

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590666

研究課題名(和文)がん転移モデルとしての悪性褐色細胞腫の解析

研究課題名(英文)Omics-based analysis in malignant pheochromocytoma and paraganglioma.

研究代表者

飯野 和美 (IINO, KAZUMI)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90402263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性褐色細胞腫例について、同一症例内での原発巣と転移巣を用いた全ゲノムメチル化解析を行い、その結果から悪性化関連候補CpG領域28か所を決定した。さらに、全ゲノムメチル化解析、メチル化依存的制限酵素を用いた定量PCR、パイサルファイト処理後のダイレクトシーケンズの3つの解析方法を用い、良性悪性腫瘍間でメチル化を比較定量し、癌化に伴うエピゲノミックな変化が疑われる3つのCpG領域を絞り込んだ。候補CpG領域の下流には既知の蛋白としてACSBG1およびMAST1が確認され、同蛋白の発現が悪性化に伴い腫瘍内で変化する可能性が示唆された。これらについてさらに腫瘍内発現を検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：We investigated methylation of malignant pheochromocytoma (PCC) and paraganglioma (PGL) tumors. We performed Infinium HumanMethylation450 Bead Chip array, which covers 485,577 CpG sites using DNA samples extracted from resected PCC/PGL tissues. From the results of the Bead Chip array, we selected 12 CpG sites as hypermethylated and 16 CpG sites as hypomethylated candidates. Successively performed semiquantitative methylation-PCR revealed that, of the 28, three CpG sites were selected as possible epigenomic contributors to canceration of PCC/PGL. (one hypermethylated (cg02119938) and two hypomethylated sites (cg16918905, cg26870725).) The cg02119938 is related to ACSBG1 (acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1) gene, and cg26870725 is related to the MAST1 (microtubule associated serine-threonine kinase 1) gene. We showed here three possible CpG sites, in which aberrant promoter methylation/demethylation might be involved in silencing/expressing of cancer-related genes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学 病態検査学

キーワード：褐色細胞腫 パラグングリオーマ メチル化解析

1. 研究開始当初の背景

近年がん診断技術の向上により、がんの早期診断が可能になっているが、転移を伴う進行がんの治療成績は治療法の進歩をもってしても不十分な現状がある。がん転移メカニズムについても複雑なプロセスと多種多様な因子が関与して形成されることからいまだに解明されていない点も多い。

悪性褐色細胞腫は腫瘍の転移をもって診断され、腫瘍病期分類におけるないし期の状態で初めて<悪性>とされる特異な疾患である。また、その臨床像から(1)最初から転移巣を認める例(2)手術時は良性と考えられていたが数年(5年以上の例も多い)を経て転移が確認される例、の2タイプにわけられ、後者は局所の再発を伴わずに、10年以上の長い年月を経て転移病変が見られることがあるのが特徴である。後者は、同一腫瘍内で時間経過を追って発現量が変化する悪性形質関連遺伝子/蛋白の存在が示唆される極めて特徴的で他腫瘍にない臨床経過を呈する疾患であり、がん転移メカニズムの分子生物学的研究に適した疾患と考えられる。

2. 研究の目的

上記のような背景をふまえ、本研究では悪性褐色細胞腫が他の癌腫のように多段階発癌の過程を経て悪性化すると仮説をたて、悪性形質が発現するかどうかを左右する抑制因子の存在を考えた。摘出腫瘍組織の網羅オミックス解析により、本症の悪性化診断マーカーとなりうる癌抑制蛋白ないし癌抑制遺伝子を同定し、本症の診断・予後予測・悪性化阻止など臨床検査に応用することを本研究の目的としている。

また、本症にとどまらず、固形腫瘍一般の潜在的がん転移能力のもつ意味やそれが顕性化するメカニズムの解明も同時に期待され、その早期診断法の確立も目的としている。さらに癌抑制遺伝子・タンパクに注目すると固形がんにおける《将来の悪性化・転移の予防》という新しい治療の可能性について新しい情報をえることも目的としている。

3. 研究の方法

Genome Epigenome の二つの方法でアプローチを行った。すなわち

悪性褐色細胞腫同一症例内での原発巣および長期間を経て発症した転移巣組織を用いた全ゲノムメチル化解析の結果を比較し、転移・癌性質獲得に有意なメチル化の変化が示唆される CpG 領域を絞り込む。さらに候補 CpG 領域についてメチル化の定量的評価を行い、その下流に存在する悪性化抑制遺伝子や関連蛋白を同定する。

上記の転移巣・原発巣のペア組織を用い、エクソームシーケンズで転移形質獲得に伴う遺伝子異常の変化の有無を検討する。

(図1) の二方向からの解析である。

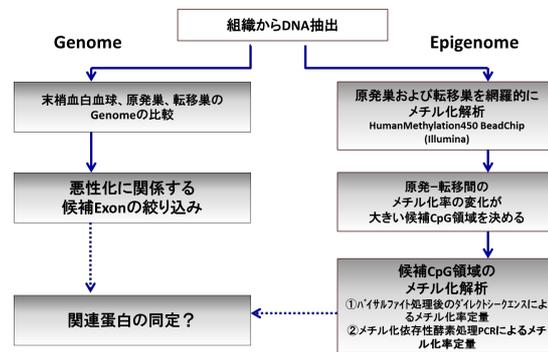


図1 研究の方法

(1) DNA サンプル抽出

1991年～2012年の間に浜松医科大学附属病医院および関連病院(聖隷浜松病院、浜松医療センター)にて手術治療を受けた褐色細胞腫・パラガングリオーマ患者17例を、転移を確認した悪性群 n=7、12年以上転移がない良性群 n=10の2群にわけて検討した。各々の腫瘍組織(ホルマリン固定パラフィンブロック組織および凍結組織)からDNAを抽出した。

また、悪性例のうち、初回手術時には転移を認めず、7年以上の経過で新たに転移を生じ悪性褐色細胞腫の診断に至った2例(case1 Case2 図2)については、原発巣、転移巣組織各々からDNAを抽出し、全ゲノムメチル化解析のサンプルとした。

Case 2	58才 (→ 7年 →)	65才 →	66才
	右副腎pheo手術	CA値上昇	リンパ転移 死亡
Case 4	12才 (→ 11年 →)	23才	28才
	膀胱pheo手術	検診で肋骨腫瘍を指摘	肋骨、肺、胸骨転移 生存

図2 case1, case2 の臨床経過

(2) 全ゲノムメチル化解析

Infinium HumanMethylation450 BeadChip array (Illumina, USA) を用いて、485,000箇所 の methylation sites を1塩基レベルでスクリーニングした。(96%の CpG 領域に加え、CpG 以外の領域も網羅されている) 解析結果は GenomeStudio Methylation Module Software (Illumina)によってネガティブコントロールとの比較表示で示された。メチル化レベルはβ値(0が完全非メチル化、1が完全メチル化)であらわされる。

(3) メチル化定量

絞り込まれた CpG につき下記の二つの方法で定量化を行った。

メチル化依存的制限酵素を用いたメチル化定量

メチル化依存的制限酵素 MspJI (mCmNR を認識) FspEI (CmC を認識) を用いて1μgのゲノムDNAを酵素処理後、ターゲット領域を囲んでPCR増幅を行う。酵素処理前後のPCR産物を、ATTO CS Analyzer (アトー株

株式会社、日本) によって数値化し、比較した。
 バイサルファイト処理 PCR 産物のダイレクトシーケンスによる解析
 5μg のゲノム DNA をバイサルファイト処理し PCR で増幅、精製後、Applied Biosystems 3500xL (Applied Biosystems, USA) でシーケンスを解析し、メチル化のレベルを定量した。

(4) アンプリコンシーケンス

case2 1 症例 3 サンプル(悪性腫瘍 1 例 : 原発巣 転移巣 末梢血リンパ球) より得られた genomic DNA について当初全ゲノムエクソンシーケンスを計画していたが、10 年以上経過したパラフィンブロックからは数百 bp の DNA 片しか得られなかったため全ゲノムエクソン解析は断念し Cancer Panel を用いたアンプリコンシーケンスを行い Genome の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 全ゲノムメチル化解析

case1, case2, の原発巣と転移巣のメチル化レベルを比較した結果、有意なメチル化レベルの変化があるものを絞り込んだ。候補 CpG 領域として、転移巣にメチル化が疑われるもの 12 か所、脱メチル化が疑われるもの 16 か所を決定した。(図 3)

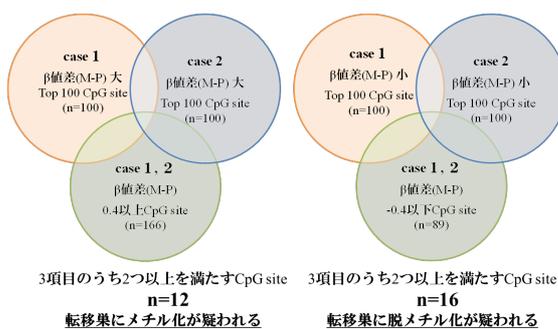


図3 転移巣(M)と原発巣(P)にメチル化の変化が疑われるCpG site

この候補 CpG 領域 28 ヶ所につき 同様に全ゲノム解析をした良性例 3 例のメチル化レベルを確認し、悪性褐色細胞腫の原発巣と同じ傾向になる(悪性転化前原発巣と良性群に同じメチル化傾向がみられる) CpG 領域を選択し(図 4) 悪性化に伴うメチル化部位 4 か所、脱メチル化部位 5 か所を次の個別化メチル化解析に進めた。

(2) メチル化定量

悪性化に伴うメチル化候補 CpG 4 か所、脱メチル化 CpG 5 か所を 表 1 に示す。各解析方法で 17 例の腫瘍につきメチル化定量を行った。その結果現在 PTMR で解析が終了した 6CpG のうち 1 つのメチル化 CpG (cg02119938) と 2 つの脱メチル化 CpG (cg16918905, cg26870725) が候補 CpG と考えられた。

そのうち cg02119938 は ACSBG1 (acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1) を

図4 Methylation level of the candidate CpG islands in three benign pheochromocytomas

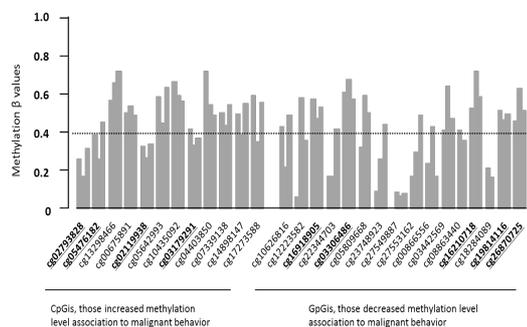


Table 1. Candidate CpG sites of hyper/hypomethylation in malignant pheochromocytoma and paraganglioma.

TargetID	Gene	Benign tumor	CHR	Relation to CpG Island	Method
M1	cg02793828	U	16	N_Shore	Bisulfite
M2	cg05476182	U	5		PTMR(MspII)
M5	cg02119938	U	15		PTMR(FspEI)
M8	cg03179291	U	17	N_Shore	PTMR(MspII)
DM3	cg16918905	M	2	Island	PTMR(MspII)
DM5	cg03306486	M	19	Island	Bisulfite
DM13	cg16210718	M	22	Island	PTMR(MspII)
DM15	cg19814116	M	1	Island	Bisulfite
DM16	cg26870725	M	19	S_Shore	PTMR(MspII)

PTMR: PCR following treatment with a methylation-dependent restriction enzyme
 Bisulfite: Direct sequence following Bisulfite Modification
 CHR: Chromosome
 U: Unmethylated, M: Methylated
 PHE15: PHD finger protein 15
 ACSBG1: Acyl-CoA Synthetase, Bubblegum Family, member 1
 CAMKK1: Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Family, member 1
 APC2: Adenomatous Polyposis Coli 2
 GPIIB: Platelet glycoprotein 1b Beta Chain
 KCNAB2: Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2
 MAST1: Microtubule associated serine-threonine kinase 1

コードする遺伝子を、また cg26870725 は MAST1 (microtubule associated serine-threonine kinase 1) をコードする遺伝子を下流に持っており、これらはエピゲノミックな変化に伴い転写の変化が生じる癌抑制・促進遺伝子としての側面を持っている可能性が示唆された。同蛋白の発現が腫瘍内で変化する可能性が示唆され、今後、これらの蛋白について免疫染色を用いて発現を検討する予定である。

(3) エクソームシーケンス

Cancer Panel を用いたアンプリコンシーケンスを case2 のサンプルで行った。現在検査結果を解析中である。パラフィンから抽出した DNA の質の問題で解析可能な遺伝子については限られている。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

T Oishi, K Iino, Y Okawa, K Kakizawa, S Shibata, M Yamashita, T Taniguchi, M Maekawa, Y Oki,

DNA methylation analysis in malignant pheochromocytoma and paraganglioma.

第4回国際褐色細胞腫・パラングリオーマシンポジウム

2014年9月17日~20日

京都 発表予定

飯野和美

褐色細胞腫：臨床で遭遇する問題点を
考える

第 26 回 東北副腎研究会

平成 26 年 2 月 1 日 仙台

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

飯野 和美 (IINO, Kazumi)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号： 90402263

(2) 研究分担者

前川 真人 (MAEKAWA, Masato)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号： 20190291

沖 隆 (OKI, Yutaka)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号： 20169204