

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590914

研究課題名(和文) 消化管(食道, 胃, 大腸) 癌の病態と治療に関わる遺伝子解析研究

研究課題名(英文) Gene analysis of gastrointestinal (esophagus, stomach and colorectum) cancer related with pathogenesis and treatment

研究代表者

前田 修 (MAEDA, Osamu)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：20378053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、消化管腫瘍について臨床診断や病理組織診断のみならず、腫瘍のDNAメチル化や遺伝子発現などの生物学的特性と治療経過との関連を検討することにより、最適な治療選択法の確立を目指すことである。

本研究では培養細胞を抗癌剤に暴露することにより薬剤耐性株を樹立するとともに、消化管悪性腫瘍の化学療法前後に内視鏡生検検体を採取し、マイクロアレイを用いたゲノムワイド解析を行った。

消化器癌薬剤耐性に関わる遺伝子のDNAメチル化および遺伝子発現プロファイルの特徴を解析した。また定量的測定を用いて、耐性機構に重要と考えられる遺伝子群を抽出した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish a method to optimal choice of treatment by analyzing correlation between biological features of tumor including DNA methylation and gene expression and clinical courses of gastrointestinal cancer. We established drug-resistant cancer cell line by exposure with anticancer drugs, and obtained endoscopic biopsy specimens before and after chemotherapy. We performed genome-wide analysis with microarray. We analyzed DNA methylation and gene expression profiles related with drug-resistant of gastrointestinal cancer. And we extracted genes that were considered to be important for drug-resistant mechanisms using quantitative methods.

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：消化器癌 薬剤耐性 遺伝子発現 DNAメチル化 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍患者の臨床経過および各種治療に対する反応性が腫瘍の生物学的特徴により差が見られること、あるいは薬剤の使用に伴う副作用が代謝酵素活性など個体の生物学的特性に影響を受けることなどが明らかにされつつある。

2. 研究の目的

従来の病理組織診断や画像診断のみでは、個々の患者の多彩な臨床経過を予測することは困難である。本研究の目的は従来の臨床診断、免疫染色をふくめた病理組織診断のほかに、腫瘍の遺伝子変異、DNAメチル化、遺伝子発現、さらに個体の遺伝子多型を包括的に解析し、治療経過との関連を検討する。その成果により、腫瘍の生物学的特徴と、個体の性質による最適な治療選択法の確立を目指す。

3. 研究の方法

培養細胞を抗癌剤(5-フルオロウラシル(5-FU)およびシスプラチン(CDDP))に暴露することにより薬剤耐性株を樹立し(図1,2)そのDNAおよびRNAを抽出した。

図1.

薬剤耐性細胞株の樹立

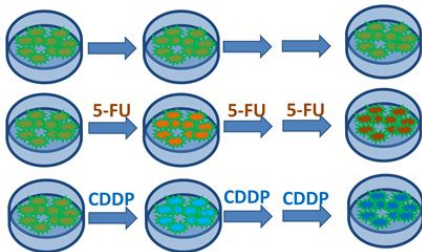
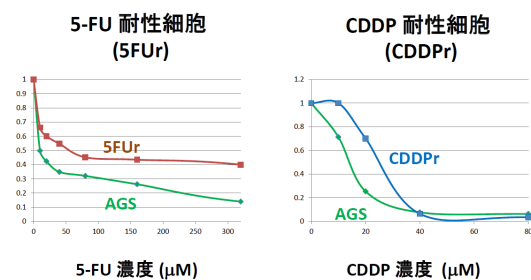


図2.

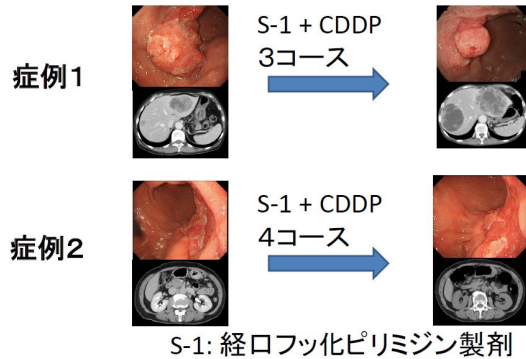
薬剤耐性細胞の細胞数



一方、消化管悪性腫瘍の患者の化学療法前後に内視鏡生検検体を採取して(図3) DNAおよびRNAを抽出した。

図3.

内視鏡生検検体



それらのDNAを用いてメチル化DNA解析をメチル化アレイによりゲノムワイドに行った。また遺伝子発現プロファイルについて発現アレイをもちいて解析した。またDNAメチル化はパイロシーケンス法により、遺伝子発現はRT-PCR法により定量的な測定を行った(図4,5)。

図4.

real-time PCRと発現アレイには強い相関がある

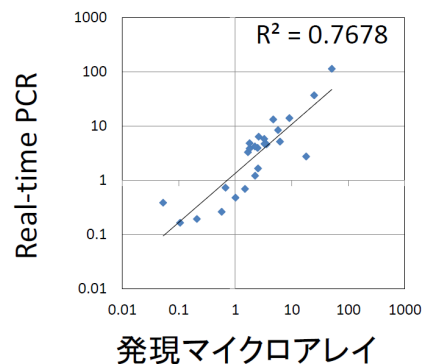
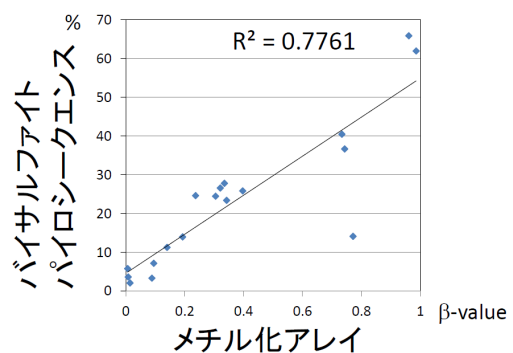


図5.

パイロシーケンスとメチル化アレイには強い相関がある



#### 4. 研究成果

消化器癌薬剤耐性に関わる遺伝子の DNA メチル化プロファイルおよび遺伝子発現プロファイルの特徴を解析した。

17,033 遺伝子のうち、5-FU 耐性株と CDDP 耐性株の双方で発現が増加していたのは 541 遺伝子、双方で発現が減少していたのは 569 遺伝子であった (図 6)。

図 6 .

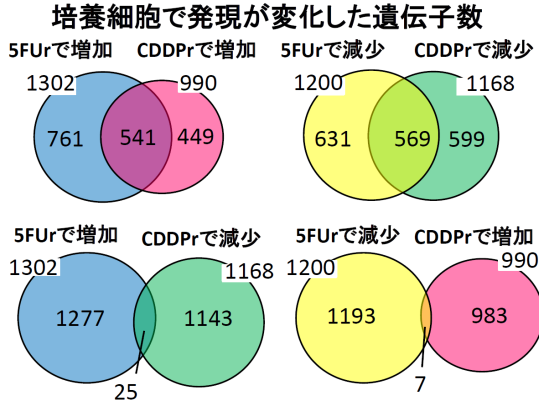


表 1 . 薬剤耐性細胞株で変化がみられた遺伝子群の Gene Ontology および Pathway 解析

A. GO Terms (biological processes).			
GO Terms (biological processes)	P-Value	遺伝子数	
<b>5FUで増加</b>			
(No enrichment)			
<b>CDDPrで増加</b>			
Response to other organism	[GO:0051707]	0.00078	45
Cell surface receptor signaling pathway	[GO:0007166]	0.00125	163
Response to virus	[GO:0009615]	0.0018	31
Response to biotic stimulus	[GO:0009607]	0.00288	45
Signal transduction	[GO:0007165]	0.00382	247
Regulation of signal transduction	[GO:0009966]	0.00511	125
Positive regulation of cell communication	[GO:0010647]	0.00708	69
Positive regulation of signaling	[GO:0023056]	0.00708	69
Immune system process	[GO:0002376]	0.00867	130
Regulation of cell motility	[GO:2000145]	0.0105	41
Positive regulation of signal transduction	[GO:0009967]	0.0123	67
Regulation of cell migration	[GO:0030334]	0.0146	39
Single-organism process	[GO:0044699]	0.0151	516
Regulation of signaling	[GO:0023051]	0.0159	132
Regulation of cell communication	[GO:0010646]	0.0182	132
Response to stimulus	[GO:0050896]	0.0206	341
Regulation of response to stimulus	[GO:0048583]	0.0212	157
Positive regulation of cell migration	[GO:0030335]	0.0224	27
Regulation of cellular component	[GO:0051270]	0.0244	43
Positive regulation of cell motility	[GO:2000147]	0.0308	27
Regulation of localization	[GO:0032879]	0.0324	92
Regulation of locomotion	[GO:0040012]	0.0496	41

#### 5FUで減少

Defense response	[GO:0006952]	2.86E-05	110
Immune system process	[GO:0002376]	0.000327	148
Innate immune response	[GO:0045087]	0.000364	80
Single-multicellular organism process	[GO:0044707]	0.000918	290
Immune response	[GO:0006955]	0.0131	100
Multicellular organismal process	[GO:0032501]	0.0161	295

#### CDDPrで減少

Single-multicellular organism process	[GO:0044707]	0.0343	279
Xenobiotic catabolic process	[GO:0042178]	0.0478	5

#### B. GO Terms (cellular components).

GO Terms (cellular components)	P-Value	遺伝子数	
<b>5FUで増加</b>			
Extracellular region	[GO:0005576]	4.64E-07	130
Cell periphery	[GO:0071944]	0.000754	280
Plasma membrane	[GO:0005886]	0.000907	277
Extracellular region part	[GO:0044421]	0.00647	70
Plasma membrane part	[GO:0044459]	0.0134	136
Extracellular space	[GO:0005615]	0.0271	56

#### CDDPrで増加

Extracellular region	[GO:0005576]	0.0374	92
----------------------	--------------	--------	----

#### 5FUで減少

Extracellular region	[GO:0005576]	3.24E-05	116
----------------------	--------------	----------	-----

#### CDDPrで減少

Extracellular region	[GO:0005576]	7.37E-08	121
Cornified envelope	[GO:0001533]	0.0124	8
Intrinsic to membrane	[GO:0031224]	0.0175	142
Integral to membrane	[GO:0016021]	0.0195	138
Cell periphery	[GO:0071944]	0.0202	243
Plasma membrane	[GO:0005886]	0.0268	240

#### C. GO Terms (molecular functions).

GO Terms (molecular functions)	P-Value	遺伝子数	
<b>5FUで増加</b>			
Serine-type peptidase activity	[GO:0008236]	3.29E-05	24
Serine hydrolase activity	[GO:0017171]	5.16E-05	24
Serine-type endopeptidase activity	[GO:0004252]	0.00325	17
<b>CDDPrで増加</b>			
(No enrichment)			
<b>5FUで減少</b>			
(No enrichment)			
<b>CDDPrで減少</b>			
Receptor binding	[GO:0005102]	5.08E-04	83
Cytokine activity	[GO:0005125]	0.0383	15

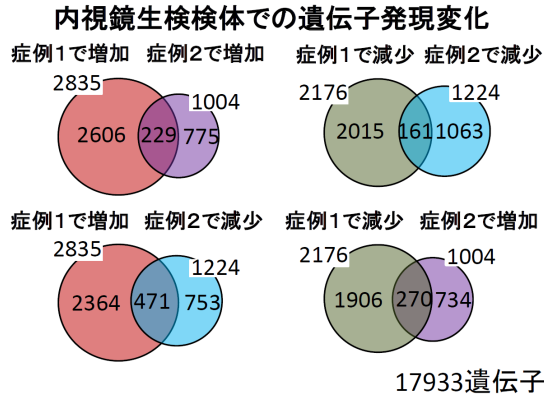
#### D. Pathway

Pathway	P-Value	遺伝子数
<b>5FUで増加</b>		
p53 signaling pathway	0.0222	14
<b>CDDPrで増加</b>		
p53 signaling pathway	8.56E-07	18
<b>5FUで減少</b>		
(No enrichment)		
<b>CDDPrで減少</b>		
Cytokine-cytokine recep	0.00618	37

Gene ontology 解析を行うと、5-FU 耐性株および CDDP 耐性株いずれにおいても”extra cellular region”が関連のある GO term であり、pathway 解析では”p53 pathway”が関連のある pathway であった (表 1)。

内視鏡生検検体を用いて化学療法施行前後の遺伝子発現変化を解析した。症例ごとに発現変化は大きく異なっており、一部の遺伝子が共通の変化を示した (図 7)。

図 7 .



薬剤耐性細胞株と内視鏡生検検体で増加あるいは減少を示した遺伝子を抽出した (図 8、表 2)。薬剤耐性細胞株と内視鏡生検検体において、KLK13 を含む 15 遺伝子が増加し、ETV7 を含む 12 遺伝子が減少した (表 2)。また定量的測定を用いて評価した (図 9)。

発現が増加しメチル化が減少、または発現が減少しメチル化が増加した遺伝子を抽出した (表 3)。発現アレイとメチル化アレイの双方で解析可能であった 10,365 遺伝子のうち、74 遺伝子が高メチル化かつ発現低下、または低メチル化かつ発現増加を示した。

それらの遺伝子のうち脱メチル化処理によって遺伝子発現が増加した 21 遺伝子を抽出した。FSCN1、CPT1C、NOTCH3 について定量的測定を行った (図 10)。これらの遺伝子は耐性株において発現が増加し、一部でメチル化レベルの低下を認めた。

図 8 .

培養細胞および生検検体双方での発現変化

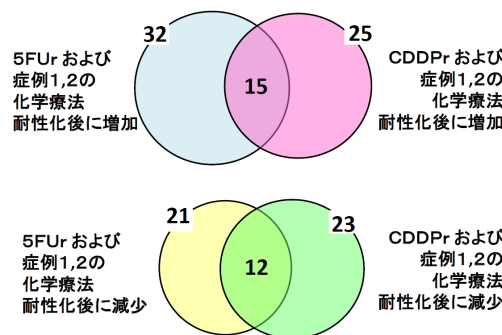


表 2 . 遺伝子発現の変化が薬剤耐性細胞株と培養細胞の双方に共通してみられた遺伝子

5FUと化学療法後の生検2検体で増加	5FUと化学療法後の生検2検体で減少	CDDPrと化学療法後の生検2検体で増加	CDDPrと化学療法後の生検2検体で減少
APOC1	ALPK1	ACTG2	ACOXL
BAIAP3	C17orf110	ANPEP	ALPK1
C4BPA	C4orf47	APOC1	BATF
C6orf154	CCL21	C9orf123	BEST4
CAPS2	CYP2E1	CELA3B	CCL21
CFTR	ETV7	CRYM	CYP2E1
CRYM	FBXO15	CTSG	ETV7
DNAJC28	GPR110	DNAJC28	FBXO15
FRZB	HEPACAM2	HOBX3	GPR110
HSD17B6	IFI44L	HSD17B6	INSC
IGF1	KRT6C	IQCD	KRT31
IPK3	LAMC2	KLK13	MUC1
IQCD	NLRC5	KREMEN2	NCKAP5
KCTD7	OR52K2	NLRP2	NLRC5
KLK13	PLIN4	NRG1	PCSK9
KREMEN2	SLC22A20	OLFML3	PLIN4
LAMA1	SLC26A9	OTUD7A	RAB27B
LRRC6	SLC28A3	PHACTR3	SLC22A20
MSLN	SNORA22	PLAT	SLC26A9
NR2F1	SPRR3	RARRES2	SLC28A3
OLFML3	ZNF750	RASL10A	SLFNL1
OEEP		SRI	SNORA22
OTUD7A		TAC3	SYT13
PHACTR3		TNFSF9	
PLAT		TNNI3	
PRODH			
RARRES2			
SCN2A			
SEPP1			
SRI			
TAC3			
TNNI3			

図 9 .

培養細胞と生検検体での発現変化

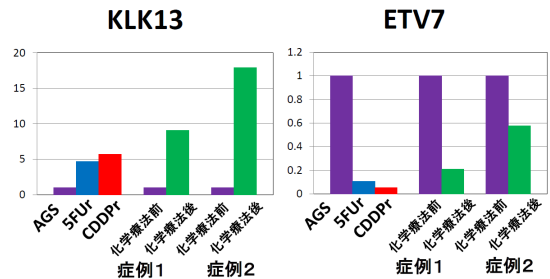
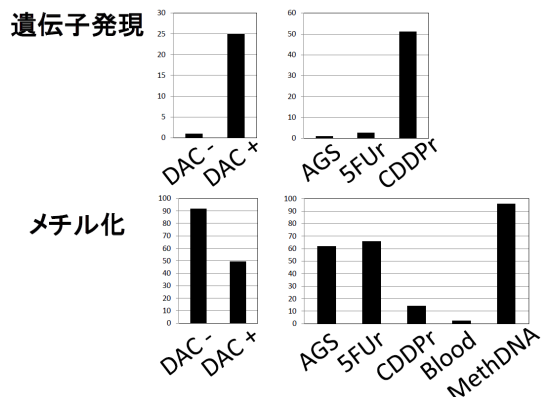


表 3 . 発現が増加しメチル化が減少、または発現が減少しメチル化が増加した遺伝子

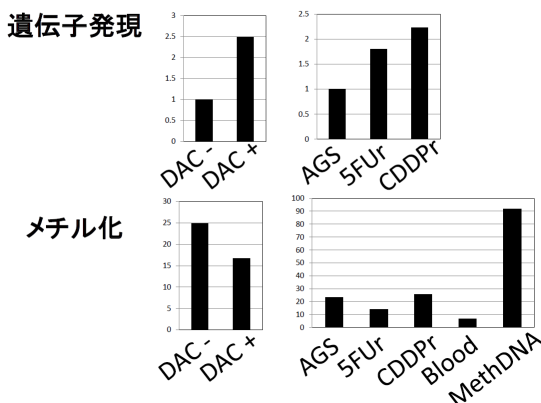
5FUで高発現、低メチル化	5FUで低発現、高メチル化	CDDPrで高発現、低メチル化	CDDPrで低発現、高メチル化
ARC	ATP2C2	ABCG4	ATP2C2
C12orf34	C15orf60	C12orf34	C15orf60
CPT1C	PRAME	CARD9	FRMD6
CST6	ZNF773	CST6	SECTM1
CYB5R2		FES	TNFSF12
KCNH8		FSCN1	ZNF773
MESP1		KCNH8	
NOTCH3		MESP1	
RASGRP2		VGf	
TNFSF12			

図10.

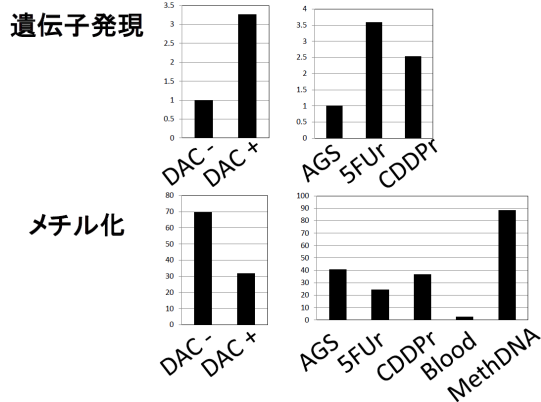
FSCN1の発現とメチル化



CPT1Cの発現とメチル化



NOTCH3の発現とメチル化



本研究で発現およびメチル化変化が認められた遺伝子は、5-FU および CDDP 耐性機構に関連がある可能性があり、エピジェネティックな機構がその機序に関与していると考えられた。このような遺伝子変化は、薬剤感受性を予測するバイオマーカーとしても有用である可能性が考えられる。

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 1 件)

Alteration of gene expression and DNA methylation in drug-resistant gastric cancer, Osamu Maeda, Takafumi Ando, Naoki Ohmiya, Kazuhiro Ishiguro, Osamu Watanabe, Ryoji Miyahara, Yoko Hibi, Taku Nagai, Kiyofumi Yamada, Hidemi Goto *Oncology Reports* 31:1883-1890, 2014 (査読有り)

〔学会発表〕(計 1 件)

シスプラチンおよびフッ化ピリミジンへの耐性胃癌のマイクロアレイを用いた遺伝子発現およびDNAメチル化解析  
前田修、安藤貴文、石黒和博、渡辺修、宮原良二、中村正直、舩坂好平、後藤秀実  
第72回日本癌学会学術集会  
一般演題口演  
2013年10月5日 横浜(パシフィコ横浜)

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 修 (MAEDA, Osamu)  
名古屋大学・医学系研究科・特任助教  
研究者番号: 20378053

(2)研究分担者

安藤 貴文 (ANDO, Takafumi)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号: 80378041

石黒 和博 (ISHIGURO, Kazuhiro)  
名古屋大学・医学系研究科・特任准教授  
研究者番号: 60432275

渡辺 修 (WATANABE, Osamu)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号: 80378059

大宮 直木 (OHMIYA, Naoki)  
藤田保健衛生大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00335035

宮原 良二 (MIYAHARA, Ryoji)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 50378056

後藤 秀実 (GOTO, Hidemi)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 10215501