

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591614
 研究課題名（和文）メチル化プロファイルと EGFR 遺伝子変異に基づいた
 肺癌診療体系の構築
 研究課題名（英文）Construction of the system for lung cancer treatment based on
 methylation profile and EGFR mutation
 研究代表者
 村川 知弘（MURAKAWA TOMOHIRO）
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：50359626

研究成果の概要：

発癌の一因に遺伝子のメチル化による不活化があり、肺癌でも複数の遺伝子でメチル化の報告がなされている。従来肺癌でメチル化の報告がなかった遺伝子を新たに検索するため、バイオインフォマティクス並びに実験的手法の両方をうまく用いることで、肺癌でメチル化の存在する遺伝子を新たに 8 つ同定した。これらの遺伝子の 1 つである G0S2 遺伝子のメチル化が非扁平上皮癌と比較して扁平上皮癌において有意に多いことが判明した。また従来から報告があった p16 遺伝子のメチル化と EGFR 遺伝子変異の排他性も我々のデータから確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

肺癌は癌死の中で最も多い。肺癌の主な分類として、小細胞肺癌と非小細胞肺癌に分けられるが、非小細胞肺癌の中でも扁平上皮癌には適応のない薬剤（アリムタ、アバスタチン）が出始めており、非小細胞肺癌の中でもさらに扁平上皮癌と非扁平上皮癌をしっかりと鑑別する必要性が論じられている。従来の病理学的、形態学的な鑑別法に加え、診断・治療を進める上で参考となるような新たなバイオマーカーの開発が望まれている。癌に関連する遺伝子発現異常の原因として、

点突然変異や欠失、そして DNA メチル化の異常がある。

過去に非小細胞肺癌においても複数の異常メチル化される遺伝子が報告されてきた。中には p16 のように予後との関連を示すメチル化遺伝子の報告もあった。

2. 研究の目的

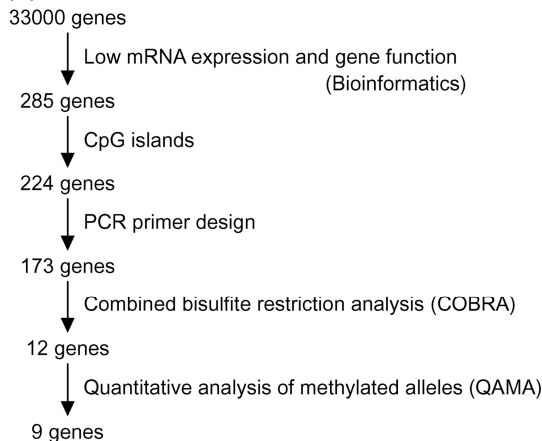
今回、われわれは独自の方法で、非小細胞肺癌において過去に報告のない新たな異常メチル化を示す遺伝子の検索を行い、過去にわれわれが報告した QAMA (quantitative

analysis of methylated alleles)を用いた定量的メチル化解析・クラスタリングの手法を、今回同定した遺伝子においても追加で解析を行い、予後や臨床的特徴との関連を検討した。

3. 研究の方法

(1)非小細胞肺癌における新規異常メチル化遺伝子の検索を図1のフローチャートで示すような流れで行った。

図1



まず初めにバイオインフォマティクスの手法により候補遺伝子のスクリーニングを行った。mRNA レベルでの遺伝子発現に着目し、NCBI のデータベースである Gene Expression Omnibus

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) にアクセスし、正常肺組織との比較がなされている肺癌組織及び肺がん細胞株の発現データを検索し、6つのデータセットを採用した。

- GDS1688 29 lung cancer cells
- GDS1650 20 adenocarcinomas vs. normal
- GDS1312 5 squamouscarcinomas vs. normal
- GSE7339 200 cases of lung cancer vs. normal
- GSE6044 10 ad, 10 sq, 5 normal
- GSE4824 77 lung cancer cells, NHBE, SBEC

これらの発現データに対して互いのデータを統合・比較可能にするために、Background calibration and normalization with Robust Multi Array (RMA) methods を施行。少なくとも1つのサンプルで発現が1/8以下に低下していて、かつ、どのサンプルでも8倍以上に過剰発現していない遺伝子を選択した。

次に、遺伝子機能に着目した。Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) にアクセスし、遺伝子機能として癌化や癌細胞の性質に関与しそうな以下の Gene Ontology のうち少なくとも1つを有する遺伝子を選択した。

- cell communication (GO:0007154)
- cell adhesion (GO:0007155)
- cell cycle (GO:0007049)
- cell cycle process (GO:0022402)

- cell motility (GO:0006928)
- cell proliferation (GO:0008283)
- cellular developmental process (GO:0048869)

この時点で 285 遺伝子に絞られた。これらの遺伝子の中には、既に非小細胞肺癌で異常メチル化があると報告されている、例えば p16 や DBC1 といった遺伝子も含まれており、ここまでのバイオインフォマティクスの手法の妥当性が示されていると考えられる。過去に我々が QAMA での解析に用いた既知の非小細胞肺癌での異常メチル化遺伝子に関しては、以降の新規メチル化遺伝子検索の対象からは外した。

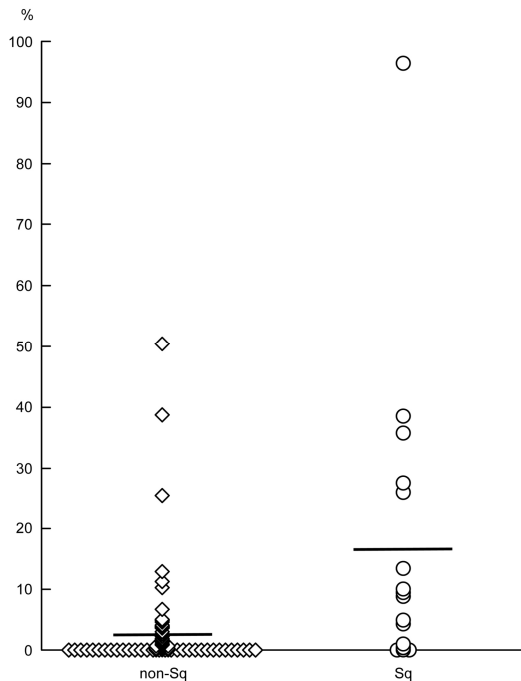
285 遺伝子の中で、遺伝子の 5' 側に CpG island を持つ遺伝子を抽出した。すると、224 遺伝子が 5' 側に CpG island を持っていた。さらに、後の COBRA と QAMA で用いる PCR primer の設計を行った。Primer を置く部位、置く条件に関しては、以前我々が報告したのと同様の手法で設計した。つまり、bisulfite 処理後もメチル化の有無に関わらず PCR がかかるように、Primer 配列内にはなるべく CpG が含まれないようにする、primer の 3' 端がなるべく bisulfite 処理で変換される塩基にする、amplicon が 100~250bp になるようにする、QAMA の probe 部位には少なくとも3つの CpG が入るようにする、probe の 5' 端が bisulfite 処理で変換される塩基がこないようにする、などの条件を満たすように設計を行った。今回はさらに、QAMA における probe 部位に COBRA の制限酵素部位が一致するという条件も満たすように設計を行った。これらの条件を満たし、かつ特異的に PCR がかかるように primer が設計できたのは、224 遺伝子中 173 遺伝子であった。

次に COBRA 法を用いて、さらに遺伝子を絞っていった。切除肺の癌部 10 サンプル分を合わせたものに対して COBRA 法を用いて、電気泳動上少しでもメチル化ありと出たものを選んだ。また同時に、切除肺の健常部 10 サンプル分を合わせたものに対しても COBRA を行い、正常肺で少しでもメチル化ありと出たものは候補から外した。この方法によって 12 遺伝子がメチル化遺伝子候補として選ばれた。

最後に、切除肺の癌組織 101 サンプルに対して、12 遺伝子で QAMA を行った。方法は以前我々が報告したのと同様の方法で行った。QAMA がうまくできなかったもの、QAMA でデータをとってみたらメチル化がほとんどなかった遺伝子を除き、最終的に 9 遺伝子 (ARPC1B, DNAH9, FLRT2, GOS2, IRS2, PKP1, PTEN, SPOCK1, UCHL1) が残った。PTEN は過去に NCSLC で異常メチル化ありの報告があったが、残りの 8 遺伝子に関しては、非小細胞肺癌での異常メチル化の報告はなかった。

(2)新たに同定した非小細胞肺癌で異常メチル化のある遺伝子において、実際の臨床切除検体 101 サンプルにおける定量的メチル化測定を行い、臨床情報との関連を検討したところ、GOS2 遺伝子のメチル化が非扁平上皮癌と比較して有意に扁平上皮癌において多いことが分かった。(図 2)

図 2



(3)p16 のメチル化と EGFR 変異の関係を 101 サンプルで調べたところ、有意な排他性が認められた。

4. 研究成果

(1)今回新たに非小細胞肺癌で異常メチル化があると分かった ARPC1B, GOS2, IRS2, UCHL1 の 4 遺伝子は非小細胞肺癌以外の癌での異常メチル化の報告が過去にあったが、DNAH9, FLRT2, PKP1, SPOCK1 の 4 遺伝子は癌自体での異常メチル化の報告が過去にはなかった。これらの遺伝子の異常メチル化が肺癌にどのような影響があるのかが今後明らかにされていけば、肺癌の新たな診断・治療の体系が構築されていく可能性があると考えられる。

(2) GOS2 遺伝子のメチル化が非扁平上皮癌と比較して有意に扁平上皮癌において多いことが今回分かった。例えば、分化度の非常に低い扁平上皮癌もしくは腺癌などの鑑別に代表されるように、従来の病理学的な手法による肺癌組織型の診断には限界も存在する。今回の知見は、そういった症例に対する扁平上皮癌か否かの診断に対する非常に有用な補助になり得るのではないかと考えられる。

(3)以前から報告のあった p16 のメチル化と EGFR 変異の排他性が、我々のデータでも示された。複数の遺伝子を組み合わせて行ったクラスタリングの解析では、メチル化と EGFR 遺伝子の変異には有意な関連が見出せなかったが、単一遺伝子の p16 では関連が認められた。p16 のメチル化が単独でも肺癌の癌化に与える影響が大きいことが示されたと考えられる。

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 1 件)

Sano A, Kage H, Sugimoto K, Kitagawa H, Aki N, Goto A, Fukayama M, Nakajima J, Takamoto S, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. A second-generation profiling system for quantitative methylation analysis of multiple gene promoters: application to lung cancer. *Oncogene*. 2007 Oct 4;26(45):6518-25. Epub 2007 Apr 23. (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

Kusakabe M, Kutomi T, Aki N, Kage H, Sano A, Hamano E, Kitagawa H, Murakawa T, Nakajima J, Takamoto S, Ohishi N, Nagase T, Ohta S, Fukayama M, Yatomi Y, Takai D. Novel approach to identify aberrantly methylated genes in non-small cell lung cancer and methylation of GOS2 as possible biomarker of squamous lung cancer. *American Association for Cancer Research Cancer Epigenetics*. 2008/5/28-31, Boston, MA, USA.

Sano A, Kage H, Sugimoto K, Kitagawa H, Aki N, Goto A, Fukayama M, Nakajima J, Takamoto S, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. Distinction between double primary lung cancer and intrapulmonary metastasis using a system for profiling the DNA methylation status of multiple gene promoters. *American Association for Cancer Research Annual Meeting 2007*. 2007/4/14-18, Boston, MA, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

村川 知弘（MURAKAWA TOMOHIRO）
東京大学・医学部附属病院・助教
研究番号：50359626

(2)研究分担者

中島 淳（NAKAJIMA JUN）
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究番号：90188954

深見 武史（FUKAMI TAKESHI）
東京大学・医学部附属病院・助教
研究番号：40396742

高井 大哉（TAKAI DAIYA）
東京大学・医学部附属病院・講師
研究番号：90361493

(3)連携研究者