

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591948

研究課題名(和文)胃癌におけるLINE-1メチル化レベルの網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of LINE-1 methylation level in gastric cancer.

研究代表者

岩上 志朗(iwagami, shiro)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70530153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：LINE-1のメチル化レベルはゲノム全体の指標とされている。胃癌203例を対象とした癌部および周辺正常胃粘膜のLINE-1のメチル化レベルを解析し、臨床病理学的因子との関連を調べた。正常胃粘膜と癌部と比較すると、LINE-1メチル化レベルは癌部で低下していた。LINE-1低メチル化群は高メチル化群に比べ優位に予後不良であった。また、周辺正常胃粘膜のLINE-1低メチル化とH.pylori感染には有意な関係性を認めた。LINE-1メチル化レベルは胃癌の予後予測因子やH.pylori感染による胃癌発生のepigenetic field defectのマーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation in the long interspersed nucleotide element-1, L1 (LINE-1) repetitive element is a good indicator of the global DNA methylation level. In some types of human neoplasms, However, prognostic significance of LINE-1 hypomethylation in gastric cancer remains unclear. Using 203 resected gastric cancer specimens, we quantified LINE-1 methylation using bisulfite-pyrosequencing technology. Gastric cancers showed significantly lower LINE-1 methylation levels compared to matched normal gastric mucosa. LINE-1 hypomethylation was significantly associated with shorter overall survival. LINE-1 hypomethylation in gastric cancer is associated with shorter survival, suggesting that it has potential for use as a prognostic biomarker. LINE-1 methylation in the noncancerous gastric mucosae of gastric cancer patients was significantly lower than in the gastric mucosae of the autopsied individuals suggesting the formation of epigenetic field defect in noncancerous gastric mucosae.

研究分野：消化器外科学

キーワード：LINE-1 エピジェネティクス メチル化 胃癌 予後因子 Pyrosequence

1. 研究開始当初の背景

“エピジェネティクス”は、遺伝子発現の調節において非常に重要な役割を担っている。ゲノムワイドな低メチル化(global DNA hypomethylation)は、がん原遺伝子(proto-oncogene)発現や染色体不安定性などを介して、様々な癌種の発癌・浸潤転移において重要な役割を果たす。LINE-1は、繰り返しヌクレオチド配列であり、ゲノム全体の約17%を占める。LINE-1は多くのCpG配列を含み、LINE-1のメチル化レベルは、ゲノム全体のメチル化レベルの指標になるといわれている。

胃癌に対する手術、化学療法、分子標的治療などを含む集学的治療の発達にも関わらず、その予後は未だに不良である。前述したように、メチル化異常を含むエピジェネティックな異常は可逆的な反応であり、癌治療のtargetとして非常に有望である。さらに、予後と関連するエピジェネティックな変化を同定することは、リスクに応じた治療方針決定に役立ち、また、その変化を標的とした治療法が開発された際には、対象患者選別のマーカーとして用いられることが期待される。胃癌においてLINE-1メチル化レベルが減少することは報告されているが、その予後または抗癌剤感受性に対する影響は全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

胃癌切除症例における癌部および周辺正常胃粘膜の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を調べることで、ゲノムワイドなメチル化レベルと胃癌の臨床経過の関係性を検討することを目的とする。また、胃癌発生に関与する菌であるH.pyloriの感染とLINE-1メチル化の関係について検討した。

3. 研究の方法

当科で切除された胃癌203例のパラフィン包埋切片からMacro dissectionにより、腫瘍組織(癌細胞)及び正常上皮をそれぞれ回収する。その組織からDNAを抽出し、引き続きbisulfite処理を行なう。そして、“Pyrosequencing technology”によりLINE-1メチル化レベル(=ゲノム全体のメチル化レベル)を定量的に測定する(Figure 1)。

その後、SAS program (SAS Institute, Cary, NC)を用いて、LINE-1のメチル化レベル(腫瘍部、背景粘膜)と、予後、臨床病理学的因子、疫学的因子との関係を網羅的に解析する。

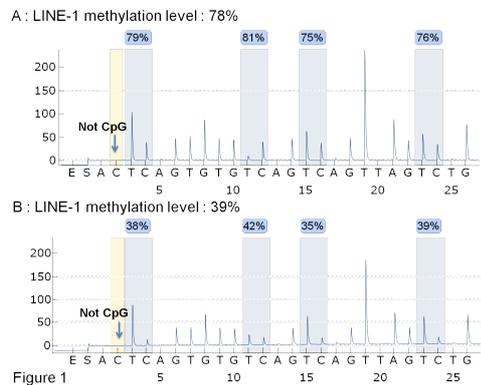


Figure 1

4. 研究成果

癌部のLINE-1メチル化レベルは11.6%~97.5%(平均値71.4%)であった。同一症例の正常胃粘膜と癌部で比較したところ、LINE-1メチル化レベルは癌部で有意に低下していた($p < 0.0001$; $N = 74$ Figure 2)。

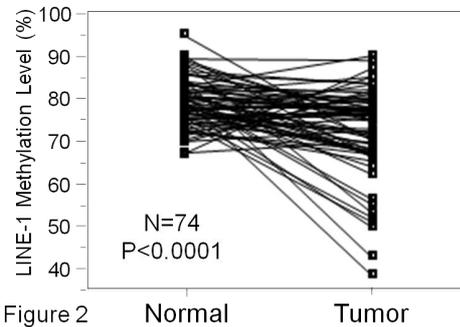


Figure 2

LINE-1メチル化レベルと年齢との間には相関関係を認めなかった。また、Stageと癌部のLINE-1メチル化レベルの間には相関関係を認めなかった。LINE-1のメチル化レベルと予後との関係性を検証した。 Kaplan-Meier法で、全生存率を比較したところLINE-1低メチル化群は高メチル化群に比べ優位に予後不良であった($\log\text{-rank } p = 0.029$ Figure 3)。この結果を示した論文は、Gastric Cancerに採択された。

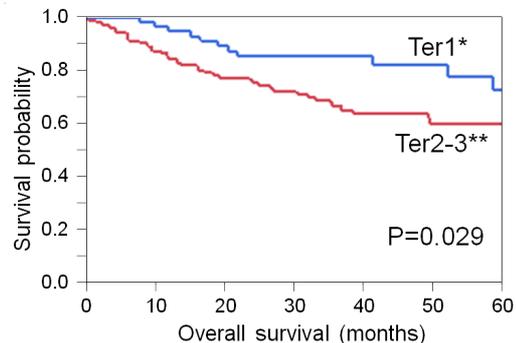


Figure 3 *Ter1 represent the "hypermethylated group" **Ter2-3 represents the "hypomethylated group"

また、胃癌切除症例における、周辺正常胃粘膜のLINE-1低メチル化とH.pylori感染には有意な関係性を認めた($P = 0.037$ Figure 4)。

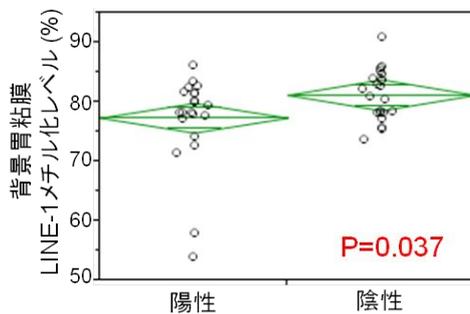


Figure 4 Helicobacter pylori 感染

また、前向きに採取した 20 例の非癌患者の正常胃粘膜でも同様の関係性を認めた ($P=0.01$)。LINE-1 メチル化レベルは H.pylori 感染による胃癌発生における epigenetic field defect のマーカーとなりうる可能性が示唆された。LINE-1 メチル化レベルは H.pylori 感染による胃癌発生における epigenetic field defect のマーカーとなりうる可能性が示唆された。LINE-1 メチル化レベルは H.pylori 感染による胃癌発生における epigenetic field defect のマーカーとなりうる可能性が示唆された。この結果を示した論文は、Medical Oncology (2015 Apr)に採択された。今回の結果は患者別の個別化治療や胃癌の早期診断に貢献できる可能性があり、非常に臨床的意義があると考えられる。

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 17 件)

1. Kosumi K, Baba Y, Watanabe M, Ida S, Nagai Y, Baba H: Pedunculated gastric conduit interposition with duodenal transection after salvage esophagectomy: an option for increasing the flexibility of the gastric conduit. *J Am Coll Surg* 214(5):e31-3, 2012. 査読有り
2. Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Tanaka Y, Kinoshita K, Saito S, Baba Y, Baba H: MicroRNA-200b regulates cell proliferation, invasion, and migration by directly targeting ZEB2 in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 19 (S3):S656-64, 2012. 査読有り
3. Watanabe M, Iwatsuki M, Iwagami S, Ishimoto T, Baba Y, Baba H: Prognostic nutritional index predicts outcomes of gastrectomy in the elderly. *World J Surg* 36(7):1632-9, 2012. 査読有り
4. Iwagami S, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ida S, Nagai Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H: Pyrosequencing assay to measure LINE-1 methylation level in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 19(8):2726-32, 2012. 査読有り
5. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, Imamura Y, Qian ZR, Baba Y, Shima K, Sun R, Nosho K, Meyerhardt JA, Giovannucci E, Fuchs CS, Chan AT, Ogino S: Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med* 367(17):1596-606, 2012. 査読有り
6. Inadomi K, Ishimoto T, Watanabe M, Iwatsuki M, Arima K, Ida S, Nagai Y, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Honda Y, Iyama K, Baba H: Primary malignant melanoma of the esophagus with extensive intraepithelial extension. *Ann Thorac Surg* 94(6):2105-7, 2012. 査読有り
7. Kiyozumi Y, Watanabe M, Iwatsuki M, Ishimoto T, Iwagami S, Baba Y, Tamaoki Y, Iyama K, Baba H: Pathological complete response in a case of HER2-positive gastric cancer with peritoneal dissemination treated with trastuzumab in combination with chemotherapy. *Int Canc Conf J* 2(1):51-5, 2013. 査読有り
8. Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, Murata A, Iwagami S, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba H: LINE-1 hypomethylation in gastric cancer, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. *Gastric Cancer* 16(4):480-7, 2013. 査読有り
9. Miyata T, Watanabe M, Nagai Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Y, Furusho C, Ikuta Y, Yamamoto T, Baba H: Successful esophageal bypass surgery in a patient with a large tracheoesophageal fistula following endotracheal stenting and chemoradiotherapy for advanced esophageal cancer: case report. *Esophagus* 10(1):27-9, 2013. 査読有り
10. Iwagami S, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamaki K, Ohashi Y, Baba H: LINE-1 hypomethylation is associated with a poor prognosis among patients with curatively resected esophageal squamous cell

- carcinoma. *Ann Surg* 257(3):449-55, 2013. 査読有り
11. Watanabe M, Baba Y, Nagai Y, Baba H: Minimally invasive esophagectomy for esophageal cancer: an updated review. *Surg Today* 43(3):237-44, 2013. 査読有り
 12. Mima K, Hayashi H, Imai K, Kuroki H, Nakagawa S, Okabe H, Chikamoto A, Watanabe M, Beppu T, Baba H: High CD44s expression is associated with the EMT expression profile and intrahepatic dissemination of hepatocellular carcinoma after local ablation therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 20(4):429-34, 2013. 査読有り
 13. Saito S, Okabe H, Watanabe M, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, Tanaka Y, Kurashige J, Miyamoto Y, Baba H: CD44v6 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep* 29(4):1570-8, 2013. 査読有り
 14. Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, Murata A, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Noshio K, Baba H: PIK3CA mutation is associated with a favorable prognosis among patients with curatively resected esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 19(9):2451-9, 2013. 査読有り
 15. Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Noshio K, Baba H: Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer. *Br J Cancer* 109(2):408-15, 2013. 査読有り
 16. Baba Y, Murata A, Watanabe M, Baba H: Clinical implications of the LINE-1 methylation levels in patients with gastrointestinal cancer. *Surg Today* 44(10):1807-16, 2014. 査読有り
 17. Kosumi K, Baba Y, Ishimoto T, Harada K, Miyake K, Izumi D, Tokunaga R, Murata A, Eto K, Sugihara H, Shigaki H, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Komohara Y, Takeya M, Baba H: Relationship between LINE-1 hypomethylation and Helicobacter pylori infection in gastric mucosae. *Med Oncol* 32(4):571, 2015. 査読有り

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 志垣博信、馬場祥史、渡邊雅之、澤山浩、田中洋平、木下浩一、藏重淳二、齋藤誠哉、岩上志朗、井田智、長井洋平、坂本快郎、石本崇胤、岩槻政晃、宮本裕士、馬場秀夫、胃癌における Long interspersed nucleotide factor-1 (LINE-1) のメチル化の臨床病理学的意義、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 12 日、千葉
2. Iwagami S, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ida S, Nagai Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamoto S, Miyamoto Y, Baba H. Prognostic Significance of LINE-Hypomethylation in Gastric Cancer 2012 AACR
3. Kusumi K, Baba Y, Karashima R, Ida S, Imamura Y, Ishimoto T, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H. Infection of Helicobacter pylori is Associated with LINE-1 Hypomethylation of Non-cancerous Gastric Mucosae The 4th JCA-AACR、2013 年 12 月 17 日、千葉
4. 馬場祥史、小澄敬祐、原田和人、村田飛鳥、辛島龍一、今村裕、井田智、石本崇胤、岩上志朗、吉田直矢、馬場秀夫、胃癌における LINE-1 メチル化レベルの網羅的解析、第 86 回日本胃癌学会総会 2014 年 3 月 21 日、横浜
5. 小澄敬祐、馬場祥史、辛島龍一、井田智、今村裕、石本崇胤、岩上志朗、坂本快郎、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫 胃癌の背景粘膜における LINE-1 メチル化レベルと Helicobacter pylori 感染の解析 第 86 回日本胃癌学会総会、2014 年 3 月 21 日、横浜
6. 小澄敬祐、馬場祥史、石本崇胤、辛島龍一、井田智、今村裕、岩上志朗、坂本快郎、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫胃癌背景粘膜における LINE-1 メチル化レベル及び CD44 と Helicobacter pylori 感染の解析第 100 回日本消化器病学会総会 2014 年 4 月 23 日、東京
7. 小澄敬祐、馬場祥史、井田智、今村裕、石本崇胤、岩上志朗、坂本快郎、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫 胃癌診療における胃粘膜 LINE-1 メチル化レベルの意義、第 69 回日本消化器外科学会総会、2014 年 7 月 18 日、福島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩上 志朗 (IWAGAMI, shiro)
熊本大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：70530153

(2) 研究分担者

馬場 祥史 (BABA, yoshifumi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：20599708

渡邊 雅之 (WATANABE, masayuki)
公益財団法人がん研究会；有明病院 消化
器外科・部長
研究者番号：80254639