

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19944

研究課題名(和文) バレット食道癌の新規バイオマーカー開発を目指したゲノム低メチル化の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of DNA hypo methylation in Barrett's esophageal carcinoma

研究代表者

原田 和人 (HARADA, Kazuto)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70608869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：LINE-1メチル化レベルはゲノム全体のDNAのメチル化レベルの指標となる。治療前生検凍結組織より食道腺癌部178例、正常部52例、Barrett食道77例の症例から抽出されたDNAからBisulfite-Pyrosequencing法によりLINE-1メチル化レベルを測定した。癌部のLINE-1メチル化レベルは正常部、Barrett食道と比較して有意に低下していることを明らかにした。更に、LINE-1低メチル化レベルの症例の予後は高メチル化レベルの症例と比較して有意に予後が不良であることがわかった。]LINE-1の低メチル化レベルは食道腺癌の悪性度と関係することを証明できた。

研究成果の概要(英文)：The level of long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) methylation has become regarded as a surrogate marker of global DNA methylation. LINE-1 methylation level was evaluated by using Bisulfite-Pyrosequencing method from frozen biopsy sample in esophageal adenocarcinoma, barrett's esophagus and normal esophageal mucosa. We found that LINE-1 methylation level in esophageal adenocarcinoma was significantly lower than in Barrett's esophagus and normal mucosa. Lower LINE-1 methylation group showed significantly poor prognosis compared with higher LINE-1 methylation group.

研究分野：消化器癌

キーワード：食道腺癌 Barrett食道 LINE-1 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

癌におけるDNAメチル化異常の特徴としてはゲノム全体の低メチル化(global DNA hypomethylation)とCpG islandにおける部分的な高メチル化(CpG island methylator phenotype)がある(Berman et al. Nature Genetics 2012)。前者は染色体不安定性を引き起こすと考えられ(Eden et al. Science 2003)、後者は高メチル化した遺伝子のmRNAへの転写を抑制することにより遺伝子の不活化を引き起こすとされる(Jones et al. Nature Rev Genet 2002)。ゲノム全体の低メチルと癌の関連については未知な部分が多く、新たな究明が求められている分野である。LINE-1 (Long interspersed nucleotide factor-1) は、ヒトゲノム内に最も多く存在するレトロトランスポゾンであり、ヒトゲノムの17%を占めているため、そのメチル化レベルはゲノム全体のメチル化レベルの指標となることが発表された(Cordaux et al. Nat Rev Genet 2009)。LINE-1のメチル化レベル測定には、Bisulfite-Pyrosequencing technologyを用いるが、その正確性及び高い再現性は証明されている(Irahara et al. J Mol Diagn 2010)。われわれは食道癌、胃癌において、癌部のLINE-1メチル化レベルは正常部よりも有意に低く、更に癌患者の正常粘膜のメチル化レベルは非担癌患者の正常粘膜のメチル化レベルよりも有意に低いことを明らかにした(Shigaki et al. Ann Surg Oncol 2012、Kosumi et al. Med Oncol 2015)。更に、喫煙により食道粘膜、ピロリ菌感染により胃粘膜のLINE-1メチル化レベルが低下することが分かっている。つまり、エピジェネティックな発癌の素地としてLINE-1メチル化レベルが低下することを示しており、LINE-1メチル化レベルは発癌リスクの評価に有用であることが示唆される。癌細胞のLINE-1メチル化レベルも様々であり、メチル化レベルが低いほど予後が不良であることを食道扁平上皮癌、胃癌、肝細胞癌において報告した(Iwagami et al. Ann Surg 2012、Shigaki et al. Gastric Cancer 2012、Harada et al. Ann Surg Oncol 2014)。しかしながら、癌においてLINE-1が低メチル化となるメカニズムやLINE-1メチル化レベルが予後に影響する機序に関しては未だ説明がされていない。

2. 研究の目的

欧米諸国では胃食道逆流症の急増と共に食道腺癌の発生母地であるBarrett食道が増加し、バレット食道癌の罹患率が増加している(Lagergen J, et al. N Eng J Med. 1999)。近年、日本でもその増加は著しい。さらに、手術、化学療法、放射線療法、化学放射線療法などを含む集学的治療の進歩にも関わらず、食道腺癌の5年生存率は25%と不良であり、早期発見や予後因子の解明は喫緊の課題であるといえる(Merkow RP et al.,

Cancer 2012)。メチル化異常を含む“エピジェネティックな異常”は可逆的な反応であり、癌治療のターゲットとして非常に有望である。さらに、発癌や予後と関連するエピジェネティックな変化を同定することは、リスクに応じた治療方針決定に役立ち、また、その変化を標的とした治療法が開発された際には、対象患者選別のマーカーとして用いられることが期待される。本研究の目的はBarrett腺癌においてLINE-1メチル化レベルに関して網羅的に解析することである。

3. 研究の方法

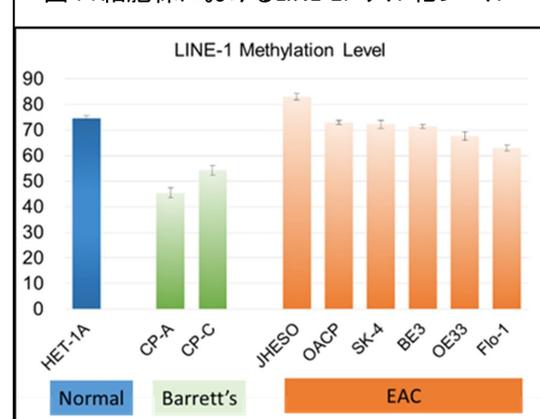
当科および共同研究先であるMD Anderson Cancer Centerから採取されたBarrett食道粘膜、Barrett腺癌の組織よりDNAを抽出し、Bisulfite-Pyrosequencing法によりLINE-1メチル化レベルを測定する。データベースを用いて臨床病理学的因子、疫学的因子、分子学的因子との関連を網羅的に検討する。次にLINE-1低メチル化症例とLINE-1高メチル化症例をCGH array, miRNA array, expression arrayにかけて、LINE-1のメチル化と関連する遺伝子を網羅的に解析する。同定された遺伝子のsiRNAによる発現抑制、ベクター導入による強制発現の系を確立し、機能解析を進める。抑制系、過剰発現系でのLINE-1メチル化レベルの変化を評価し、LINE-1メチル化レベルに影響を及ぼす遺伝子であるかを評価する。さらに、In vitro assayの結果をin vivoで確認する。

4. 研究成果

食道細胞株のLINE-1メチル化レベル

食道腺癌細胞株のLINE-1メチル化レベルの測定を行った。Barrett食道細胞株のLINE-1メチル化レベルは正常粘膜細胞株と比較して低下している事を明らかにしていた(図1)。食道癌細胞株のLINE-1メチル化レベルは正常粘膜細胞株と比較して有意差は認められなかった。正常粘膜細胞株からBarrett食道細胞株、食道腺癌細胞株にかけて徐々にメチル化レベルが増加していることが分かった。

図1:細胞株におけるLINE-1メチル化レベル



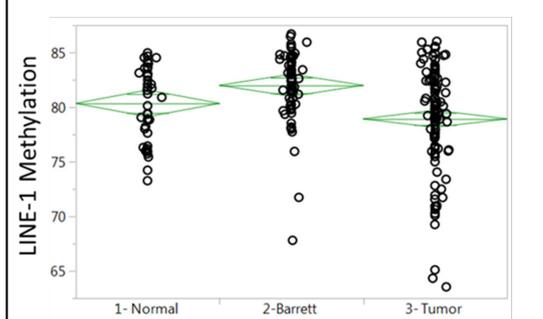
生検凍結サンプルからの LINE-1 メチル化レベルの測定

治療前の上部消化管内視鏡下に採取された凍結サンプルが保存してある。凍結サンプルから組織切片を作成し、組織学的に60%以上癌組織を含んでいるサンプルからDNAの抽出を行った。DNAとRNAの抽出はAllPrep DNA/RNA Mini Kitを用いて行った。この臨床検体からのDNAを用いてBisulfite-Pyrosequencing法によりLINE-1メチル化レベルを測定した。

正常部、バレット食道、癌部の LINE-1 メチル化レベルの測定

正常組織と癌部を比較すると優位に癌部でLINE-1のメチル化レベルが低下していた。Barrett食道と正常部のLINE-1メチル化レベルを比較すると、予想と反してBarrett食道のLINE-1のメチル化レベルが有意に高かった(図2)。

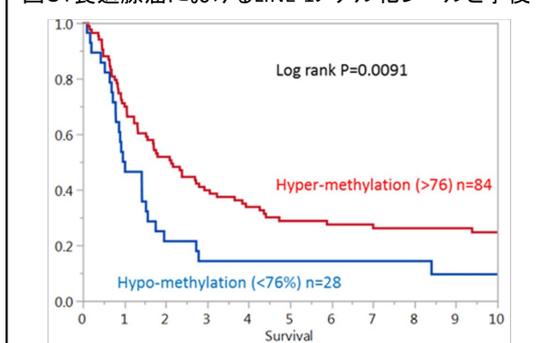
図2: 正常部、バレット、食道腺癌におけるLINE-1メチル化レベル



LINE-1 メチル化レベルと予後

食道腺癌におけるLINE-1メチル化レベルと予後についての検討を行った。LINE-1低メチル化症例は高メチル化症例と比較して有意に予後が不良であった(図3)。

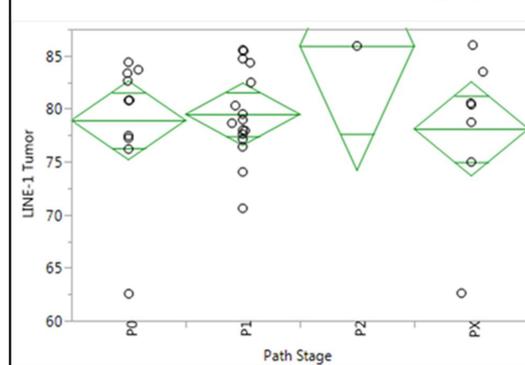
図3: 食道腺癌におけるLINE-1メチル化レベルと予後



LINE-1 メチル化レベルと治療奏効率

食道腺癌におけるLINE-1メチル化レベルと術前治療に対する組織学奏効率について検討した。治療奏効率とLINE-1のメチル化レベルとの関係を認めなかった。

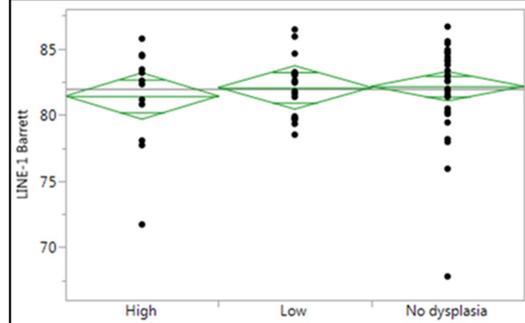
図4: LINE-1メチル化レベルと治療感受性



Barrett 食道の異形成と LINE-1 メチル化レベルの検討

Barrett食道症例の異型性とLINE-1メチル化レベルについて検討したが、LINE-1のメチル化レベルとの関係は認めなかった(図5)。

図5: 食道の異形成とLINE-1メチル化レベル



まとめ

食道腺癌のLINE-1メチル化レベルは予後と有意に相関していることを明らかにした。良好な結果であり、今後症例数を増やして報告する予定である。低LINE-1メチル化レベルが予後に影響をあたえるメカニズムについても検討を試みたい。

Barrett食道のLINE-1のメチル化レベルは予想と反して、正常部よりも高かった。これはBarrett食道はエピジェネティックな発癌の素地としてLINE-1メチル化レベルが低下しているという予想に反する結果であった。今後はなぜ、高メチル化であるのかを検討する必要がある。

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)

Yamamura K, Kosumi K, Baba Y, Harada K, Gao F, Zhang X, Zhou L, Kitano Y, Arima K, Kaida T, Takeyama H, Higashi T, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Tan X, Baba H

LINE-1 methylation level and prognosis in pancreas cancer: pyrosequencing technology and literature review. Surg Today 47(12) 1450-1459 2017 査読有
Doi:10.1007/s00595-017-1539-1

Miyata T, Yamashita Y, Baba Y, Harada K, Yamao T, Umezaki N, Tsukamoto M, Kitano Y, Yamamura K, Arima K, Nakagawa S, Okabe H, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Shimokawa M, Baba H Prognostic value of LINE-1 methylation level in 321 patients with primary liver cancer including hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. Oncotarget 9 20795 - 20806 2018 査読有
Doi: 10.18632/oncotarget.25124

〔学会発表〕(計 2 件)

原田和人、吉田直矢、馬場祥史、志垣博信、岩槻政晃、藏重淳二、小澄敬祐、坂本快郎、宮本裕土、徳永竜馬、辛島龍一、渡邊雅之、馬場秀夫 栄養指標 CONUT スコアは食道癌手術後の独立した予後因子である 第116回日本外科学会定期学術集会 2016年04月16日 大阪

Nakamura K, Baba Y, Kosumi K, Harada K, Shigaki H, Miyake K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, Yoshida N, Baba H The relationship between UHRF1 overexpression and LINE-1 hypomethylation in esophageal squamous cell carcinoma AACR Annual Meeting 2016 2016年04月19日 USA

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 和人 (HARADA, Kazuto)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療
医師
研究者番号：70608869

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()