

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10124

研究課題名(和文) 食道手術前補助療法の奏効性に関するエピゲノム異常

研究課題名(英文) Epigenetic alterations related to efficacy of neoadjuvant therapy before esophagectomy

研究代表者

山田 和彦 (Yamada, Kazuhiko)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・医長

研究者番号：70401081

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)：食道手術は解剖学的に最も困難な手術の1つであり、術後管理も難しい。近年では術前補助療法として化学放射線療法が施行されているが、一方で高齢者への術前補助療法の施行は患者の体力を消耗し、周術期管理をより困難にする場合がある。本研究では、術前補助療法の奏効に関連する分子マーカーの探索を目的とした。術前補助化学(放射線)療法を施行した食道扁平上皮癌切除症例の奏効症例と非奏効症例において、発現レベルが異なる遺伝子をトランスクリプトーム解析により見出した。これらの遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化状態について解析したところ、奏効症例と非奏効症例において有意差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is an aggressive form of cancer. Surgery and combined therapies, such as chemotherapy, radiotherapy, or synchronous chemoradiotherapy, have significantly developed in the past several years. To improve the survival rate of ESCC, identifying new markers to predict efficacy of preoperative chemotherapy and/or irradiation is urgently needed. The aim of this study is to identify differences in gene expression and epigenetic alterations between responders and non-responders who have received neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy before esophagectomy for ESCC. We performed integrative transcriptomics by RNA sequencing and methylome sequencing by methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) analysis. We found genes whose expression levels were different between responders and non-responders; however, there was no difference in their DNA methylation levels between responders and non-responders.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌 食道扁平上皮癌 化学放射線療法

1. 研究開始当初の背景

食道手術は解剖学的に最も困難な手術の1つであり、術後の管理も難しい。化学放射線療法の有効性を示すエビデンスに基づき、近年では術前補助療法として標準的に施行されているが、一方で高齢者への術前補助療法の施行は患者の体力を消耗し、周術期管理をより困難にする場合がある。申請者はこれまでに、エピジェネティック変化による正常な組織構造および重層扁平上皮細胞機能の維持に必要な分子の発現異常を食道扁平上皮癌で見出し、食道粘膜におけるエピジェネティックな変化はその症例の持つ様々な背景リスクを反映すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、エピジェネティック変化に着目し、術前補助療法の奏効性に関与する分子マーカーを探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 化学(放射線)療法感受性に関連する分子の網羅的解析: 術前に化学(放射線)療法を施行した食道手術症例のうち、年齢、全身合併症の症状の有無、喫煙・飲酒などの背景因子を考慮した治療奏効症例および非奏効症例を抽出し、その食道手術組織の病変部、非病変部を対象としてトランスクリプトーム解析、メチローム解析を施行した。トランスクリプトーム解析は、食道検体組織より抽出したRNAよりRNA-seqライブラリーを作製し、次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。メチローム解析は、同一の食道検体組織より抽出したDNAに対してメチル化CpG結合タンパク質(MBD2)を用いた免疫沈降(MeDIP)を行い、得られたDNAから作製したライブラリーを次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。

(2) 化学(放射線)療法感受性に関連する分子の探索: 1で得られたデータのバイオインフォマティクス解析により、術前補助化学(放射線)療法奏効症例と非奏効症例で発現レベルの異なる遺伝子(DEG)ならびにDNAメチル化レベルが異なる領域(DMR)を検索し、統合した。

(3) 2で見出した分子の発現やエピゲノム異常が、食道手術前補助化学(放射線)療法の効果予測マーカーとして有用か否かを評価した。遺伝子発現については、リアルタイムPCR法によるmRNA発現と、抗体を用いた組織染色による蛋白質発現を検討した。DNAメチル化状態については、Pyrosequence法により定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) RNA-seqによるトランスクリプトーム解析により、術前補助化学(放射線)療法奏効症例と非奏効症例において発現レベルの異なる遺伝子を見出した。その遺伝子のプロモーター領域におけるDNAメチル化状態を解析するために、Pyrosequence法によるDNAメチル化定量法を確立して検証した。その結果、奏効症例と非奏効症例の間に有意な差は認められなかった。MeDIP-seqによるメチローム解析データのバイオインフォマティクス解析においても、奏効症例と非奏効症例間でDMRは見出されなかったことから、DNAメチル化状態の違いは補助化学(放射線)療法治療応答性に関連していない可能性が示された。

(2) トランスクリプトーム解析において、奏効症例と非奏効症例で発現レベルが異なった遺伝子については、リアルタイムPCR法による遺伝子発現変化の確認に加えて、抗体を用いた組織染色による多検体を対象とした後向き検討を行った。抗体を用いた染色性を指標とした場合、補助化学(放射線)療法に対する治療応答性に関連する分子は見出されなかったが、単変量解析において食道扁平上皮癌の予後と関連するマーカー分子が見出され、そのうちKLK13は多変量解析においても予後マーカーとして有用であった。

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)

1. Yamada K, Hagiwara T, Inazuka F, Sezaki T, Igari T, Yokoi C, Nohara K, Yamashita S, Dohi T, Kawamura YI. Expression of the desmosome-related molecule periplakin is associated with advanced stage and poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Translational Cancer Res*, 7:79-87, 2018、査読有
2. Otsubo T, Yamada K, Hagiwara T, Oshima K, Iida K, Nishikata K, Toyoda T, Igari T, Nohara K, Yamashita S, Hattori M, Dohi T, Kawamura YI. DNA hypermethylation and silencing of PITX1 correlated with advanced stage and poor postoperative prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(48):84434-84448, 2017、査読有
3. Sasaki A, Ide S, Kawamoto Y, Bando T, Murata Y, Shimura M, Yamada K, Hirata A, Nokihara K, Hirata T, Sugiyama H, Maeshima K. Telomere

- visualization in tissue sections using pyrrole- imidazole polyamide probes. Sci Rep、6:29261、2016、査読有
4. Shiba D, Terayama M, Yamada K, Hagiwara T, Oyama C, Tamura-Nakano M, Igari T, Yokoi C, Soma D, Nohara K, Yamashita S, Dohi T and Kawamura YI. Clinicopathological significance of cystatin A expression in progression of esophageal squamous cell carcinoma. Medicine 97(15):e0357、2018、査読有
 5. Nohara K, Yamada K, Yamada L, Hagiwara T, Igari T, Yokoi C, Soma D, Yamashita S, Dohi T, Kawamura YI. Expression of kallikrein-related peptidase 13 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma Gen Thorac Cardiovasc Surg 66(6):351-357、2018、査読有
 6. Harada K, Mine S, Yamada K, Shigaki H, Oya S, Baba H, Watanabe M. Long-term outcome of esophagectomy for primary malignant melanoma of the esophagus: a single-institute retrospective analysis. Dis Esophagus、29(4):314-319、2016、査読有
 7. Matsumoto A, Watanabe M, Shigaki H, Okumura Y, Nishida K, Mine S, Yamada K, Yanaga K, Sano T. Intussusception causing postoperative intestinal obstruction following free jejunum transfer in adults: two case reports and review of the literature. Surg Case Rep、1(1):28、2015、査読有
 8. Watanabe M, Mine S, Nishida K, Yamada K, Shigaki H, Matsumoto A, Sano T. Salvage Esophagectomy After Definitive Chemoradiotherapy for Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Who Really Benefits from this High-Risk Surgery? Ann Surg Oncol、22(13):4438-4444、2015、査読有
 9. Oya S, Mine S, Watanabe M, Yamada K. Oesophageal cancer with an aberrant right subclavian artery accompanied by a thoracic duct anomaly. Eur Journal Cardiothorac Surg、48(3):e55-57、2015、査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Yamada K and Kawamura YI. Expression of

- the desmosome-related molecule periplakin in esophageal squamous cell carcinoma. 2016 ISDE Singapore, 2016/7
2. Shiba D, Yamada K, Hagiwara T, Sezaki T, Inazuka F, Nohara K, Yamada J, Yamashita S, Igari T, Dohi T, Kawamura YI. et al. Integrative analysis of methylome and transcriptome detected loss of Rh type C-glycoprotein in esophageal squamous cell carcinoma. 2016 ISDE Singapore, 2016/7
 3. Sugimoto T, Yamada K, Hagiwara T, Shiba D, Sezaki T, Inazuka F, Nohara K, Yamada J, Yamashita S, Igari T, Dohi T, Kawamura YI. et al. Cystatin A (CSTA) is downregulated in esophageal squamous cell carcinoma in association with aberrant DNA methylation. 2016 ISDE Singapore, 2016/7
 4. Sugimoto T, Hagiwara T, Yamada K, Oyama C, Tamura-Nakano M, Nohara K, Soma D, Yamashita S, Shiba D, Igari T, Yokoi C, Dohi T, Kawamura YI. PRS27 is downregulated in esophageal squamous cell carcinoma in association with aberrant DNA hypermethylation. ESDE 2017/12 Munich
 5. Yamada K, Kawamura YI, Hagiwara T, Inazuka F, Sezaki T, Dohi T, Nohara K, Soma D, Yamashita S, Edamoto Y, Yano H, Hashimoto M, Kokudo N. Expression of the desmosome-related periplakin is associated with advanced stage of esophageal squamous cell carcinoma. OESO 14th World Conference Global perspectives in Esophageal diseases. ジュネーブ 2017/9
 6. Terayama M, Yamada K, Soma D, Kokudo N, Kawamura YI. Cystatin A (CSTA) expression relates to clinic-pathological stages in esophageal squamous cell carcinoma. OESO 14th World Conference Global perspectives in Esophageal diseases. ジュネーブ 2017/9
 7. Yamada K, Otsubo T, Hagiwara T, Oshima K, Iida K, Nishikata K, Toyoda T, Igari T, Nohara K, Soma D, Kataoka A, Yamashita S, Hattori M, Dohi T, Kawamura YI. DNA hypermethylation of PITX1 correlated with poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. ESDE European Society for Disease of the Esophagus. ユトレヒト 2017/11
 8. 山田.和彦, 河村 由紀, 山田 純, 野原京子, 山下 智, 萩原 輝記, 大坪 武史, 中野(田村)美和, 瀬崎 拓人, 土肥 多恵子, 枝元 良広, 徳原 真, 橋本 政典, 矢野 秀朗. 食道癌における網羅的メチル化解析より見出されたデスモソーム関

連分子 periplakin と臨床病理学的検討.
第 116 回日本外科学会定期学術集会. 大阪, 4 月, 2016.

9. 山田 和彦, 河村 由紀, 猪狩 亨, 土肥 多恵子. デスモゾーム関連分子である periplakin の発現は予後不良因子になる DNA メチル化と免疫染色での検討. 第 71 回日本消化器外科学会総会. 徳島, 7 月, 2016.
10. 志波 大輝, 山田 和彦, 野原 京子, 山田 純, 山下 智, 横井 千寿, 猪狩 亨, 萩原 輝記, 土肥 多恵子, 河村 由紀. 食道扁平上皮癌の methylome および transcriptome 解析により見出された RhCG の発現低下. 70 回日食道学会総会, 東京, 7 月, 2016.
11. 河村 由紀, 山田 和彦, 猪狩 亨, 土肥 多恵子. 食道扁平上皮癌における デスモゾーム関連分子 periplakin の発現は予後不良と関連する. 第 75 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月, 2016.
12. 山下智, 山田和彦, 野原 京子, 相馬 大介, 猪狩 亨, 横井 千寿, 枝元 良広, 矢野 秀朗, 土肥 多恵子, 河村由紀. 食道扁平上皮癌におけるホメオボックス遺伝子 HOPX の発現は予後不良に関連する. 第 72 回日本消化器外科学会総会 2017/7
13. 山田和彦, 河村由紀, 萩原 輝記, 大坪 武史, 中野 (田村) 美和, 土肥 多恵子, 野原 京子, 相馬 大介, 山下 智, 枝元 良広, 矢野 秀朗, 橋本 政典. 食道扁平上皮癌におけるメチル化分析から得られた Kallikrein-Related Peptidase 13 (KLK13) の発現と臨床病理学的検討 JDDW2017 2017/10

〔図書〕(計 4 件)

1. 山田和彦, 中條大輔著 人工臓臓 取り扱いマニュアル 診断と治療社 2017
2. 山田和彦 頸部郭清 渡邊雅之編 がん研スタイル 癌の標準手術 食道癌 メジカルビュー社 2016
3. 山田和彦 経裂孔的の下部食道切除 渡邊雅之編 がん研スタイル 癌の標準手術 食道癌 メジカルビュー社 2016
4. 山田和彦 再建胃管癌の手術 渡邊雅之編 がん研スタイル 癌の標準手術 食道癌 メジカルビュー社 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :

国内外の別 :

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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 和彦 (YAMADA KAZUHIKO)
国立国際医療研究センター病院
食道胃外科
診療科長
研究者番号 : 70401081

(2) 研究分担者

河村 由紀 (KAWAMURA I. YUKI)
国立国際医療研究センター・研究所・肝炎・
免疫研究センター・消化器疾患研究部
消化器病態生理研究室長
研究者番号 : 10392391

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし