

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6月7日現在

機関番号：34521
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790210
 研究課題名（和文）環境要因を考慮したエピジェネティック変異診断による
 癌化学療法の個別化
 研究課題名（英文）Individualization of cancer chemotherapy
 using the epigenetic mutation analysis
 研究代表者
 高良 恒史（TAKARA KOHJI）
 姫路獨協大学・薬学部・教授
 研究者番号：00329939

研究成果の概要（和文）：

近年、遺伝子の塩基配列以外にも遺伝的に伝達されるエピジェネティクス（遺伝子のメチル化修飾など）が注目されている。がん細胞の抗がん剤感受性に相違を認める要因の一つとしてエピジェネティクスに着目した結果、がん細胞間で遺伝子全体のメチル化修飾率に相違は認められたものの、抗がん剤感受性の予測因子ではないことが示唆された。そのため、特定遺伝子のメチル化修飾部位と抗がん剤感受性の関連を検討することが重要である。

研究成果の概要（英文）：

Recently, epigenetics (Methylation of DNA, Acetylation of Histon protein, and so on) has been attracted, because it has also inherited but not only the sequence variation of DNA. Therefore, the effects of epigenetic mutation on the sensitivity to anticancer drugs were examined. As results, there was a difference in global DNA methylation among the various types of tumor cells. However, it was suggested that the global DNA methylation was not a factor of predicting the sensitivity to anticancer drugs. So, it is important for examining the relation with the site of methylation and sensitivity to anticancer drugs.

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	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：薬学・医療系薬学

キーワード：エピジェネティクス、癌、抗癌剤感受性、個別化医療

1. 研究開始当初の背景

“薬剤の有効性や副作用の発現は、個人の遺伝的特徴に関係する”。このように、ゲノ

ム情報に基づいて患者個々の遺伝的特徴を把握し、個々に最適な薬物治療法の確立を目指すファーマコジェノミクス研究が世界中で幅広く展開され、薬物療法に大きなインパ

クトを与え続けている(J Am Coll Cardiol. 54, 1041-57, 2009, Pharmacogenomics 10, 1007-16, 2009)。

このような個人差の実体は、ゲノム塩基配列の違い(ジェネティック変異)、特に、塩基配列の1つの塩基のみが異なる一塩基多型に起因していると考えられている。しかしながら、2003年のヒトゲノム解読宣言後、遺伝子の概数が明らかになりつつある一方で、高等生物の複雑さが、遺伝子の数のみでは説明できないことも明らかとなっている(Nature 422, 297-302, 2003, Nature 424, 788-93, 2003)。

そこで、ゲノム塩基配列以外にも個人差として遺伝的に伝達されるエピジェネティクス(Proc Natl Acad Sci USA. 44, 712-7, 1958)が注目されている。エピジェネティクスの実体は、DNA そのものに対するメチル化化学修飾及びDNAを巻きつけてクロマチン構造を作るヒストンタンパクに対するアセチル化化学修飾である。さらに、エピジェネティクスは、DNAの塩基配列の変化なしに、遺伝的しかも可逆的に遺伝子機能の発現を変化させる現象である。

従って、遺伝子機能の発現に影響するエピジェネティクス変異が、抗癌剤感受性に影響を及ぼす可能性は十分に想定される。さらに、エピジェネティクス変異は、同一個体内において、時間軸上の違いで差を生じる変異でもある。これは、ファーマコジェノミクスでは考慮できなかった環境要因を、エピジェネティクスでは遺伝子変異として捉えることが可能であることも意味している。

以上を考え合わせると、ジェネティック変異に基づいて個別化できなかった症例群は、環境要因も考慮できるエピジェネティック変異情報を付加することにより、さらなる個別化につながる可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、ファーマコエピジェネティクス情報に基づいた個別化治療論が、癌化学療法個別化のさらなる発展並びに治療成績の向上に大いに貢献できるものと考えられることから、エピジェネティック変異情報に基づいた癌化学療法の個別化を目指すことである。

まず、由来臓器の異なるヒト癌細胞株37種のゲノムDNA全体のメチル化度を測定し、各種癌細胞株の抗癌剤に対する感受性との関連性について解析した。また、特定遺伝子のプロモーター領域に着目し、メチル化修飾

部位の有無について塩基配列データを解析し、抗癌剤感受性に影響を及ぼすメチル化修飾部位があるか否かについて検討した。

3. 研究の方法

実験には、37種のヒト由来癌細胞株(肺癌、乳癌、子宮頸癌、肝臓癌、腎臓癌、大腸癌及び食道癌)を使用した。

癌細胞のシスプラチン(CDDP)、パクリタキセル(TXL)及び5-FUに対する感受性はWST-1法により測定し、50%増殖阻害濃度(IC₅₀値)を算出することで評価した。

癌細胞株のゲノムDNAはスピニング法により抽出し、得られたゲノムDNAは、5-メチルシトシン抗体を用いたELISA法(Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Ultra Kit, Epigentek社)により、ゲノムDNA全体のメチル化度を定量した。なお、ゲノムDNA全体のメチル化度(%)は、試料として用いたDNA量に対する、メチル化DNA量の割合として算出した。

また、癌細胞由来のゲノムDNAをバイサルファイト処理(非メチル化シトシンがウラシルに変換)し、得られたDNAをシーケンス反応により塩基配列を解析した。

以上の実験で得られたデータを基に、エピジェネティクス変異(DNAメチル化修飾)が抗癌剤感受性に及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

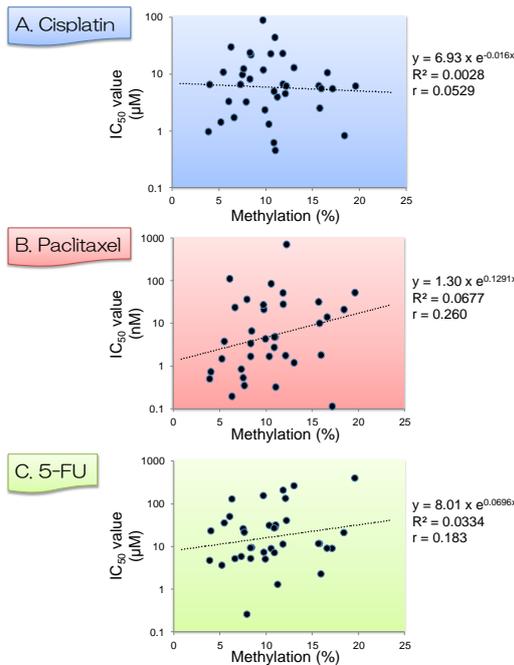
様々な臓器由来の癌細胞におけるゲノムDNA全体のメチル化度は1.63~31.8%(平均10.4%)であり、細胞間に相違のあることが明らかとなった。ゲノムDNA全体のメチル化度は肝臓癌細胞において12.6%と最も高値を示したものの、由来臓器による有意な相違は認められなかった(Table 1)。これは、ゲノムワイドで評価した時のメチル化異常は、組織特異性の低いことを示唆している。

Table 1. Comparison of the global DNA methylation among the derived organ

Derived Organ	Methylation (%)
Lung	11.9 ± 7.79
Cervical	5.18 ± 1.40
Colorectal	9.09 ± 4.98
Kidney	9.33 ± 4.52
Esophageal	10.9 ± 6.25
Breast	9.67 ± 4.95
Liver	12.6 ± 7.89
Total	10.4 ± 6.18

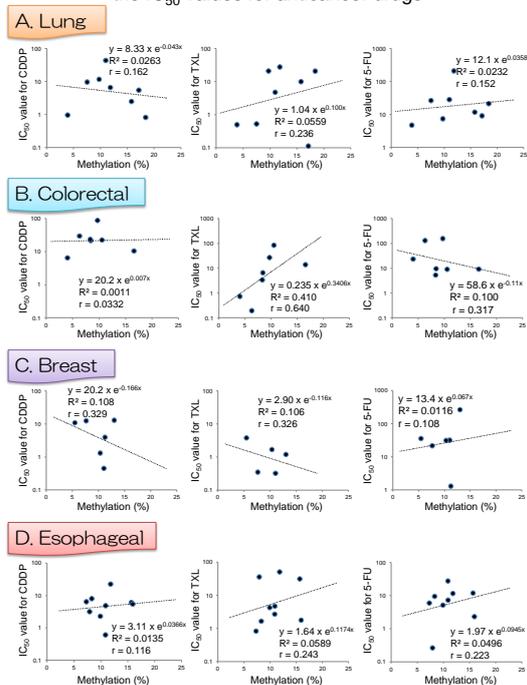
Methylation (%) is calculated by that the methyl DNA amount was divided by the sample DNA amount added in the reaction. Each value represents the mean ± S.D.

Fig. 1 Relationship with the global DNA methylation and the IC₅₀ values for anticancer drugs



次に、細胞間におけるゲノム DNA 全体のメチル化度の相違が認められたことから、これらを利用した抗癌剤感受性予測の可能性が考えられた。そこで、ゲノム DNA 全体のメチル化度と CDDP、TXL 及び 5-FU に対する IC₅₀ 値の関連性について検討した結果、いずれの抗癌剤においても、メチル化度と感受性の間に顕著な関連性は認められなかった (Fig. 1)。

Fig. 2 Relationship with the global DNA methylation and the IC₅₀ values for anticancer drugs



同様に、由来臓器別に分類して、メチル化度と抗癌剤感受性の関連性を検討した結果、大腸癌由来細胞において、メチル化度と TXL 感受性に相関傾向が示されたものの、その他において相関性は観察されなかった (Fig. 2)。従って、抗癌剤感受性の規定因子として、ゲノム DNA 全体のメチル化度はほとんど関与しないことが示唆された。

以上の結果から、癌細胞におけるゲノム DNA 全体のメチル化度は、抗癌剤感受性を予測ツールとしては十分でないことが示された。

そこで、特定遺伝子のメチル化度に着目し、抗癌剤感受性との関連性を検討することが必要であると考えられた。

まず、特定遺伝子 (ERCC1、BRCA1) のプロモーター領域のメチル化について塩基配列を解析した。その結果、一部のメチル化修飾が細胞間で相違することが明らかとなった。また、これらはより転写開始部位に近い塩基配列で確認された。しかしながら、現時点で、抗癌剤感受性に直接関連するようなメチル化修飾部位は特定できなかった。

今後、メチル化異常の検索範囲を広げて、抗癌剤感受性との関連性を検討する必要があると思われる。また、検討対象の遺伝子についても範囲を広げる必要性が示された。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Minegaki Tetsuya, Takara Kohji, Hamaguchi Ryohei, Tsujimoto Masayuki, Nishiguchi Kohshi.
 Factors affecting the sensitivity of human-derived esophageal carcinoma cell lines to 5-fluorouracil and cisplatin.
Oncology Letters, 査読有, **5**, 427-434, 2013.
 DOI: 10.3892/ol.2012.1014
- ② Takara Kohji, Fujita Megumi, Minegaki Tetsuya, Yamamoto Kazuhiro, Takahashi Minoru, Yokoyama Teruyoshi, Okumura Katsuhiko.
 Treatment schedule-dependent effect of 5-fluorouracil and platinum derivatives in colorectal cancer cells.

European Journal of Pharmaceutical
Sciences, 査読有, **45**, 272-281, 2012.
DOI: 10.1016/j.ejps.2011.11.023

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 中山優子、高橋 稔、奥村勝彦、高良恒史：
エベロリムスの長期曝露がヒト腎癌細胞
株に及ぼす影響。
第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会
2012 年 10 月 20 日
- ② 高橋 稔、高良恒史、中山優子、奥村勝彦：
ヒト由来癌細胞株の DNA メチル化と抗
癌剤感受性の関連性。
日本薬学会第 132 年会
2012 年 3 月 31 日
- ③ 中山優子、高良恒史、高橋 稔、奥村勝彦：
エベロリムスで長期曝露したヒト腎臓癌
由来 Caki-2 の細胞特性。
日本薬学会第 132 年会
2012 年 3 月 31 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高良 恒史 (TAKARA KOHJI)
姫路獨協大学・薬学部・教授
研究者番号：00329939