

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10080

研究課題名(和文)食道癌新規治療法の確立に向けた食道癌間質ゲノムの網羅的解析

研究課題名(英文)Global genomic analysis of the stromal compartments of the esophagus toward the establishment of novel treatment for esophageal cancer.

研究代表者

井田 智 (Ida, Satoshi)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・副医長

研究者番号：80583038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌では、飲酒・喫煙に伴う慢性炎症を背景として様々なエピゲノム異常を来す。非癌部間質は、その粘膜と同様にepigeneticな変化を有するのではないかと仮説を立てた。42例の食道癌切除検体から非癌部間質のDNAを抽出し、Long interspersed nuclear element(LINE-1)のメチル化レベルを測定した。飲酒・喫煙暴露の既往は、その値に影響を及ぼさなかった。また、8種類の癌関連遺伝子においてもCIMP(CpG island methylator phenotype)陽性には至らなかった。以上より、飲酒・喫煙の暴露による食道間質のエピゲノム異常は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：In the esophageal cancer, various epigenetic alterations occur due to chronic inflammation accompanying with a history of smoking and alcohol drinking. We hypothesized that non-cancerous stroma might have epigenetic changes. Genomic DNA was extracted from noncancerous stroma using tissue specimens of 42 resected esophageal cancer. Methylation level of long interspersed nuclear element (LINE - 1) was measured. The history of smoking exposure or alcohol drinking did not affect the LINE-1 hypomethylation. In addition, CIMP (CpG island methylator phenotype) positivity was not achieved in the eight types of cancer-related genes. These results suggested that epigenetic alterations were not observed in the non-cancerous stroma of the esophagus exposed by the smoking or drinking.

研究分野：消化器癌

キーワード：食道癌 間質 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

1) はじめに:

食道癌は、もっとも悪性度の高い癌種の一つである。手術・化学療法・放射線療法・化学放射線療法などの集学的治療の発達にも関わらず、その予後は未だに不良である。この食道癌死亡率の増加を抑制するには詳細な癌進展機構の解明と新たな治療戦略の確立が重要である。

2) 食道癌の多段階発癌と多発性:

喫煙、飲酒による慢性炎症は、食道扁平上皮癌の確実なリスクファクターであり、喫煙、飲酒をともに行うことにより、その危険性は相乗的に増加する。さらに近年食事の欧米化や肥満による逆流性食道炎の増加に伴い、バレット食道腺癌の発生が本邦でも増加しつつありその対策は急務である。このように食道癌の発癌過程の一つとして、食道上皮の慢性炎症に伴う、正常上皮 異型上皮 癌という多段階発癌が提唱されている。

さらに、食道癌の特徴の一つとして、同時性・異時性多発がしばしば見られるが、これは "Field cancerization" として広く知られている。

3) 食道癌のエピゲノムの異常:

食道癌でみられる Field cancerization は、上述した何らかの慢性炎症に伴い上皮の genetic や epigenetic な異常により生じることが数多く報告されている。グローバルメチレーションのマーカーとして知られる Long interspersed nuclear element (LINE-1) の食道癌部と正常扁平上皮部でのメチル化レベルを比較すると、癌部において LINE-1 のメチル化は低値であることが明らかになっている。すなわち、このような変化が "Field" で起こっていることにより、食道癌の多発に関連すると考えられている。

一方で、正常上皮の間質の変化が発癌に先立って起こっており癌発育の土壌を形成しているという報告もある。しかし、非癌部上皮に見られるような、Field cancerization としての epigenetic な変化が癌間質に起こっていることを検証した報告はない。

2. 研究の目的

非癌部間質は、その上皮と同様に epigenetic な変化を有するのではないかと仮説を立てた。本研究の目的は食道癌の field cancerization における間質のゲノム・エピゲノムの変化を明らかにし、食道癌の新規治療ターゲットを模索することである。

3. 研究の方法

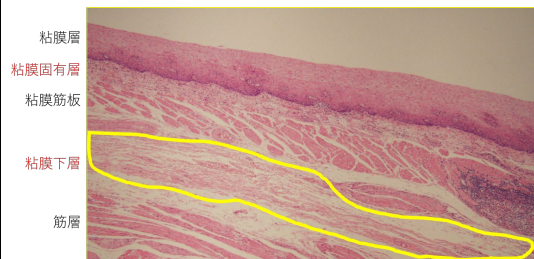
現在、field cancerization に強く関連すると予想される、A) 飲酒・喫煙に暴露され、食道内多発病変を有する食道癌と、B) 飲酒・喫煙歴のない食道癌の切除検体の正常粘膜下の間質から DNA を抽出し、癌部と合わせてエピゲノム解析を行う方針とした。

4 2 例の食道癌切除症例の検体を持ちいて、レーザーマイクロダイセクション法により非癌部間質の DNA を抽出し(図 1)、Epitect bisulfite kit を用いてバイサルファイト処理を行った。

1) パイロシークエンス法により LINE-1 のメチル化の解析を行った。上記 A) と B) での LINE-1 のメチレーションレベルの差異が認められるかを検討した。

2) methylight PCR を用いた 8 種類の癌関連遺伝子 (CACNA1G, CRABP1, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1, MGMT, CHFR) の CIMP (CpG island methylator phenotype) の percentage of methylated reference (PMR) を算出し、上記 A) と B) での PMR を比較した。なお、CIMP 陽性は PMR > 4 と定義した。

図 1. 食道粘膜組織像

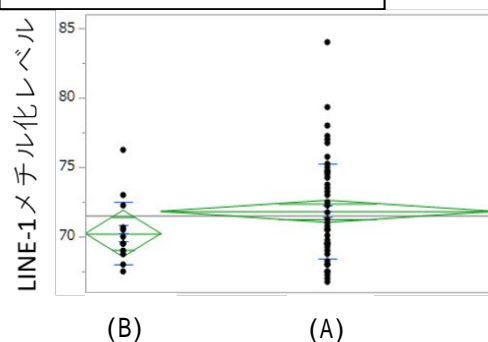


4. 研究成果

1) LINE-1メチル化レベル:

A) 飲酒・喫煙暴露ありの非癌部間質の LINE-1メチレーションレベルは 72.6 ± 9.3 、B) 飲酒・喫煙暴露なしのそれは 70.6 ± 12.3 であり、両群間に有意差を認めるには至らなかった ($p=0.09$)(図2)。

図 2. LINE-1 メチル化レベル



2) CIMPIに関する検討：

解析した42例全例がCIMPI陰性であり、A), B)の間でCIMPI陽性を検討するには至らなかった。以下に、10例のPMR値を抜粋し、提示する。

症例番号	CACNA1G	CRABP1	IGF2	NEUROG1	RUNX3	SOC3	MGMT	CHFR
1	0.00	0.19	1.05	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	2.93	0.12	0.86	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.36	0.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.58	0.17	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.33	0.49	1.62	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.55	0.00	0.12	0.00	0.29	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.67	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	0.87	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00

以上より、食道扁平上皮癌のリスク因子である飲酒・喫煙の暴露の有無による食道間質のエピゲノム変化に有意な差は認められないことが示唆された。

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 13 件)

Canadas I, Thummalapalli R, Kim JW, Kitajima S, Jenkins R, Christensen C, Campisi M, Kuang Y, Zhang Y, Gjini E, Zhang G, Tian T, Sen D, Miao D, Imamura Y, Thai T, Piel B, Terai H, Aref A, Hagan T, Koyama S, Watanabe M, Baba H, Adeni AE, Lydon CA, Tamayo P, Wei Z, Herlyn M, Barbie TU, Uppaluri R, Barbie D. Tumor innate immunity primed by specific interferon-stimulated endogenous retroviruses. *Nature Medicine*. 2018 (accepted) 査読有

Wong GS, Zhou J, Liu JB, Wu Z, Xu X, Li T, Xu D, Schumacher SE, Puschhof J, McFarland J, Zou C, Dulak A, Henderson L, Xu P, O'Day E, Rendak R, Liao WL, Cecchi F, Hembrough T, Schwartz S, Szeto C, Rustgi AK, Wong KK, Diehl JA, Jensen K, Graziano F, Ruzzo A, Fereshetian S, Mertins P, Carr SA, Beroukhim R, Nakamura K, Oki E, Watanabe M, Baba H, Imamura Y, Catenacci D, Bass AJ. Targeting

wild-type *KRAS*-amplified gastroesophageal cancer through combined MEK and SHP2 inhibition.

Nature Medicine. 2018 (accepted) 査読有

Eirini Pectasides, Matthew Stachler, Sarah Derks, Yang Liu, Steven Maron, Lindsay Alpert, Heewon Kwak, Hedy Kindler, Blase Polite, Manish Sharma, Kenisha Allen, Emily O'Day, Samantha Lomnicki, Melissa Maranto, Rajani Kanteti, Carrie Fitzpatrick, Christopher Weber, Namrata Setia, Shu-Yuan Xiao, John Hart, Rebecca Nagy, Kyoung-Mee Kim, Min Gew Choi, Byung Hoon Min, Katie Nason, Lea O'Keefe, Watanabe Masayuki, Hideo Baba, Richard Lanman, Agoston Agoston, David Oh, Andrew Dunford, Aaron Thorner, Matthew Ducar, Bruce Wollison, Haley Coleman, Yuan Ji, Mitchell Posner, Kevin Roggin, Kiran Turaga, Paul Chang, Kyle Hogarth, Uzma Siddiqui, Andres Gelrud, Gavin Ha, Samuel Freeman, Justin Rhoades, Sarah Reed, Greg Gydush, Denisse Rotem, Jon Davison, Imamura Yu, Viktor Adalsteinsson, Jeeyun Lee, Adam Bass, and Daniel Catenacci. Genomic Heterogeneity as a Barrier to Precision Medicine in Gastroesophageal Adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2018; 8: 37-48. 査読有
DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0395

Ida S, Hiki N, Cho H, Sakamaki K, Ito S, Fujitani K, Takiguchi N, Kawashima Y, Nishikawa K, Sasako M, Aoyama T,

Honda M, Sato T, Nunobe S, Yoshikawa T. Randomized clinical trial comparing standard diet with perioperative oral immunonutrition in total gastrectomy for gastric cancer. *Br J Surg*. 2017;104:377-83. 査読有
DOI: 10.1002/bjs.10417.

Ishimoto T, Miyake K, Nandi T, Yashiro M, Onishi N, Huang KK, Lin SJ, Kalpana R, Tay ST, Suzuki Y, Cho BC, Kuroda D, Arima K, Izumi D, Iwatsuki M, Baba Y, Oki E, Watanabe M, Saya H, Hirakawa K, Baba H, Tan P. Activation of transforming growth factor beta 1 signaling in gastric cancer-associated fibroblasts increases their motility, via expression of rhomboid 5 homologue 2, and ability to induce invasiveness of gastric cancer cells. *Gastroenterol* 2017; 153: 191-204. 査読有
DOI: 10.1053/j.gastro.2017.03.046

Izumi D, Ishimoto T, Miyake K, Eto T, Arima K, Kiyozumi Y, Uchihara T, Kurashige J, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Goel A, Tan P, Baba H. Colorectal cancer stem cells acquire chemoresistance through the upregulation of F-Box/WD repeat-containing protein 7 and the consequent degradation of c-myc. *Stem Cells* 2017; 35: 2027-2036. 査読有
DOI: 10.1002/stem.2668

Yamamura K, Baba Y, Nakagawa S, Mima K, Miyake K, Nakamura K, Sawayama H, Kinoshita K, Ishimoto T, Iwatsuki M,

Sakamoto Y, Yamashita Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H. Human microbiome fusobacterium nucleatum in esophageal cancer tissue is associated with prognosis. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 5574-5581. 査読有
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1786

Kosumi K, Baba Y, Sakamoto Y, Ishimoto T, Harada K, Nakamura K, Kurashige J, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Oki E, Watanabe M, Hino S, Nakao M, Baba H. Lysine-specific demethylase-1 contributes to malignant behavior by regulation of invasive activity and metabolic shift in esophageal cancer. *Int J Cancer* 2016; 138: 428-439. 査読有

Baba Y, Yoshida N, Shigaki H, Iwatsuki M, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Watanabe M, Baba H. Prognostic impact of postoperative complications in 502 patients with surgically resected esophageal squamous cell carcinoma: A retrospective single institution study. *Ann Surg* 2016; 264: 305-311. 査読有
DOI: 10.1097/SLA.0000000000001510

Yang S, Imamura Y (as co-first author), Jenkins R, Cañadas I, Kitajima S, Aref AR, Brannon AL, Oki E, Castoreno A, Zhu Z, Thai TC, Reibel J, Qian Z, Ogino S, Wong KK, Baba H, Kimmelman AC, di Magliano MP, Barbie DA. Autophagy inhibition dysregulates TBK1 signaling and promotes pancreatic

inflammation. *Cancer Immunol Res.*
2016; 4: 520-30. 査読有
DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0235

Tokunaga R, Sakamoto Y, Nakagawa S,
Miyake K, Izumi D, Kosumi K, Taki K,
Higashi T, Imamura Y, Ishimoto T,
Iwatsuki M, Baba Y, Miyamoto Y,
Yoshida N, Oki E, Watanabe M, Baba H.
The prognostic significance of Histone
Lysine Demethylase JMJD3/KDM6B in
colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*
2016; 23: 678-685. 査読有
DOI: 10.18632/oncotarget.7782

Nakamura K, Baba Y, Kosumi K, Harada
K, Shigaki H, Miyake K, Kiyozumi Y,
Ohuchi M, Kurashige J, Ishimoto T,
Iwatsuki M, Sakamoto Y, Yoshida N,
Watanabe M, Nakao M, Baba H.. UHRF1
regulates global DNA hypomethylation
and is associated with poor prognosis
in esophageal squamous cell carcinoma.
Oncotarget. 2016; 7: 57821-57831. 査
読有
DOI: 10.18632/oncotarget.11067

Okamura A, Watanabe M, Mine S, Nishida
K, Imamura Y, Kuroguchi T, Kitagawa Y,
Sano T. Clinical impact of abdominal
fat distribution on prognosis after
esophagectomy for esophageal squamous
cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2016;
23: 1387-1394. 査読有
DOI: 10.1245/s10434-015-5018-x

〔学会発表〕(計 0 件)

該当なし。

〔図書〕(計 0 件)

該当なし。

〔産業財産権〕

該当なし。

出願状況(計 0 件)

該当なし。

取得状況(計 0 件)

該当なし。

〔その他〕
ホームページ等

該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井田 智 (Ida Satoshi)
公益財団法人がん研究会・有明病院 消化
器外科・副医長
研究者番号: 80583038

(2) 研究分担者

渡邊 雅之 (Watanabe Masayuki)
公益財団法人がん研究会・有明病院 消化
器外科・部長
研究者番号: 80254639

今村 裕 (Imamura Yu)
公益財団法人がん研究会・有明病院 消化
器外科・副医長
研究者番号: 70583045

馬場 祥史 (Baba Yoshifumi)
熊本大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号: 20599708

(3) 連携研究者

該当なし。

(4) 研究協力者

該当なし。