

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659231

研究課題名（和文）

OS-MSP法を用いた乳がん診療の効率化と個別化

研究課題名（英文）

Optimization and individualization of breast cancer treatment using OS-MSP.

研究代表者

中山 貴寛 (NAKAYAMA TAKAHIRO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30527700

研究成果の概要（和文）：

- OS-MSP法を用いた血清中の遺伝子のメチル化を高感度で検出する系を確立した。
- 術前化学療法の効果予測因子としての有用性を示唆する結果が得られた。
- 血清中の遺伝子のメチル化およびDNA量が予後予測に有用である可能性が示唆された（投稿中）。

研究成果の概要（英文）：

- OS-MSP, which can detect DNA methylation in serum sensitively, has been established.
- This method would be useful to predict the efficacy of neoadjuvant chemotherapy.
- DNA methylation and the amount of DNA from cancer in serum would be useful prognostic marker (submitted).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	360,000	2,860,000

研究分野：乳がん

科研費の分科・細目：医歯薬学・外科系臨床医学・外科一般

キーワード：

メチル化・GSTP1・RASSF1A・FARβ2・14-3-3δ・個別化・治療効果予測

1. 研究開始当初の背景

遺伝子のメチル化は、遺伝子の発現に関与しており、メチル化による遺伝子の不活化が発がんの

メカニズムのひとつと考えられている。一方、固形がんでは相当量の腫瘍由来のDNAが血中に放出されている。近年、腫瘍由来の血液中のがん遺伝

子のメチル化プロファイルやDNA量を検討することにより、乳がんの診断・治療におけるバイオマーカーとしての有用性が報告されるようになってきた。

Methylation Specific PCR (MSP) 法は、メチル化された遺伝子の特異的に検出することのできる手法である。最近、様々な検体の遺伝子のメチル化が定量できるようになり、それに伴い遺伝子のメチル化が乳がんの治療効果予測や予後予測のマーカーとして有用であるとの報告されている。

これまでメチル化プロファイル解析に用いられてきた MSP (Methylation Specific PCR) 法は、全工程に2日間かかるため、臨床検査として用いることは困難であった。そこで我々は、簡便で高感度なメチル化解析法である OS-MSP (One Step-MSP) 法を開発した。この方法は、臨床サンプルのバイサルファイト処理におけるサンプル処理を簡略化することにより、DNAの喪失を減らすことができ、メチル化検出感度を上昇させることができるため、微量なDNAのメチル化プロファイルの検討に有用である。また、診断までの時間短縮が可能であり実臨床へ応用も期待される。

2. 研究の目的

我々が開発した OS-MSP 法により、様々な検体のメチル化DNAの定量が短時間でできるようになった。本研究では、乳がんとの関連性が報告されている、代表的メチル化マーカー (GSTP1、RASSF1A、RAR β 2、14-3-3- σ) を用い、ホルマリン固定・パラフィン包埋後の乳がん腫瘍組織 (FFPE) や新鮮凍結後の乳がん腫瘍組織における各マーカーのメチル化DNAや、血清中に微量に存在するがん由来DNA中のメチル化DNAを検出し、メチル化DNAの割合 (メチル化率) と臨床病理学的因子とを比較検討することにより、各々のマーカーの臨床的意義 (予後予測因子や効果予測因子としての有用性、乳がんの罹患リスク診断や早期診断や早期再発診断のためのマーカーとしての有用性) を考察する。

3. 研究の方法

(1) 手術目的で入院された患者に対し、同意を取得の後、手術時に全血5mlと摘出標本より5mm角程度の腫瘍を採取し本研究に使用する。手術時の血清中DNAと腫瘍組織におけるメチル化プロファイルの相関を検討する。さらに、血清中存在するメチル化DNAが腫瘍組織由来であることを確認するために、術後約1週間目にも全血5mlを採取し、手術時に検出されたメチル化DNAが減少または消失していることを確認する。

(2) 治療法変更の目的で入院した再発患者に対し、同意を取得の後、全血5mlを採取する。

(3) 本研究のための採血は、日常臨床において必要な検査時または、静注化学療法などの治療を行う際に同時に採取することとし、本研究のためだけの採血は行わない。

(4) 早期乳がん患者から再発乳がんまでを対象とし、OS-MSP法を用いて、血清中DNAのメチル化プロファイルおよびその陽性率を検討する。病期の進行と血清中DNAのメチル化やその陽性率との相関を確認し、OS-MSP法を用いた血清中メチル化DNAの検出が、乳がんの罹患リスク診断や早期診断、治療効果の判定や再発の早期診断に有用であるか否かを検討する。

(5) 本研究に使用したメチル化マーカーはGSTP1、RASSF1A、RAR β 2、14-3-3- σ である。

(6) 必要に応じて、それぞれのマーカーに対応するタンパクの発現やそれに関連するタンパクの発現について、免疫組織学的検討も追加する。

4. 研究成果

(1) 早期乳がんにおいて、OS-MSP法を用いて手術時の血清中DNAと腫瘍組織におけるメチル化プロファイルの相関を検討した結果、高い相関性を示した。さらに、血清中存在するメチル化DNAが腫瘍組織由来であることを確認するために、手術時と手術後約1週間の血清中のメチル化DNAの陽性率を比較したところ、明らかな低下がみられた。このことより、手術時に検出されたメチル化DNA

は腫瘍組織由来である可能性が高いことが示唆された。

(2) 早期乳がん、転移再発乳がんの血清中の遺伝子のメチル化陽性率 (3つのうちいずれかのマーカーにおいてメチル化が検出された場合を陽性と定義) は、Stage I/II/III/IVでそれぞれ、24%、26%、18%、55%であり、現在、臨床に用いられている腫瘍マーカー (CEA, CA15-3のいずれかが上昇している場合を陽性と判断する) よりも、Stage I/IIにおいて高い陽性率を示した (Stage I : 24% vs 8%, Stage II : 26% vs 8%)。また、Stage III/IV乳がんでは腫瘍マーカーと同等の陽性率を示した (Stage III : 18% vs 19%, Stage IV : 55% vs 59%)。さらに、転移再発乳がんでは、腫瘍マーカーと併用することにより、78%の陽性率が示された。

以上の結果より、3つのメチル化マーカーは、Stage I/IIの早期乳がんにおいて、従来の腫瘍マーカーより高感度であり、乳がんの早期診断や再発リスクの予測ツールとしての有用性が示唆される。また、転移再発乳がんでは、従来の腫瘍マーカーと併用することにより、再発の早期診断が可能になる。これまで、ほとんどの転移再発乳がんが治癒不可能とされていたが、転移再発の早期診断により、一部の転移再発乳がんの治癒が可能になるかもしれない。

(3) 早期乳がんを対象に、上記3マーカー以外に、DNA損傷によりp53によって誘導される14-3-3 δ (がん抑制遺伝子) の発現と術前化学療法 (P-FEC : タキソール-FEC) に対する感受性を検討した。123例の早期乳がんを対象に、治療前に採取した腫瘍組織において、14-3-3 δ とp53の発現およびTP53の遺伝子変異の有無について検討した。その結果、14-3-3 δ の発現は38例 (31%) にみられたが、14-3-3 δ の発現とp53の発現およびTP53の遺伝子変異との間に関連性は認められなかった。しかし、14-3-3 δ の発現とpCR (組織学的完全消失) 率との有意な逆相関を示した ($p=0.009$)。また、多変量解析の結果、14-3-3 δ の発現はエストロゲンレセプターの発現とともに、P-FEC化学療法の抵抗性を予測する独立した因子であることが示された。

(4) GSTP1の発現と術前化学療法 (P-FEC) に対する感受性を検討した。また、GSTP1の発現やGSTP1のメチル化率とDNAマイクロアレイによるIntrinsic subtypeとの関連についても検討した。その結果、ER陰性乳がんに対してP-FECによる術前化学療法を行った場合、GSTP1陰性乳がんは陽性乳がんより有意に高いpCR率を示した (80% vs 30.6%)。また、多変量解析により、GSTP1陽性はER陰性乳がんに対してP-FECを行った場合の治療抵抗性を予測する唯一の独立した因子であることが示された。GSTP1の発現はP-FECに対する有用な効果予測因子となる可能性が示唆された。

また、Luminal A、Luminal B、HER-2 タイプ乳がんは、Basalタイプ乳がんと比較して、GSTP1の発現率は有意に低く、GSTP1のメチル化率は有意に高いことが判明した。GSTP1のメチル化がLuminal A、Luminal B、HER-2 タイプ乳がんの発生において重要な意味を持つ可能性が示唆された。

(5) 早期乳がんの血清中の遺伝子のメチル化陽性率および、血清中に存在するDNA量と乳がんの予後について検討した。その結果、血清中の遺伝子のメチル化およびDNA量が予後予測に有用である可能性が示唆された (投稿中)。

(6) 以上の結果より、OS-MSP法による種々の検体におけるメチル化DNAの検出は可能であることが確認された。また、血清中に存在するメチル化DNAは、腫瘍組織由来であり、腫瘍マーカーとしての有用性も示唆される結果であった。今後、前向きな検討でそれらの有用性を検証することにより、臨床応用が可能になると思われる。これによって、乳がんのリスク診断や早期診断や治療モニタリング、治療効果予測、乳がん再発の早期診断などが可能になり、乳がん診療の個別化に大きく寄与すると思われる。

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3件)

- ① Yamamoto N, Nakayama T et. al. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RARβ2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay. Breast Cancer Res Treat. 査読有 132(1) 2012 165-73.
- ② Nakamura Y, Nakayama T et. al. 14-3-3σ expression is associated with poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in human breast cancers. Breast Cancer Res Treat. 査読有 Feb.8 2012 Epub ahead of print
- ③ Miyake T, Nakayama T et. al. GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer. Cancer Sci. 査読有 Feb 9 2012 Epub ahead of print

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 貴寛 (NAKAYAMA TAKAHIRO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：30527700

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：