

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590924

研究課題名(和文)消化管間質腫瘍のエピジェネティクス異常と予後予測マーカーの同定

研究課題名(英文)Epigenetics abnormality of gastrointestinal stromal tumor

## 研究代表者

岡本 泰幸(okamoto, yasuyuki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：60444973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本試験で使用される予後予測マーカーであるPAX3、REC8、P16のDNAメチル化はSDH欠損GISTに関して全例でマーカー陽性となることが明らかとなった。したがって、KITもしくはPDGFRの変異を認めるGISTに対して有効なマーカーと考えられる。SDH欠損GISTでKITの下流であるPI3K / Akt シグナル伝達系がDNAメチル化の標的になっていることよりSDH欠損により隆起されるDNAメチル化の蓄積がGISTの発生に関与することを裏付ける結果と考えられる。トランスクリプトーム解析とDNAメチル化解析の両方でGタンパク質共役受容体の関与が示唆され今後の研究課題と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Regarding SDH deficient GIST, the promoter of the markers (PAX3, REC8 and P16) are markedly methylated. So these markers should be used for either KIT mutated GIST or PDGFR mutated GIST. From pathway analysis using illumina 450K array data, we found abnormally methylated genes among SDH deficient GIST were enriched in PI3K/Akt signaling pathway, which are downstream of the KIT receptor. It suggests that abnormal DNA methylations induced by SDH deficient cause development of GIST with neither KIT mutations nor PDGFR mutations. Gene set analysis based on genome wide DNA methylation and transcriptome profiling revealed the relationship between G protein-coupled receptors (GPCRs) and malignant GIST.

研究分野：消化器内科

キーワード：GIST

### 1. 研究開始当初の背景

GISTは消化管に発生する粘膜下腫瘍でKITやPDGF-R $\alpha$ の変異を認めることが知られている。日本における再発あるいは切除不能のGIST症例は1,000~1,500人/年と推計されている。しかし、多くのGISTが、消化管の粘膜下腫瘍として切除された後の組織検査によって診断されており、術後に再発を起さないGIST症例の数はかなり多いことが知られている。また、病理解剖症例の胃を詳細に検討した結果、中高年において数mmのGISTを高頻度に認めるという報告がある。したがって、GISTにはKITやPDGF-R $\alpha$ の変異を認めるが、転移・浸潤をしない低悪性度GISTと転移・浸潤をする高悪性度GISTが存在すると考えられている。低悪性度GISTが、転移浸潤能をもつ高悪性度GISTになる機序の1つとしてLOHの報告があるが十分ではない。さらに発生臓器によっても悪性度の違いをみとめるが、その機序に関しての報告はなかった。近年エピジェネティクス研究の発展により、DNA異常メチル化が、がんの発生・進展に深く関与していることが明らかとなった。また、DNAメチル化は非常に安定した化学修飾であり、バイオマーカーとしても注目されている。申請者は、GISTの臨床検体を対象に、マイクロアレイを用いて網羅的なDNAメチル化解析を施行した。その結果、以下のことを明らかにした。(1)高悪性度GISTでは低悪性度GISTに比較して多くの遺伝子のDNAメチル化をみとめ、悪性化にはDNAメチル化が関与している。(2)胃由来のGISTと小腸由来のGISTではDNAメチル化のプロファイルが異なる。(3)予後予測マーカーとなるメチル化ターゲット遺伝子(PAX3, REC8, P16)の同定。

### 2. 研究の目的

GISTは内視鏡にて粘膜下腫瘍として認識され、その大きさのみで治療方針を決定することが多い。また、超音波内視鏡下穿刺生検(EUS-FNAB)による組織診断でGISTと診断された症例は手術適応と考えられている。一方で、以前は経過観察とされていた小さい粘膜下腫瘍の多くはGISTであり、それらは転移浸潤の可能性が極めて低いことも知られている。術前にEUS-FNABにて採取した組織を用いてGISTの診断をすることは可能であるが、核分裂像の評価やMib1 indexを用いたリスク評価を正確にすることは困難である。しかし、DNAメチル化マーカーは安定しており、EUS-FNABで得られる微量な検体でも正確な評価が可能である。したがって、DNAメチル化マーカーを確立することで術前に正確な悪性度を知ることができ、手術の適応や時期の決定に大きく寄与することができる。正確で客観性のあるリスク分類が必要であることを示している。本研究では、DNAメチル化マーカーの確立をすることでGISTの臨床を進展させることを目的とする。

### 3. 研究の方法

申請者は、メチル化ターゲット遺伝子(PAX3, REC8, P16)のうち1遺伝子でもメチル化陽性となる症例は、多変量解析で腫瘍径や核分裂像よりも有意に高いハザード比を示すことを証明した。これらの遺伝子のDNAメチル化が予後予測に有効であるか前向きコホートにて検討する。また、得られた検体や既存の検体を用いてDNAメチル化によるGISTの悪性化に関する検討する。

### 4. 研究成果

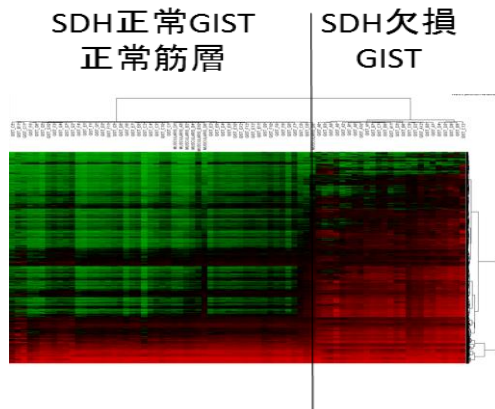
前向きコホート研究は、3年無再発生存率(メチル化群62%、非メチル化群96%)、両側 $\alpha=0.05$ 、検出力80%、追跡期間3年として必要症例数を各群32例と考え、合計80症例を予定症例数として設定した。同条件で名古屋市立大学病院臨床試験倫理委員会の承認を得て開始された。

解析法に関しては、パイロシーケンス法に比較して多くの研究室で解析可能なReal time MSP法を用いた解析を確立した。方法は、PAX3とREC8に関してメチル化DNAに特異的なプライマーを作成、リピート配列(LINE1)を使用し標準化した。胃と小腸の筋層、高悪性GIST、低悪性GISTの検体を用いて解析、パイロシーケンス法との相関はPAX3で $R^2=0.698$ 、REC8で $R^2=0.647$ であった。既存の検体を用いた検討では、消化管筋層を用いて $\text{Mean} \pm 2\text{SD}$ をカットオフ値として診断すると、パイロシーケンスでの結果と同様にメチル化群と非メチル化群を分けることが可能であった。

最近本研究課題に関連する重要な報告があった。KITやPDGF-R $\alpha$ の変異を認めないGISTの大部分でmitochondrial succinate dehydrogenase(SDH)の変異による機能欠損を認めるといった報告である。SDHの先天的変異はパラガングリオーマなどでも報告がありSDH自体の腫瘍抑制遺伝子も知られているか、特記すべきことはsuccinate/ $\alpha$ -ketoglutarateの比率がTETの活性に深く関与し、SDHの機能欠損によりDNAのメチル化が強く誘導されるとの報告である。この報告は、本研究にきわめて密接に関与するものと考え、慎重に検討する必要があると判断した。

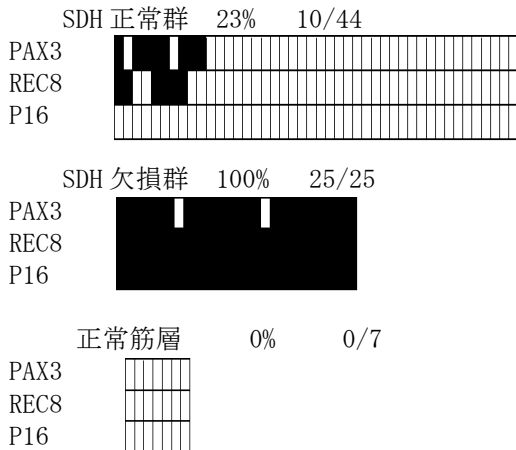
SDH機能欠損GISTのDNAメチル化のターゲットを検討するため、GEOのイルミナ450Kアレイのデータを使用した(GSE34387)。最初に遺伝子のプロモーター領域(TSSから $\pm 1\text{kb}$ 以内)でCpGアイランド内に存在するプロモーターを選択、選択されたプローブで全症例間で比較し変化の大きいプローブ( $\beta$ 値の標準偏差が0.05以上)のプローブを選択し、クラスター解析を施行した(図1)。クラスター解析では、正常筋層とSDH正常GISTからなる群とSDH欠損GISTからなる群の2群に明確に分類された。

(図1:全症例を用いたクラスター解析)



SDH 欠損 GIST の群では DNA のメチル化が顕著に確認されるため、SDH 欠損群での DNA メチル化ターゲット遺伝子を検討した。まず、本研究のターゲット遺伝子である PAX3、REC8、P16 のプロモーター領域のメチル化を比較した。このときのカットオフとして正常筋層の平均+3SD を用いると  $\beta$  値はそれぞれ PAX3 では 0.278、REC8 では 0.447、P16 では 0.498 となった。このカットオフを用いると、SDH 正常群では 23%で陽性。SDH 欠損群では 100%で陽性。正常筋層では 0%が陽性であった(図2)。この結果より、SDH 正常 GIST では予測された頻度の陽性率であったが、SDH 欠損 GIST ではすべての症例で陽性となり、SDH 正常 GIST のみで予後予測のマーカーとして使用可能であることが示唆された。

(図2 PAX3, REC8 P16 のメチル化)



また、SDH 欠損 GIST でメチルを認める遺伝子群を gene set analysis を施行し特徴を検討した。このとき正常筋層で既知の腫瘍抑制遺伝子の  $\beta$  値を参考にして、 $\beta$  値が 0.2 以下をメチル化なしと定義した。したがって SDH 正常 GIST と正常筋層で  $\beta$  値が 0.2 以下かつ SDH 欠損 GIST で有意 ( $p$ -value<0.01) に  $\beta$  値が増加しているものを対象遺伝子群とした。パスウェイ解析では G タンパク質共役受容体 ( $q$ -value=1.74e-06) と PI3K / Akt シグナル伝達系 ( $q$ -value=8.85e-06) が有意で上位にあげられた。共に発癌との関連が深い系であ

るが、PI3K / Akt シグナル伝達系は KIT の下流であり、KIT 変異を認めない GIST の悪性化の機構として考えられる。

オントロジー解析では、developmental process ( $q$ -value=4.13e-19)、cell adhesion ( $q$ -value=1.08e-12)、cell motility ( $q$ -value=2.15e-10)、cell proliferation ( $q$ -value=1.52e-08) が上位にみられいずれも悪性化に関連深いものであり、これら遺伝子のメチル化が悪性化に関与していることが示唆された。

次に PAX3、REC8、P16 で悪性度が高いと診断される GIST での悪性化の機所を検討するため expression array (GSE47911) のデータを使用して、トランスクリプトーム解析を施行した。マーカー陰性 GIST で  $\beta$  値 0.2 以下、マーカー陽性 GIST で有意 ( $p$ -value<0.01) にメチル化が  $\beta$  値 0.1 以上増加している遺伝子群の発現に注目し、これらの遺伝子の発現が総じて高いものを予後良好 GIST、発現低下が確認されるものを予後不良 GIST と分類した。2 群間で有意 ( $p$ -value<0.05) に mRNA の発現に違いのある遺伝子群を選択し、gene set analysis を施行した。パスウェイ解析では G タンパク質共役受容体関連が複数 ( $p$ -value: 8.15e-05 ~ 3.26e-03)、そして WNT、MAP キナーゼなどが有意差をもって同定された。オントロジー解析では cell adhesion ( $p$ -value=3.06e-05) がもっとも有意であった。

前向き試験に関しては、batch effect を最小化するため、検体の解析は同時に施行するのが望ましいため、指定の研究期間内で報告することができなかった。しかし、研究開始時に考慮していなかった、SDH 欠損 GIST が全例でマーカー陽性となることはきわめて重要である。サブ解析として、KIT 陰性、PDGFR 陰性の GIST を除外した検討を行う必要がある。また、DNA メチル化と GIST に関しては、SDH 欠損 GIST で KIT の下流である PI3K / Akt シグナル伝達系が DNA メチル化の標的になっていることは SDH 欠損により隆起される DNA メチル化の蓄積が GIST の発生に関与することを裏付ける結果と考えられる。トランスクリプトーム解析では本研究で予後不良 GIST と予測される群で G タンパク質共役受容体の発現が、SDH 欠損 GIST のメチル化ターゲット解析と同様に同定されたことは、きわめて興味深い結果と思われる。G タンパク質共役受容体と GIST の関連に関しては今後の研究課題として深く検討する予定である。

本基盤研究で、前向き試験は完了することはできなかったが、今後も症例を蓄積する。副次的な課題としていた、DNA のメチル化と悪性度に関する研究では新たな機構が同定された。

<引用文献>

- ① Oncogenic SDH mutation underlies global epigenomic instability in

gastrointestinal stromal tumor  
Killian JK et.al, Cancer Discov 2013  
Jun;3(6):648-57.

- ② Gene expression signatures in gastric  
gastrointestinal stromal tumors  
(GISTs) Lee EJ et al. PLoS One  
2013;8(10):e77219

#### 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 12 件)

- ① Hori Y, Hayashi K, Yoshida M, Naitoh I,  
Nakazawa T, Miyabe K, Shimizu S, Kondo  
H, Nishi Y, Umemura S, Kato A, Ohara H,  
Joh T.  
New concept of traction force applied  
to biliary self-expandable metallic  
stents. Endoscopy. 2016 May;48(5):472-6  
doi:10.1055/s-0041-111566 査読有り
- ② Kondo H, Naitoh I, Okumura F, Nakazawa  
T, Hayashi K, Miyabe K, Shimizu S,  
Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y,  
Kato A, Ohara H, Joh T. Clinical  
features of acute obstructive  
suppurative pancreatic ductitis: a  
retrospective review of 20 cases. J  
Gastroenterol Hepatol. 2016 Feb 3 Epub  
doi: 10.1111/jgh.13304 査読有り
- ③ Naitoh I, Nakazawa T, Kato A, Hayashi  
K, Miyabe K, Shimizu S, Kondo H, Nishi  
Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Kuno  
T, Takahashi S, Ohara H, Joh T.  
Predictive factors for positive  
diagnosis of malignant biliary  
strictures by transpapillary brush  
cytology and forceps biopsy.  
J Dig Dis. 2016 Jan;17(1):44-51  
doi:10.1111/1751-2980. 査読有り
- ④ Naitoh I, Nakazawa T, Okumura F, Takada  
H, Hirano A, Hayashi K, Miyabe K,  
Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M,  
Umemura S, Hori Y, Kato A, Yamashita H,

Sano H, Ohara H, Joh T. Endoscopic  
retrograde cholangiopancreatography  
related adverse events in patients  
with type 1 autoimmune pancreatitis.  
Pancreatol. 2016 Feb;16(1):78-82  
doi: 10.1016/j.pan.2015.10.011. 査読  
有り

- ⑤ Kato A, Naiki-Ito A, Nakazawa T,  
Hayashi K, Naitoh I, Miyabe K, Shimizu  
S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura  
S, Hori Y, Mori T, Tsutsumi M, Kuno T,  
Suzuki S, Kato H, Ohara H, Joh T,  
Takahashi S Chemopreventive effect  
of resveratrol and apocynin on  
pancreatic carcinogenesis via  
modulation of nuclear phosphorylated  
GSK3 $\beta$  and ERK1/2. Oncotarget. 2015  
Dec 15;6(40): 42963-75.  
doi: 10.18632/oncotarget.5981. 査読  
有り
- ⑥ Hori Y, Miyabe K, Yoshida M, Nakazawa  
T, Hayashi K, Naitoh I, Shimizu S,  
Kondo H, Nishi Y, Umemura S, Kato A,  
Ohara H, Inagaki H, Joh T Impact of  
TP53 codon 72 and MDM2 SNP 309  
polymorphisms in pancreatic ductal  
adenocarcinoma.  
PLoS One. 2015;10(4):e0126295.  
doi:10.1371/journal.pone.0118829. 査  
読有り
- ⑦ Hori Y, Naitoh I, Ban T, Narita K,  
Nakazawa T, Hayashi K, Miyabe K,  
Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M,  
Umemura S, Kato A, Yamada T, Ando T, Joh  
T. Stent under-expansion on the  
procedure day, a predictive factor for  
poor oral intake after metallic  
stenting for gastric outlet  
obstruction. J Gastroenterol  
Hepatol. 2015 Aug;30(8):1246-51

- doi: 10.1111/jgh.12933 査読有り
- ⑧ Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y :  
Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. *Gastroenterology*. 146: 562-572, 2014  
doi:10.1053/j.gastro.2013.10.056  
査読有り
- ⑨ Kishida Y, Natsume A, Kondo Y, Takeuchi I, An B, Okamoto Y, Shinjo K, Saito K, Ando H, Ohka F, Sekido Y, Wakabayashi T : Epigenetic subclassification of meningiomas based on genome-wide DNA methylation analyses.  
*Carcinogenesis*. 33:1277-85. 2012  
doi: 10.1093/carcin/bgr260 査読有り
- ⑩ Shinjo K, Okamoto Y, An B, Yokoyama T, Takeuchi I, Fujii M, Osada H, Usami N, Hasegawa Y, Ito H, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Sekido Y, Kondo Y :  
Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma.  
*Carcinogenesis*. 33:1277-85. 2012  
doi: 10.1093/carcin/bgs154 査読有り
- ⑪ Okamoto Y, Sawaki A, Ito S, Nishida T, Takahashi T, Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Takeuchi I, Shinjo K, An B, Ito H, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Kataoka H, Joh T, Sekido Y, Kondo Y : Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumor. *Gut*. 61: 392-401. 2012

- doi:10.1136/gut.2011.241034 査読有り
- ⑫ 岡本泰幸、安柄九、近藤豊：遺伝子背景からみた大腸癌の左右差  
*胃と腸* 47:1983-88, 2012  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11477/mf.1403113679> 査読なし

[学会発表] (計 2件)

- ① An siRNA screen identifies CHD4 as a target for epigenetic therapy  
Yasuyuki Okamoto, Jumpei Yamazaki, Takahiro Sato, Matteo Cesaroni, Woonbok Chung, Judith Garriga, Jaroslav Jelinek, Richard A. Katz, Jean-Pierre J. Issa, AACR2014
- ② Discovering therapeutic epigenetic targets using whole genome siRNA screening  
Yasuyuki Okamoto, Woonbok Chung, Judith Garriga, Jaroslav Jelinek and Jean-Pierre J. Issa AACR2015

[図書] (計 1件)

- ① Yasuyuki Okamoto, Yutaka kondo  
*Genetic and Epigenetic Alterations in Inflammation-Related Cancers - General Mechanisms of Cancers From Inflammation to Cancer*: pp. 29-48  
DOI: 10.1142/9789814343602\_0003

[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 なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 泰幸 (okamoto yasuyuki)  
名古屋市立大学 医学研究科 病院助教  
研究者番号 : 60444973

(2) 研究分担者

林 香月 (hayashi katsuki)  
名古屋市立大学 医学研究科 助教

研究者番号： 00405200

(3)連携研究者

澤田 武 (sawada takeshi )

金沢大学 医薬保健学総合研究科 准教授

研究者番号： 60345626