

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790971
 研究課題名 (和文) ヒト食道癌における所属リンパ節での癌関連遺伝子メチル化の解析
 研究課題名 (英文) Promoter hypermethylation of resected regional lymph nodes of esophageal squamous cell carcinoma.

研究代表者

那須 元美 (NASU MOTOMI)
 順天堂大学・医学部・助教
 研究者番号：90384114

研究成果の概要 (和文)：腫瘍関連遺伝子メチル化の検索にあたり、超常磁性シリカビーズを用いて DNA を吸着し、同一チューブ内で全処理を行い、量子ドットを用いた定量的な測定を行う新たな手法を導入した。これにより DNA 量の少ない検体での安定した検出が可能となった。食道扁平上皮癌の手術標本から腫瘍と正常組織、切除全リンパ節での 4 つの腫瘍関連遺伝子のメチル化率を検討したが、今回の症例数では統計学的に有意な結果は得られなかった。

研究成果の概要 (英文)： To detect DNA promoter methylation, we introduce two new techniques as; entire process performed in a single tube via the use of silica superparamagnetic beads, and real-time quantitative fluorescence resonance energy transfer sensing with quantum dots. These technique successfully increased detection throughput. However, there are no statistically significant correlation between molecular properties of tumors, normal control tissue, metastasis on lymph nodes and normal lymph nodes from resected esophageal squamous cell carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
年度			
総計	700,000	210,000	910,000

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：食道癌、メチル化、リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

遺伝子のメチル化は、CpG 塩基対における 5' Cytosine のメチル化が転写プロモーター領域に起こることで、遺伝子発現が調節され、

腫瘍関連遺伝子においても様々な癌腫で検討され、臨床的特徴や予後との相関が指摘されて来た。食道癌では、癌抑制遺伝子などのメチル化が癌発生に大きく関与し、病変のみ

ならず周囲の組織学的非腫瘍部においても観察されている。一方、肺癌などにおいて病理学的にはリンパ節転移を認めない症例の中にも、既にリンパ節で腫瘍関連遺伝子のメチル化が起こっている症例があり、予後不良であることが、明らかになってきた。しかし、食道癌のリンパ節におけるメチル化については、これまでほとんど検討されておらず、広範囲な所属リンパ節の中での転移の経路や、原発巣との関連について分子生物学的な検討によって、新たな知見が得られる事が期待された。

2. 研究の目的

食道扁平上皮癌の腫瘍関連遺伝子のメチル化の有無と病理学的、臨床的特徴の相関、および郭清リンパ節におけるメチル化の検索から転移の進展様式を分子生物学的に検討する。

3. 研究の方法

1998年から2006年までに当院において食道切除術を施行された食道扁平上皮癌症例のうち、予後追跡可能な症例から以下の症例を選択した。

(1) リンパ節転移に関与する腫瘍関連遺伝子のメチル化を検索するため、高度のリンパ節転移を認めた症例、主病巣の深達度に対して比較的転移が少なかった症例など15例を選択した。対象腫瘍関連遺伝子としてP16、human Caspase-activated DNase (HCAD)、adenomatous polyposis coli (APC)、Ras association domain family 1A (RASSF1A) を選択した。

(2) 複雑なリンパ流を持つとされる食道癌において、リンパ節転移の進展形式を分子生物学的に検索する事を目的に、頸、胸、腹3領域リンパ節郭清を行った症例（切除リンパ節数平均135個）のうち、一つのリンパ節の

みに転移を認めた4症例について、全てのリンパ節での上記腫瘍関連遺伝子のメチル化を検索した。

4. 研究成果

パラフィン包埋スライドからDNAの抽出を行い、従来広く行われ、当科においても過去に食道腺癌症例等で用いて来たMethylation specific PCR (MSP) 法を用いて検索を行ったが、有効な反応が得られない症例を多数認めた。

MSPでは、サンプルの経時的変化やDNA量の不足等により再現性に乏しい場合が見られ、また定量的な解析は行うことができないという欠点が指摘されている。このため本研究のサンプルにおいても、新たな解析手法の改良が必要と考えられ、Johns Hopkins大学 Dr. Malcolm Blockらの協力を得て、2つの新たな手法を導入した。これらの基礎実験の一部には同大の施設を使用した。

(1) DNAの抽出に関しては超常磁性シリカビーズ (Silica Superparamagnetic Beads; SSBs) を用いたMethylation on beads (MOB) を行った。この手法はDNAのキャリアとしてSSBsを用いる事で、これまで独立したステップであったDNAの抽出、bisulfite反応、PCRを一つのチューブ内で一連の行程として行うことができる、という特徴がある。SSBsの大きな表面積によりDNAをより多く結合することができ、またチューブの移し替えがないことでDNAの変性、脱アミノ化等の過程での損失が少なく、その結果予備実験においては、従来の方法と比較し平均6.6倍のDNAを抽出することができるという、優れた成績であった。

また、全行程に要する時間は約9時間と従来のMSPの半分以下であり、多数の症例の検討に適していると考えられた。

(2) メチル化の測定に関してはquantum dot s(量子ドット: QDs)を用いたQD-fluorescence resonance energy transfer(FRET) Sensingを行った。蛍光抗体を用いたMSPは、リアルタイムに定量的な解析が行えるという利点から各施設で検討されてきたが、QDsを用いる事で、更に以下の様な利点が認められた。

- ① サイズの違いによる蛍光波長の違いを利用するため、光学的に安定で退色が遅く長時間の観察が可能である。
- ② 光が明るく微量のDNAでも感度の向上が期待できる。
- ③ 波長の重なりが少なく観察が容易である。

これらの改良を加えた新たな実験系を、(1)(2)の2つの検討に応用した。

(1) 食道扁平上皮癌組織と、同症例の非腫瘍部食道粘膜(正常)における4つの腫瘍関連遺伝子のメチル化の発現率を下表1に示す。

表1

遺伝子	P16	HCAD	APC	RASSF1A
正常	52%	82%	6%	40%
腫瘍	66%	91%	0%	18%

正常部と腫瘍部でのメチル化率に有意差を認めず、個々の症例においても各遺伝子の発現パターンと深達度、リンパ節転移個数等との有為な相関は指摘できなかった。

(2)

1個のリンパ節転移のみ認めた4症例において、正常部と腫瘍部、転移陽性リンパ節(LN+)、それ以外のリンパ節(LN-)での各遺伝子のメチル化率(%)を下表2に示す。

転移陽性リンパ節は、必ずしも腫瘍と同一の

メチル化発現パターンを示さなかった。転移陰性リンパ節では、HCADとAPCでは(1)で示した正常組織のメチル化率に類似したが、P16とRASSF1Aではばらつきが見られた。しかし、症例数が少なく、統計学的に有意差を示す事は困難であった。

表2

遺伝子		P16	HCAD	APC	RASSF1A
症例1	正常	-	+	-	+
	腫瘍	-	-	-	-
	LN+	-	+	-	-
	LN-	20	79	0	4
症例2	正常	+	+	-	+
	腫瘍	+	+	-	+
	LN+	+	+	-	-
	LN-	82	100	2	35
症例3	正常	-	+	-	-
	腫瘍	-	+	-	-
	LN+	+	+	-	-
	LN-	41	92	3	13
症例4	正常	-	+	-	-
	腫瘍	-	+	-	-
	LN+	-	+	-	-
	LN-	8	95	0	14

新たな実験手法を導入する事で、これまで安定した結果を得る事が困難であった5年以上前のパラフィン包埋ブロックを用いたメチル化の検討が可能となった。この結果を踏まえ、更に症例数を増やした検討を追加中であり、食道癌リンパ節転移の進展様式や、腫瘍関連遺伝子メチル化と臨床像との関連を検討したい。

また、SSBsを用いたMOBとQDs-FRETは微量の検体から短時間でのメチル化の検出を可能にし、血清や生検検体を用いた解析など、

臨床応用の可能性が高く有用であると考えられた。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須 元美 (NASU MOTOMI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90384114

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし