

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：85402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462143

研究課題名(和文) 口腔粘膜遺伝子異常解析による肺がん発生高リスク群検出システムの構築

研究課題名(英文) Novel strategy for lung cancer risk stratification through the assessment of epigenetic alteration in oral epithelium

研究代表者

原田 洋明 (Harada, Hiroaki)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他(移行)

研究者番号：90573816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：早期肺がんにおける特徴的なエピジェネティクス異常検出をめざした肺がん組織を用いた検討で、DLX4, PCDH10, MDF1のメチル化異常が、完全切除されたリンパ節転移陰性肺がんにおける予後関連因子である事を発見した。

喫煙など有害環境因子の暴露は肺組織のみならず気道全域に及ぶと考え、口腔粘膜のエピジェネティクス異常解析を行い、肺がん発生高リスク群同定に繋がるマーカーの検出を試みた。早期肺がん患者で高頻度にエピジェネティクス異常を呈した遺伝子群の口腔粘膜プロファイルを作成したところ、肺がん患者でGDNF, RARB, HS3ST2, HOXD11が有意に高頻度のメチル化異常を呈していた。

研究成果の概要(英文)：In the assessment of the role of epigenetic alteration as a prognostic biomarker for lung cancer, using resected lung tumor tissues, we demonstrated that methylated DLX4, PCDH10, and MDF1 can be potential biomarkers that predict prognosis after curative resection of pathologically node-negative non-small cell lung cancer.

In the assessment of the role of epigenetic alteration as a biomarker for early detection of lung cancer, we found a significant difference in the methylation profiles of oral epithelium between lung cancer patients and controls. When the methylation profiles of GDNF, RARB, HS3ST2 and HOXD11 were combined, high specificity and a positive predictive value for the risk assessment of lung cancer were demonstrated. These results indicated that the assessment of epigenetic alterations using oral epithelium may help to identify a high risk of lung cancer in individuals.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 手術 分子生物学的マーカー エピジェネティクス メチル化 早期発見 予後因子

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺がんは早期発見が困難であり、発見時多くの患者が既に有効な治療法の少ない状況にある。肺がんCT検診が死亡率の低下に寄与すると報告されたが、重度喫煙者に限った検討にもかかわらず、コホート内での肺がん発生確率は決して高くなかった。一方肺がんCT検診はコストや被ばく量の問題もあり、その有用性やプロトコル確立には議論の余地を残す。もし効率的に肺がん発生の高リスク群を選定しうる分子生物学的マーカーを同定することができれば、CTやPET検診などと連動し、高リスク群に対する密な検診プログラムの確立に繋がり、社会全体として低コストでの早期肺がん患者発見に大きく寄与すると期待される。

(2) DNAメチル化で代表されるエピジェネティクス異常は、ジェネティックな異常である突然変異、染色体欠失とあわせて発がんの主たるメカニズムとして知られている。microRNAは、標的とするmRNAに結合しその分解やペプチド鎖伸長抑制などによりmRNAからタンパクへの翻訳を阻害することで生物学的機能を制御しており、その発現異常が、がんの発生や進展に深く関与している。これらの遺伝子異常は環境要因による影響を強く受けることから、肺がん発生の最大原因である喫煙をはじめとする環境要因が、気道(肺組織および口腔粘膜)上皮に与える遺伝子異常について解析することは、肺がん発生高リスク群や生物学的悪性度の指標となりうる分子生物学的マーカーの同定に繋がると考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) 肺がん発生の主因である喫煙・大気汚染などの環境要因は、肺組織のみならず口腔内も含めた気道全域に直接影響を及ぼすと考え、未だ十分に解明されていない肺がん組織以外の気道上皮における遺伝子異常に注目し、容易に採取可能な口腔粘膜を用いて、がん発生の主たるメカニズムであるエピジェネティクス異常やmicroRNA発現異常の解析を行い、肺がん発生高リスク群を効率的に選定しうる分子生物学的マーカーの確立を目指す。将来的には社会全体として低リスク低コストで肺がんの治療成績向上に寄与する効率的かつ先進的な検診システムの構築に繋げる。

(2) メチル化を代表するEpigenetics異常が、肺がん組織、口腔粘膜、血液サンプルにおける発現異常を詳細に解析することで、遺伝子異常があたえる影響についてその表現型(病理組織型や標的蛋白質の発現、生物学的特徴、悪性度)さらには治療効果などについても評価し、個別化治療への展開を目指す。

(3) 肺がんのみならず、COPDや間質性肺

炎などの慢性炎症性肺疾患についても口腔粘膜などの遺伝子異常発現プロファイルを統合的に解析し、病態形成や病勢進行に関連するバイオマーカーの同定も目的とする。

### 3. 研究の方法

肺がん摘出標本に加え、口腔粘膜や血液サンプルを用い、メチル化特異的PCR法を用いた新規DNAメチル化異常を多数検討した。それら遺伝子異常と臨床的パラメーター(喫煙歴・進行度・予後など)さらには、環境要因を総合的に表す指標ともいえる生体内酸化ストレス度との関連を詳細に評価した。

### 4. 研究成果

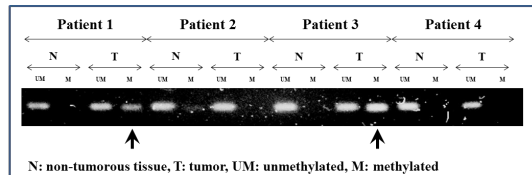
(1) 手術摘出標本を用いた解析

早期肺癌(病理学的にリンパ節転移が認められなかった肺癌症例)切除症例において、遺伝子メチル化異常が術後の予後予測因子になる可能性について検討した。

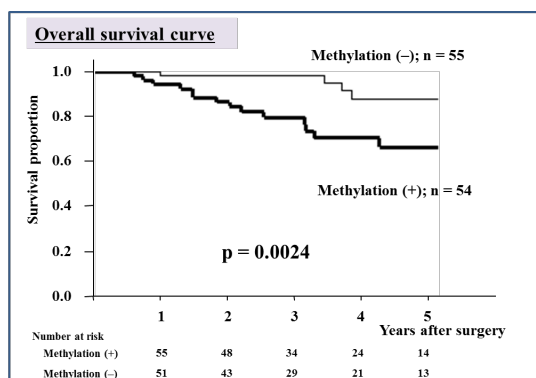
DLX4 (Distal-less homeobox 4)

乳癌や子宮ガンにおいて転移促進との関連について研究がなされているDLX4は、一方で肺癌においては転移を抑制するとの報告があり、そのメチル化異常がリンパ節転移を認めなかった肺癌完全切除例において予後予測マーカーとなるかを検討した。

以下に、メチル化特異的PCRの結果を示す。



DLX4のメチル化異常は、臨床・病理学的な因子と明らかな関連性を認めなかったものの、DLX4メチル化異常の有無により肺切除術後の予後を比較したところ、全生存曲線において $p = 0.0024$ と統計学的有意差を認めた(下図)。



さらに疾患特異的生存曲線および無再発生存曲線のいずれにおいても、DLX4メチル化有無は、統計学的有意な予後関連因子(それぞれ $p = 0.0030$ ,  $p < 0.0001$ )であり、Coxの比例ハザードモデルでも、DLX4メチル化異常の有無は、全生存気管、疾患特異的生存気管および無再発生存気管いずれにおいても統計学的に独立した有意な予後予測マーカー

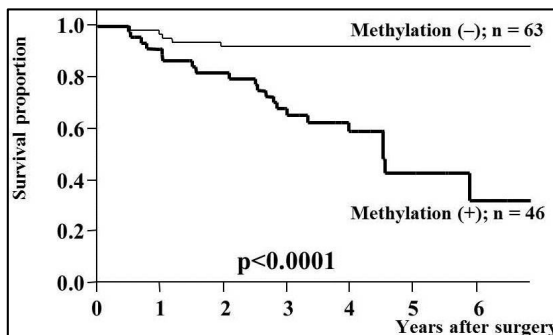
一であった。

### PCDH10 (Protocadherin 10)

PCDH10 は、シグナル伝達機構や細胞増殖制御などの機能を有しがん抑制遺伝子として注目されてきた。リンパ節転移を認めなかった肺癌完全切除例において、そのメチル化異常が予後関連因子となるか検討した。

リンパ節転移の無い肺癌切除例において、45%にPCDH10メチル化異常を認め、これらは、年齢・性別・組織型・文化度・腫瘍径などと関連を認めた。

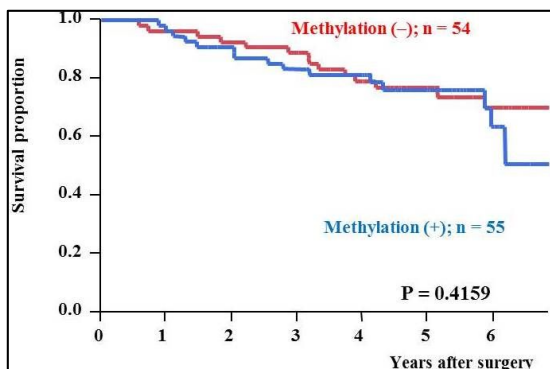
肺切除後の予後曲線(無再発生存曲線)を以下に示す。



さらに疾患特異的生存曲線および全生存曲線においても同様に、PCDH10のメチル化有無は、統計学的有意な予後関連因子であった。Coxの比例ハザードモデルでも、PCDH10メチル化異常の有無は、疾患特異的生存気管および無再発生存気管においても統計学的に独立した有意な予後予測マーカーであった。

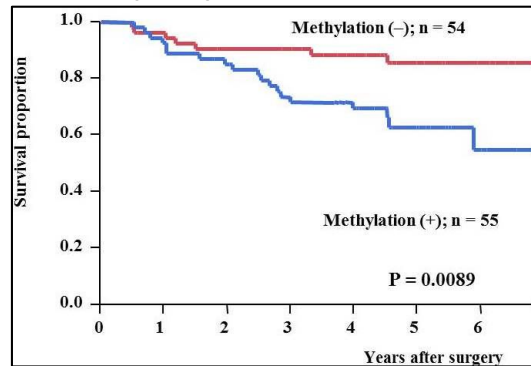
### MDFI (MyoD family inhibitor)

MDFIは、様々な固形がんにおいてメチル化により発現制御されていることは判明しているが、その生物学的意義や働きについてはまだ不明な点が多い。リンパ節転移を認めなかった肺癌完全切除例において、MDFIメチル化異常が予後因子と成り得るかを検討したところ、MDFIのメチル化異常は、臨床・病理学的な因子と明らかな関連性を認めず、下図のように全生存曲線においても予後と関連しなかったものの、



無再発生存曲線による解析においては、予後と

関連した(下図)。



### (2) 口腔粘膜を用いた解析

病理病期I期肺癌患者(16例)と非肺癌患者(32例)において、口腔粘膜DNAメチル化異常の発生profileを比較検討した。評価を試みた12遺伝子(*APC*, *GDNF*, *RARB*, *GSTP1*, *TIMP3*, *MGMT*, *RASSF1A*, *MASPIN*, *HS3ST2*, *CDH1*, *CHARM1*, *HOXD11*)のうち、*GDNF*, *RARB*, *HS3ST2*, *HOXD11*において、メチル化異常が肺癌患者群に有意に多く検出された。また4遺伝子のうち3つ以上の遺伝子でメチル化異常の有無を比較検討(複数遺伝子を用いた統合解析)を行ったところ、100%の特異度および陽性的中率を示した(下図)。

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	p
Combined analysis	31.2%	100%	100%	74.4%	0.0008
Single gene analyses					
<i>GDNF</i>	43.8%	93.8%	77.9%	76.9%	0.0017
<i>RARB</i>	37.5%	93.8%	75.0%	75.0%	0.0062
<i>HS3ST2</i>	25.0%	96.9%	80.0%	72.1%	0.0193
<i>HOXD11</i>	62.5%	84.4%	66.7%	81.8%	0.0010

### (3) 血液サンプルを用いた解析

現在、血液サンプルを用いて、環境要因の総合的指標ともいえる酸化ストレスレベルと、肺癌患者における遺伝子メチル化異常の関連性について、いくつかの知見を既に得ており、平成29年度において国際学会での発表を予定している。

### 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2件)

Harada H, Miyamoto K, Yamashita Y, Taniyama K, Mihara K, Nishimura M, Okada M. Prognostic signature of protocadherin 10 methylation in curatively resected pathological stage I non-small-cell lung cancer. *Cancer Med.* 2015 Oct;4(10):1536-46, doi: 10.1002/cam4.507.

Harada H, Miyamoto K, Yamashita Y, Taniyama K, Okada M. Methylated *DLX4* predicts response to pathologic stage I non-small cell lung cancer resection. *Ann*

Thorac Surg. 2015 May;99(5):1746-54, doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.12.058.

〔学会発表〕(計5件)

**Harada H**, et al: Combined analyses of DNA methylation profiling in the oral epithelium for lung cancer risk stratification. **Rajavithi Hospital Annual Academic Meeting**, 2016/2/24-26, Bangkok, Thai

**Harada H**, et al: *HOXD* methylation status in the oral epithelium is a promising biomarker for lung cancer risk stratification. **Asian Pacific Society of Respiriology**, 2015/12/3-6, Kuala Lumpur, Malaysia

**Harada H**, et al: Epigenetic Inactivation of *MDF1* Predicts Poor Recurrence-Free Survival after Complete Resection of Pathologic Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. **Asian Pacific Society of Respiriology**, 2015/12/3-6, Kuala Lumpur, Malaysia

**Harada H**, et al: Prognostic Signature of Protocadherin 10 Promoter Methylation in Curatively Resected Pathological Stage I Non-small Cell Lung Cancer. 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the **Society of Thoracic Surgeons**, 2015/1/24-28, San Diego, USA

**Harada H**, et al: Methylation of Distal-less Homeobox 4 (*DLX4*) Predicts the Outcome of Disease after Curative Resection of Stage I Non-small Cell Lung Cancer. 50<sup>st</sup> Annual Meeting of the **Society of Thoracic Surgeons**, 2014/1/25-29, Orlando, USA

〔図書〕(計1件)

**Harada H**, Miyamoto K, Kuwahara M, Yamashita Y. The Role of DNA Methylation as a Biomarker in Lung Cancer: Prognostic Prediction and Early Detection. *Advances in Modern Medicine During the Last Decade* (Bentham e-Books), 2016, 66-72, DOI: 10.2174/97816810802391150101

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 洋明 (HARADA, Hiroaki)

独立行政法人国立病院機構(東広島医療センター臨床研究部)・その他部局・その他(移行)

研究者番号: 90573816

### (2) 連携研究者

岡田 守人 (OKADA, Morihito)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号: 70446045

### (3) 研究協力者

木村 正美 (KIMURA, Masami)