時性多発胃癌が発生した。胃体部粘膜のmiR-34b/cの高メチル化が、異時性胃癌発症と最も高い相関を示した。(ハザード比6.61, p=0.012)miR-34b/cのメチル化率が17.3%よりも高いHigh risk群では3年胃癌発症率は38.2%と高値を示し、17.3%以下のLow risk群では6.5%と低値であった。また胃体部miR-34b/cメチル化は単変量解析のみならず、年齢、性別、H. pylori感染を調整した多変量解析においても異時性胃癌発症リスクと有意に関連した。

これらの結果から胃体部非癌胃粘膜におけるmiR-34b/cのメチル化レベルは、内視鏡治療後の異時性多発胃癌を予測するマーカーとして有用であることを明らかにした。

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9件)

①Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T, Ashida M, Kai M, Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, Toyota M, Itoh F, Sugai T. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic

hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 52:140-149, 2013. (査読有り)

②Kimura T, Yamamoto E (co-first author), Yamano HO, Suzuki H, Kamimae S, Nojima M, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Takagi R, Kato R, Harada T, Suzuki R, Maruyama R, Kai M, Imai K, Shinomura Y, Sugai T, Toyota M. A novel pit pattern identifies the precursor of colorectal cancer derived from sessile serrated adenoma. *Am J Gastroenterol* 107:460-469, 2012. (査読有り)

③Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Noshio K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, Nishida T, Bamba T, Kanda T, Ajioka Y, Taguchi T, Okahara S, Takahashi H, Nishida Y, Hosokawa M, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 72:1126-1136, 2012. (査読有り)

④Takamaru H, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Suzuki R, Yamamoto H, Kai M, Tokino T, Sugai T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Aberrant methylation of RASGRF1 is associated with an epigenetic field defect and increased risk of gastric cancer. *Cancer Prev Res* 5: 1203-1212, 2012. (査読有り)

⑤ Yamamoto E, Suzuki H, Yamano HO, Maruyama R, Nojima M, Kamimae S, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada T, Suzuki R, Sato A, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Sugai T, Imai K, Shinomura Y, Toyota M. Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. *Am J Pathol* 181:1847-1861, 2012. (査読有り)

⑥Kamimae S, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Suzuki H, Ashida M, Hatahira T, Sato A, Kimura T, Yoshikawa K, Harada T, Hayashi S, Takamaru H, Maruyama R, Kai M, Nishiwaki M, Sugai T, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. Epigenetic alteration of DNA in mucosal wash fluid predicts invasiveness of colorectal tumors. *Cancer Prev Res* 4:674-683, 2011. (査読有り)

⑦ Suzuki H, Takatsuka S, Akashi H, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Kai M, Yamano HO, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of microRNA genes in colorectal cancer. *Cancer Res* 71:5646-5658, 2011. (査読有り)

⑧ Yamamoto E, Suzuki H, Takamaru H, Yamamoto H, Toyota M, Shinomura Y. Role of DNA methylation in the development of diffuse-type gastric cancer. *Digestion* 83: 241-249, 2011. (査読有り)

⑨Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Kudo T, Harada E, Sugai T, Takamaru H, Niinuma T, Maruyama R, Yamamoto H, Tokino T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. *Carcinogenesis* 31:2066-2073, 2010. (査読有り)

[学会発表] (計7件)

①Eiichiro Yamamoto Aberrant methylation of microRNA-34b/c as a biomarker for metachronous gastric cancer risk: a prospective study 20th United European Gastroenterology (UEG) Week 2012 アムステルダム

②山本英一郎 DNAメチル化を指標とした胃発癌リスク予測 日本適応学会 2012 東京

③山本英一郎 エピゲノム解析法の発展と臨床応用 臨床検査学会 2011 岡山

④山本英一郎 大腸腫瘍におけるジェネティック・エピジェネティックな異常と臨床応用 電気泳動学会 2011 横浜

⑤山本英一郎 DNAメチル化・エピゲノム 日本病理学会 2011 横浜

⑥山本英一郎 エピゲノムのアプローチからみた未分化型胃癌発生の分子機構 JDDW2010 横浜

⑦Eiichiro Yamamoto Epigenetic silencing of microRNAs in human gastric cancer 18th United European Gastroenterology Week 2010 Barcelona

[図書] (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：RASGRF1の定量的メチル化測定を用いた
発癌リスク予測

発明者：豊田実、山本英一郎、篠村恭久、山
野泰穂

権利者：札幌医科大学

種類：特許

番号：239932

出願年月日：2010年10月26日

国内外の別：国内

○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

山本 英一郎 (EIICHIRO YAMAMOTO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60567915

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：