

平成 21 年 5 月 5 日現在

研究種目:基盤研究(C)
 研究期間:2006~2008
 課題番号:18591460
 研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子のプロモーター領域異常メチル化を用いた癌の早期診断への臨床応用

研究課題名(英文) The profile of aberrant promoter hypermethylation and clinical trial of early detection using methylation in gastrointestinal cancers

研究代表者
 高橋 孝夫(TAKAHASHI TAKAO)
 岐阜大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号:90332684

研究成果の概要:

この研究における目的は消化器癌、特に大腸癌において癌関連遺伝子の異常メチル化プロファイルを作成し、癌の診断に用いることが可能なマーカーを探索することである。我々の研究では多数の癌関連遺伝子における異常メチル化を解析した結果、*3-OST2* 遺伝子が大腸癌症例の 52.7%と最も異常メチル化の頻度が高いことを証明した。大腸癌細胞株において *3-OST2* 遺伝子の発現低下と異常メチル化とが相関することも検証した。大腸癌切除標本の洗浄液から DNA を抽出し、*3-OST2* 遺伝子の異常メチル化を調べたところ原発巣で異常メチル化を認めた 67%に腸管洗浄液から異常メチル化を同定可能であった。新たな早期診断に用いるマーカーとなる可能性を示唆し、便を用いた早期診断の足がかりとなる研究である。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,400,000	630,000	4,030,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード:(1) DNA promoter hypermethylation (2) colorectal cancer (3) *3-OST2*
 (4)*RUNX3* (5) *CHFR* (6) P16 (7) early detection

1. 研究開始当初の背景

癌抑制遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化は遺伝子発現低下を導き、遺伝子の不活化をきたすことはいろいろな癌腫で報告されてきている。しかしながら 1 種類の癌抑制遺伝子の詳細な異常メチル化に関する検討は次々と報告されたが、網羅的な異常メチル化

に関するプロファイリングの報告は少なかった。また癌の診断マーカーとしては検討されていなかった。特に日本人サンプルを用いたプロファイリングはまだ少ないと判断し、多数存在する異常メチル化をきたす癌関連遺伝子群の中でどの遺伝子が重要であるのか調査

したいと考えた。その重要な遺伝子が同定されれば臨床応用可能となり、有益になると思われる。

2. 研究の目的

多数の異常メチル化をきたす癌抑制遺伝子が報告されるようになってきたが、一体どの遺伝子が異常メチル化の頻度が高く、重要であるのかを調査することとした。我々は胆嚢癌、大腸癌において約20の癌抑制遺伝子におけるプロモーター領域のメチル化を検討してきた。その結果により *3-OST-2*, *RUNX3*, *SOCS-1*, *H-cadherin*, *Reprimo* 遺伝子などが高頻度にメチル化をきたしていることがわかった。

(Clin Cancer Res, 10: 6126-33, 2004) (IJC, 118, 924-931, 2006) これらの遺伝子のプロモーター領域メチル化は正常組織ではほとんど認めないため腫瘍特異的と考えられる。メチル化はMethylation specific PCR (MSP)にて同定するが、以前に報告されているように大変感度がよく、1000細胞に1個以上の癌細胞が存在すればメチル化の同定が可能であると言われている。よって癌の早期診断のマーカーとして応用可能と考える。

(1) まず岐阜大学病院で手術を受けた消化器癌、特に大腸癌患者(日本人)を用いて *3-OST-2*, *RUNX3*, *SOCS-1*, *Reprimo* 遺伝子を含め、多数の癌抑制遺伝子の解析を行う。

(2) 大腸癌サンプル、大腸癌患者の腸管洗浄液サンプルのプロモーター領域メチル化を解析することにより、便など腸管内容で早期診断が可能かどうかを検討する。また前癌病変とされる大腸腺腫においてもメチル化をきたしているかどうか解析する。このときどのマーカーが優れているのか、combinationをしたほうがよいのかなどもふくめ、検討する。新規遺伝子についてもメチル化の存在する遺伝子を同定し、プロモーター領域の異常メチル化の重要性を明らかにしていきたい。

(3) 多数の異常メチル化をきたしている癌抑制遺伝子(関連遺伝子)を同定し、その中で個々の癌抑制遺伝子の異常メチル化と臨床病理学的因子との相関を調査し、どの遺伝子が臨床的に重要であるか決定する。

3. 研究の方法

(1) われわれは12種類の大腸癌細胞株(LoVo, LS174T, SW1417, SNU-C1, SW480, LS123, COLO320DM, RK0, HCT116, DLD1, COLO201, NCI-H630)を用いて、各種癌抑制遺伝子のMethylation specific PCR (MSP)の条件設定を行う。

(2) 3種類の癌関連遺伝子(*3-OST-2*, *RUNX3*, *CHFR*)を中心に、*Reprimo*, *CDH13*, *CDH1*, *P16*遺伝子など21癌関連遺伝子の解析を行う。(*P16*, *CDH13*, *CDH1*, *TIMP3*, *SOCS1*, *SHP1*, *SYK*, *CRBP1*, *RARB*, *RASSF1A*, *NORE1*, *APC*, *DcR1*, *DcR2*, *RUNX3*, *HPP1*, *HIN-1*, *CHFR*, *RIZ1*, *Reprimo*, *3-OST-2*)

(3) 新規遺伝子については大腸癌細胞株からDNA, RNAを抽出し、新規遺伝子のプロモーター領域にMSP primerをオーダーし、MSPの条件を設定する。この時DNAはbisulfite処理を行う。また抽出したRNAよりcDNAを合成し、大腸癌細胞株における発現を検討する。これにてプロモーター領域の異常メチル化とmRNAレベルの発現低下とが相関するかどうかを検討する。その後、脱メチル化薬剤5AZA処置にて発現回復するかどうか検討し、もしこの薬剤にて発現回復すればこの新規癌抑制遺伝子の発現低下はプロモーター領域の異常メチル化に依存することが証明されることとなる。

(4) 本学の倫理委員会を通し、患者様のinformed consentを得た上で、大腸癌患者の癌と正常大腸粘膜の標本の一部を凍結保存し、異常メチル化の解析のために用いる。同じ患者からの摘出標本の洗浄液を回収する。具体的には摘出標本を生食100mlで良く洗浄し、腫瘍もみだしを行い、これを洗浄液とし回収する。また摘出標本からのドレナージベイン(右側結腸の場合:回結腸静脈、左側結腸の場合:下腸間膜静脈)より採取させていただき、これらからDNAを抽出する。術前末梢血、術後末梢血、外来にて末梢血も収集する。

(5) まず大腸癌標本および同じ症例の正常粘膜からのDNAを用いてMSP用にbisulfite処置を行う。基本的に異常メチル化の解析はMSP (Methylation specific PCR) の手法を用いて行う。*3-OST-2*, *RUNX3*, *SOCS-1*, *Reprimo* 遺伝子のMSPを行い、DNAメチル化をきたしているかどうか、異常メチル化をきたしている頻度について検討する。このうち数例シーケンス解析にてCpG islandにメチル化をきたしていることを確認する。

(6) 伝子のMSP条件を設定した後、これらの遺伝子においても臨床サンプルを用いて異常メチル化解析を行う。また癌抑制遺伝子の異常メチル化と臨床病理学的相関を解析する。

(7) 臨床サンプルは日本人と以前施行したアメリカ人サンプルが存在するため、人種間の異常メチル化の違いについても検討する。

(8) 癌部で異常メチル化の頻度が高く、正常大腸粘膜で異常メチル化の頻度が少ない遺伝子は癌の診断マーカーと応用度が高いと考えられる。そこで最も高頻度に癌部で異常メチル化をきたしている頻度が高い遺伝子を用いて上述の如く、癌の早期診断のため摘出標本からの洗浄液や摘出標本からのドレナージベインからのDNAを抽出し、Bisulfite処理し、MSPを行うことにより、消化管の便など排泄物を用いて早期診断に応用できないか、あるいはドレナージベインからのDNAをもちいて異常メチル化を検索することにより、早期に最も高頻度に転移再発する肝転移など遠隔転移を同定できないかどうか検討する。

4. 研究成果

(1) 大腸癌細胞株(LoVo、LS174T、SW1417、SW480、COLO320DM、RKO、HCT116、DLD1、HCT15)を用いて、各種癌抑制遺伝子のMSPの条件設定を行った。*3-OST-2*、*RUNX3*、*CHFR*に続き、*Reprimo*、*CDH13*、*CDH1*遺伝子のMSP条件設定を行い、癌抑制遺伝子の発現の低下とプロモーター領域の異常メチル化との相関を調べたところ、ほぼDNAプロモーター領域異常メチル化と遺伝子発現が相関することを検証した。我々は既に論文報告されているプライマーを用いたこともあるが、多数の論文で報告されているように異常メチル化は癌抑制遺伝子の発現低下に結びつくと考えられた。代表的な*3-OST-2*遺伝子と*RUNX3*について図を提示するが、*3-OST-2*遺伝子は調査した大腸癌細胞株全例に発現低下を認め、これらは異常メチル化をMSPで同定した(図1)。*RUNX3*に関しては12細胞株のうち5細胞株(42%)に異常メチル化を認めた。NCI-H630は遺伝子発現が低下していたが異常メチル化を認めなかった。しかしながら他の11細胞株(92%)は遺伝子発

現低下と異常メチル化が相関していた(図2)。

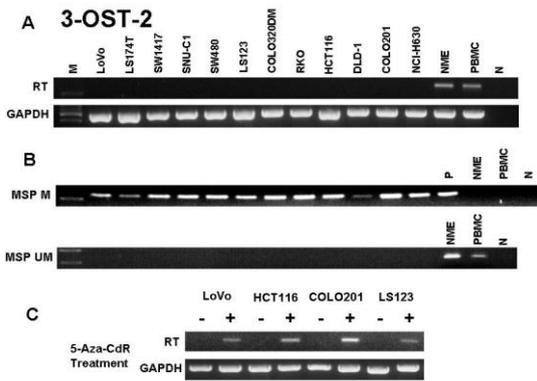


図1: *3-OST-2*

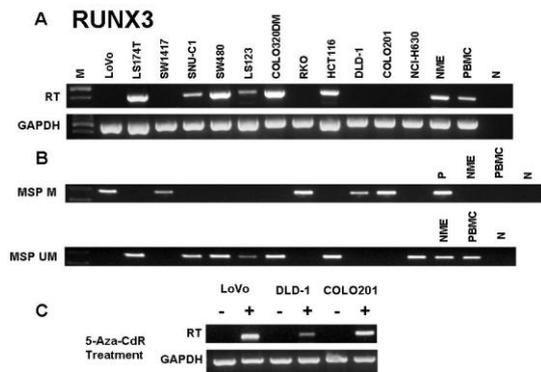


図2: *RUNX3*

(2) 次に臨床サンプルを用いて、異常メチル化の頻度を調べた。岐阜大学の129症例の大腸癌組織、大腸正常粘膜サンプルのDNA抽出を行い、Bisulfite後MSPを行った。4遺伝子(*3-OST2*、*CHFR*、*RUNX3*、*P16*)における大腸癌組織、正常大腸粘膜組織での各遺伝子の異常メチル化は*3-OST2*遺伝子で52.7%、17.0%、*CHFR*遺伝子で26.3%、2.3%、*RUNX3*遺伝子で3.8%、1.5%、*P16*遺伝子で8.4%、3.7%に認め、いずれの遺伝子においても大腸癌組織において正常組織より異常メチル化を高頻度に認めた。また各遺伝子の異常メチル化の有無と性別、年齢、ステージ(深達度、リンパ節転移、遠隔転移)など臨床病理学的諸因子との相関を調べたが有意な相関関係は認めなかった。

(3) アメリカ人における大腸癌サンプル、大腸正常粘膜サンプルを用い、同様に*3-OST2*、*CHFR*、*RUNX3*遺伝子の異常メチル化を調べた。その結果では*3-OST-2*は日本人サンプルの大

腸癌：129例中68例（52.7%），正常大腸粘膜：129例中22例（17%），アメリカ人サンプルの大腸癌：92例中62例（67.4%），正常大腸粘膜：57例中7例（12.3%）であった。*CHFR*に関しては日本人サンプルの大腸癌：129例中34例（26.3%），正常大腸粘膜：129例中3例（2.3%），アメリカ人サンプルの大腸癌：92例中30例（32.6%），正常大腸粘膜：57例中2例（3.5%）であった。*RUNX3*は日本人サンプルの大腸癌：129例中5例（3.8%），正常大腸粘膜：129例中2例（1.5%），アメリカ人サンプルの大腸癌：92例中21例（22.8%），正常大腸粘膜：57例中1例（2%）であった。**3-OST-2**遺伝子はアメリカ人、日本人においても大腸癌では高頻度に異常メチル化を認めたが、アメリカ人が日本人より有意に高頻度の異常メチル化を示した。*CHFR*遺伝子はアメリカ人、日本人において有意な差は認めず、ともに大腸癌は大腸正常粘膜と比較し、有意に異常メチル化の頻度は高かった。*RUNX3*遺伝子においては日本人において有意に大腸癌における異常メチル化の頻度が低かった（図3）。

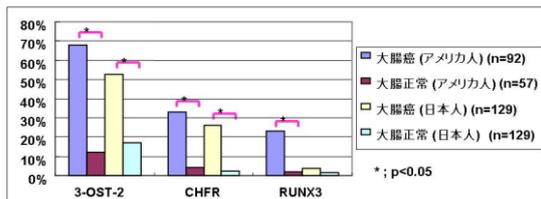


図3：人種間の比較

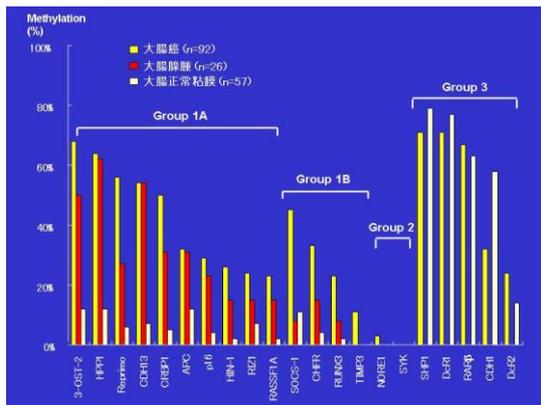


図4：大腸癌、大腸腺腫、大腸正常粘膜における21癌関連遺伝子の異常メチル化プロファイル

(4) 図4の如く、大腸癌、大腸腺腫、大腸正常粘膜における21癌関連遺伝子の異常

メチル化プロファイルを作成した。21癌関連遺伝子は機能的には細胞周期関連遺伝子、浸潤・転移関連遺伝子、JAK-STAT経路、シグナル伝達経路、アポトーシス経路、TGF- β 関連遺伝子などから選択された。この中で**3-OST-2**遺伝子が大腸癌において最も高頻度に異常メチル化を認めた。大腸腺腫においても正常大腸粘膜と比較し、異常メチル化の頻度は高かった。

(5) 我々の今までの研究にて**3-OST-2**遺伝子が最も異常メチル化の頻度が高いため、最も早期診断マーカーとして臨床応用可能と考えた。大腸癌は肝転移をきたすことが多い。そこで肝転移巣での**3-OST-2**遺伝子の異常メチル化を調べた。原発巣と肝転移巣を両方切除した14例を用いて検討したところ、5症例は原発巣および肝転移巣も異常メチル化を認めた。一方6例は原発巣および肝転移巣とも異常メチル化を認めなかった。2例は原発巣に異常メチル化を認めたが、肝転移巣では異常メチル化を認めず、1例は原発巣に異常メチル化を認めなかったが、肝転移巣では異常メチル化を認めた。ほとんどの症例は原発巣と肝転移巣はパラレルに動くが少数ではあるが原発巣と転移巣の異常メチル化ステータスが異なる場合がある。次に異常メチル化を用いた大腸癌の早期診断への応用について検討した。大腸癌切除標本を生食100mlで洗浄し、その液からDNAを抽出し、**3-OST-2**のMSPを行った。21例で施行し、8例（38%）に異常メチル化を同定した。原発巣で異常メチル化を認めた9例中6例（67%）に腸管洗浄液から異常メチル化を同定可能であった。今後便を用いて検出可能かどうか検討を行う。またドレナージベインから血液を採取し同様にMSPを行ったところ21例中1例のみであった。現在、肝転移をきたした症例においてドレナージベインから血液を用

いて血液中の癌細胞同定はできないかどうか検討中である。

(6) 腫瘍の大きさ、ステージ、深達度などの臨床病例学的因子と異常メチル化の相関は認めなかった。よっておそらく進行度によって異常メチル化は進んでいくのではなく、癌化の早い段階で異常メチル化をきたしていると推測された。前癌病変である大腸腺腫においても異常メチル化をきたしていることから推察される。

(7) 新規遺伝子において異常メチル化を検討したがうまくいかなかった。また末梢血のDNAを用いて癌の診断に用いることはできないかとも考えたが、ここまで進まなかった。

しかしながらこれらは今後の課題である。

以上、これらの研究により多数の癌関連遺伝子群の中で3-OST-2遺伝子が最も異常メチル化をきたしていた。よって3-OST-2遺伝子の異常メチル化を用いることで、癌の早期診断マーカーとして臨床応用可能と考えられた。腸管洗浄液から異常メチル化を同定可能であったことより、新たな早期診断に用いるマーカーとなる可能性を示唆し、便を用いた早期診断の足がかりとなる研究であった。

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 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 高橋孝夫、大腸癌における癌抑制遺伝子のDNAプロモーター領域異常メチル化プロファイル、第5回日本消化管学会総会 2009年2月12日東京
- (2) 徳山泰治、大腸癌における癌関連遺伝子のDNAプロモーター領域異常メチル化の検討、第109回日本外科学会学術集会 2009年4月3日福岡
- (3) 徳山泰治、大腸癌における癌関連遺伝子(3OST2, CHFR, RUNX, P16)DNAプ

ロモーター領域異常メチル化の検討、第63回日本消化器外科学会総会 2008年7月17日札幌

- (4) 徳山泰治、大腸癌における癌関連遺伝子のDNAプロモーター領域異常メチル化の検討第108回日本外科学会 2008年5月16日長崎
- (5) 高橋孝夫、大腸癌における癌関連遺伝子のDNAプロモーター領域異常メチル化一人種間の比較一、第4回日本消化管学会 2008年2月8日大阪
- (6) Takao Takahashi, Aberrant promoter methylation of multiple genes in colorectal cancers. 18th HCS International Symposium 2008年11月9日広島
- (7) Takahashi T., Aberrant promoter methylation of multiple genes in colorectal cancers and gallbladder carcinomas. The 7th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society, 2006年9月15日北京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 孝夫 (TAKAHASHI TAKAO)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90332684

(2) 研究分担者

徳山 泰治 (TOKUYAMA YASU HARU)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00422717