

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23650616
研究課題名（和文）リアルタイム仮想分子生物学による食道癌の内視鏡分子イメージング診断法の開発
研究課題名（英文）Development of endoscopic molecular imaging diagnostic procedure for esophageal cancer using real-time virtual molecular biology
研究代表者
山本 博幸（YAMAMOTO HIROYUKI）
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：40332910

研究成果の概要（和文）：食道扁平上皮癌における新規の異常メチル化遺伝子を同定・解析することおよびゲノムワイドな低メチル化の役割を明らかにすることを目的とした。ゲノムワイドな CpG アイランドメチル化は、正常粘膜、食道癌非癌部粘膜、食道癌の順で増加した。食道扁平上皮癌において腫瘍関連遺伝子、とくに LRFN5 遺伝子の CpG アイランド過剰メチル化とともにゲノムワイドな低メチル化は、飲酒、喫煙習慣に関係なく、重要な役割をもつ事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to profile methylation changes and identify methylated genes and to clarify the role of genome-wide hypomethylation in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). The degree of genome-wide CpG islands methylation increased from the normal healthy epithelium, through the ESCC-background non-neoplastic epithelium, to the carcinoma tissues. CpG island hypermethylation of tumor-related genes, especially that of the LRFN5 gene, and genome-wide hypomethylation appear to play important roles in ESCC pathogenesis irrespective of drinking and/or smoking habits.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：食道扁平上皮癌、DNA メチル化、microRNA、背景粘膜、粘膜内癌

## 1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌（以下、食道癌）は世界において6番目に死亡者数が多い癌である。罹患率と死亡率がほぼ等しいという予後不良

な疾患である。欧米では、近年食道腺癌が急激に増加しているが、アジア諸国では食道扁平上皮癌がその大半を占める。飲酒や喫煙は食道扁平上皮癌発生の危険因子とされてい

る。

食道癌の発癌・進展には、様々なジェネティック、エピジェネティックな異常が関連していると言われている。中でも、癌抑制遺伝子の CpG アイランド過剰メチル化による不活化は発癌の早期から関わっていると言われ、これまでに種々の遺伝子の過剰メチル化が報告されている。癌抑制遺伝子の CpG アイランド過剰メチル化とともに、反復配列を中心とするゲノムワイドな低メチル化が、癌におけるエピジェネティックな異常の特徴であるとされる。ゲノムワイドな低メチル化の指標として、long interspersed nuclear element-1 (*LINE-1*) 反復配列のメチル化などが報告されている。これらのエピジェネティックな異常を解析することは、将来的に臨床における新規診断マーカーおよび新規治療薬の開発に結び付く可能性がある。

## 2. 研究の目的

食道癌における新規の異常メチル化遺伝子を同定・解析すること、およびゲノムワイドな低メチル化の役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 網羅的な CpG アイランドメチル化の解析および対象遺伝子の抽出

Methylated CpG island amplification (MCAM) 法により食道癌および隣接非癌部粘膜、正常粘膜におけるゲノムワイドな CpG アイランドのメチル化変化を解析した。また、腫瘍特異的なメチル化遺伝子の絞り込みを行い、候補遺伝子を抽出した。その中で、これまで報告がない遺伝子を検索し、食道癌細胞株を用いて methylation specific PCR (MSP) にて、メチル化状態を解析した。

(2) 対象遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析及び発現解析方法

①バイサルファイトシーケンス (BS) 法

常法に従い、対象遺伝子のプロモーターの CpG 領域のメチル化を解析した。

②メチル化特異的 PCR (MSP)

バイサルファイトシーケンス法の結果を基に、メチル化または非メチル化アレルに特異的な MSP プライマーを設計し、常法により対象遺伝子のプロモーターの CpG 領域のメチル化を解析した。

③半定量的およびリアルタイム RT-PCR

常法に従い、対象遺伝子の発現を解析した。

④DNA 脱メチル化剤等による再発現実験

DNA メチル化酵素阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である trichostatin A (TSA) で食道癌細胞株を処理後、LRFN5 の発現を real-time PCR 法で解析した。

⑤免疫組織染色

常法に従い、LRFN5 の発現を解析した。

(3) ゲノムワイドなメチル化解析

Pyrosequencing 法を用いて、食道癌手術患者の癌部、非癌部の *LINE-1* のメチル化レベルを測定し、臨床病理学的因子との相関につき解析を行った。また、(1) で検索した対象遺伝子との相関についても解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) CpG アイランドメチル化プロファイル及び新規メチル化遺伝子の抽出

癌部の過剰メチル化が高頻度に認められた。また、非癌部において既に中等度のメチル化が認められた。また、癌における新規メチル化遺伝子として (Leucine-rich repeat and fibronectin typeIII domain-containing

protein 5 (LRFN5) を同定した。

## (2) メチル化解析と発現解析

### ①食道癌細胞株における LRFN5 mRNA 発現の低下

多くの食道癌細胞株における LRFN5 発現は、正常食道粘膜より低下していた。

### ②食道癌細胞株における LRFN5 遺伝子プロモーターの過剰メチル化

LRFN5 mRNA 発現が低下している食道扁平上皮癌細胞株において、BS 法および MSP 法により、LRFN5 遺伝子プロモーター CpG 領域の過剰メチル化を認めた。一方で、LRFN5 mRNA が高発現している TE15 細胞株では、MSP 法にて同領域の非メチル化を認めた。LRFN5 遺伝子プロモーター CpG 領域の過剰メチル化と LRFN5 発現低下との相関性を明らかにした。

### ③食道癌細胞株の脱メチル化剤等処理による LRFN5 再発現

LRFN5 発現の低下が認められた食道扁平上皮癌細胞株 (TE1、TE8、T.T) を用いて、5-aza-dC 処理、TSA 処理を行ったところ、前者において LRFN5 mRNA の再発現が認められた。

### ④食道癌組織における LRFN5 の過剰メチル化および mRNA 発現の低下

MSP 法にて、癌部 32 例中 25 例 (78%) でメチル化を認めた。癌部に比べてメチル化の程度は低い非癌部 32 例中 13 例 (41%) でメチル化を認めた。半定量的 RT-PCR にて、検討した癌部 15 例中 10 例 (67%) で LRFN5 の mRNA レベルでの発現低下を認めた。

### ⑤食道癌組織における免疫組織学的 LRFN5 発現の低下

LRFN5 の発現消失が、食道癌 (stage IB 以上) 32 例中 22 例 (67%) に認められた。また、粘膜内癌 10 例中 8 例 (80%) で LRFN5 の発現が消失、減弱していた。

## (3) ゲノムワイドなメチル化解析

LINE-1 のメチル化レベルは、癌部 ( $44.5 \pm 10.1\%$ ) が非癌部 ( $62.7 \pm 6.2\%$ ) に比し有意に低い事 (hypomethylation) が明らかになった ( $P < 0.001$ )。一方、メチル化レベルと、年齢、性別、腫瘍部位、病期、組織型、予後などには相関がなかったが、飲酒歴あるいは喫煙歴のない患者では、ある患者に比べ、有意に癌部における LINE-1 のメチル化レベルが低かった ( $P < 0.001$ )。LINE-1 と LRFN5 遺伝子プロモーター CpG 領域のメチル化レベルとの間に逆相関を認めた。

## (4) ゲノムワイドなメチル化解析

MCAM 法により網羅的に CpG アイランドメチル化を解析した結果、癌部の過剰メチル化が高頻度に認められた。また、非癌部において既に中等度のメチル化が認められた事は、背景粘膜におけるエピジェネティックな変化が、食道扁平上皮癌の発症に深く関与している事を示唆すると考えられた。

また、MCAM 法により新規のメチル化遺伝子の同定に成功した。LRFN5 遺伝子に関して、パイロシーケンスや MSP 法等を用いて詳細に解析したところ、食道癌細胞株において同遺伝子のメチル化と発現低下の相関を認め、また、脱メチル化剤処理による再発現を認めた。食道癌組織においても高頻度のメチル化を検出し、重要なことに早期の粘膜内癌の段階ですでに高頻度に発現低下を認めた。さらに興味深いことに、飲酒や喫煙歴のない患者においてもメチル化が高頻度であった。

一方、ゲノムワイドなメチル化解析として、Pyrosequencing 法を用いて、LINE-1 のメチル化レベルを測定したところ、癌部のメチル化レベルが非癌部より有意に低い

(hypomethylation) ことが示された。さらに、飲酒歴や喫煙歴のある患者に比べ、ない患者

で有意に癌部におけるLINE-1のメチル化レベルが低かった。

従って、食道癌においてCpGアイランド過剰メチル化とともにゲノムワイドな低メチル化が重要な役割をもつ事が示唆された。

以上のように、リアルタイム仮想分子生物学による食道癌の内視鏡分子イメージング診断法開発へ応用できる、有望な臨床用分子マーカーが同定できた。

#### 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)

[学会発表] (計1件)

伊藤美樹、山本博幸、田沼徳真、谷口博昭、能正勝彦、須河泰敬、内藤崇史、鈴木拓、足立靖、高橋宏明、細川正夫、今井浩三、篠村恭久

MCA microarrayを用いたヒト食道扁平上皮癌におけるゲノムワイドメチル化異常の解析とI型膜貫通糖蛋白質LRFN5不活化の同定

第71回日本癌学会学術集会

2012年9月20日、札幌

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 博幸 (YAMAMOTO HIROYUKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：40332910

##### (2) 研究分担者

能正 勝彦 (NOSHO KATSUHIKO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10597339