

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659617

研究課題名(和文)食道癌の新規治療法の開発を目指したIGF2 DMR0メチル化レベルの網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of IGF2 DMR0 methylation level in esophageal cancer

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：IGF2 DMR0メチル化レベルはIGF2 L01と密接に関係している。Pyrosequencing technologyにより食道癌202例のIGF2 DMR0メチル化レベルを測定した。食道癌のメチル化レベルは正常上皮と比べて有意に低値であり、ApaIを用いてIGF2 L01を評価したところL01症例では非L01症例よりもIGF2 DMR0メチル化レベルは低値であった。食道癌においてIGF2 DMR0低メチル化症例は有意に全生存期間が短く予後不良であった。以上より、食道癌IGF2 DMR0メチル化レベルは食道癌の予後予測因子となりうることを示された(Ann Surg Oncol, 2014)

研究成果の概要(英文)：The methylation level at IGF2 DMR0 is correlated with IGF2 L01 and is a suggested surrogate marker for IGF2 L01. The IGF2 imprinting status was screened using ApaI polymorphism, and IGF2 protein expression was evaluated by immunohistochemistry with 30 esophageal squamous cell carcinoma tissue specimens. For survival analysis, IGF2 DMR0 methylation was measured using a bisulfite pyrosequencing assay with 216 ESCC tissue specimens. IGF2 L01 cases exhibited lower DMR0 methylation levels than IGF2 non-L01 cases. Among 202 patients eligible for survival analysis, IGF2 DMR0 hypomethylation was significantly associated with higher cancer-specific mortality. The IGF2 DMR0 methylation level in ESCC was associated with IGF2 L01 and IGF2 protein expression. In addition, IGF2 DMR0 hypomethylation was associated with a shorter survival time, suggesting its potential role as a prognostic biomarker.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：癌 トランスレショナルリサーチ IGF2 DMR0 メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

Insulin-like growth factor 2 (IGF2)は細胞分裂促進作用や抗アポトーシス作用を有し、癌の発生・浸潤・転移に関与する。IGF2遺伝子は通常刷り込み(imprinting)を受けており、大部分が父型由来アレルからのみ発現している。しかし、様々な癌種において、刷り込み消失(loss of imprinting; LOI)により IGF2 遺伝子が両アレルから発現するようになり、それが腫瘍増殖につながる事が報告されている。IGF2 遺伝子の刷り込み消失はdifferentially methylated regions (DMR)として知られる CpG 配列に富んだ領域のメチル化レベルにより制御されている。特に、大腸癌においては、IGF2 遺伝子 DMR0 のメチル化レベルが IGF2 遺伝子の刷り込み消失と密接に関係しており、刷り込み消失の surrogate marker になりうると報告されている。私は、Pyrosequencing technology による IGF2 DMR0 のメチル化レベルの評価法を確立し、IGF2 DMR0 低メチル化の大腸癌は予後不良であることを報告した。ただし、食道癌における IGF2 DMR0 に関する検討は全くなされておらず、極めて独創的な研究である。

## 2. 研究の目的

200 例以上の食道癌の IGF2 DMR0 メチル化レベルを測定し、予後、臨床病理学的因子との関連を網羅的に解析すること

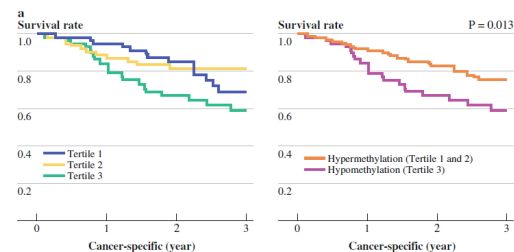
## 3. 研究の方法

当科で切除された食道扁平上皮癌 200 例以上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 IGF2 DMR0 メチル化レベル(= IGF2 LOI の surrogate marker)を定量的に測定する。その後、JMP program を用いて、メチル化レベル(腫瘍部、正常上皮)と、予後、臨床病理学的因子との関係を網羅的に解析する。

## 4. 研究成果

Insulin-like growth factor 2 (IGF2)は細胞分裂促進作用や抗アポトーシス作用を有し、癌の発生・浸潤・転移に関与する。IGF2 は通常刷り込み(imprinting)を受けているが刷り込み消失(loss of imprinting; LOI)により IGF2 が両アレルから発現し、それが腫瘍増殖に繋がることが報告されている。IGF2 DMR0 メチル化レベルは IGF2 LOI と密接に関係しており食道癌における IGF2 DMR0 メ

チル化レベルと臨床病理学的因子等との関係を解析することが本研究の目的である。Pyrosequencing technology により、食道癌 202 例の IGF2 DMR0 メチル化レベルを測定した。食道癌のメチル化レベルは、正常上皮と比べて有意に低値であった。また 30 例の免疫染色で IGF2 強陽性例は陰性例・弱陽性例に比し有意にメチル化レベルが低かった (P=0.023、P=0.012)。ApaI polymorphism を用いて IGF2 LOI を評価したところ、LOI 症例では非 LOI 症例よりも IGF2 DMR0 メチル化レベルは低値であった。食道癌において、IGF2 DMR0 低メチル化症例 (<30%) は有意に全生存期間が短く、予後不良であった。このことから、食道癌 IGF2 DMR0 メチル化レベルは、食道癌の予後予測因子となりうる事が示された。



IGF2 DMR0 メチル化レベルによる生存曲線

食道癌は非常に予後の悪い疾患であるが、今回の結果は患者別の個別化治療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。これらの結果は Annals of surgical oncology にアクセプトされた。

## 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 10 件)

Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Yoshida N, Oki E, Morita M, Nakao M, Baba H. IGF2 DMR0 methylation, loss of imprinting, and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol. 2014 Apr;21(4):1166-74. 査読有  
DOI: 10.1245/s10434-013-3414-7.

Baba Y, Watanabe M, Murata A, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Yoshida N, Oki E, Sakamaki K, Nakao M, Baba H. LINE-1 hypomethylation, DNA copy number alterations, and CDK6 amplification in esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2014 Mar

1;20(5):1114-24. 査読有  
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1645.  
Baba Y, Murata A, Watanabe M, Baba H. Clinical implications of the LINE-1 methylation levels in patients with gastrointestinal cancer. Surg Today. 2013 Oct 23. [Epub ahead of print] 査読有  
DOI: 10.1007/s00595-013-0763-6  
Baba Y, Murata A, Watanabe M, Baba H. Clinical implications of the LINE-1 methylation levels in patients with gastrointestinal cancer. Surg Today. 2013 Oct 23. [Epub ahead of print] 査読有  
DOI: 10.1007/s00595-013-0763-6  
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. 2013 ;257(3):449-55. 査読有  
DOI: 10.1097/SLA.0b013e31826d8602.  
Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Noshok K, Baba H. Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer. Br J Cancer. 2013 23;109(2):408-15. 査読有  
DOI: 10.1038/bjc.2013.289.  
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. 2013;16(4):480-7. 査読有  
DOI: 10.1007/s10120-012-0209-7.  
Suzuki M, Shiraishi K, Eguchi A, Ikeda K, Mori T, Yoshimoto K, Ohba Y, Yamada T, Ito T, Baba Y, Baba H. Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL and IGF2BP7 in non-small cell lung cancer. Oncol Rep. 2013;29(4):1308-14. 査読有  
DOI: 10.3892/or.2013.2266.  
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. Annals of Surgical Oncology 19(8): 2726-32, 2012 査読有  
DOI: 10.1245/s10434-011-2176-3.  
Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, Iwagami

S, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba H. LINE-1 Hypomethylation in Noncancerous Esophageal Mucosae is Associated with Smoking History. Ann Surg Oncol. 2012 Dec;19(13):4238-43. 査読有  
DOI: 10.1245/s10434-012-2488-y.

〔学会発表〕(計10件)

馬場祥史、渡邊雅之、吉田直矢、小澄敬祐、原田和人、村田飛鳥、岩上志朗、辛島龍一、石本崇胤、馬場秀夫、「同時性・異時性頭頸部癌を有する食道癌症例におけるLINE-1メチル化レベル」第65回日本気管食道学会総会ならびに学術講演会、2013年11月1日、品川プリンスホテル(東京都)

馬場祥史、渡邊雅之、村田飛鳥、志垣博信、三宅慧輔、石本崇胤、岩槻政晃、岩上志朗、吉田直矢、馬場秀夫、「食道扁平上皮癌におけるLINE-1低メチル化とDNAコピー数異常、CDK6増幅の関係」第72回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、パシフィコ横浜(神奈川県)

村田飛鳥、馬場祥史、渡邊雅之、志垣博信、岩上志朗、坂本快郎、宮本裕士、別府透、馬場秀夫、「大腸癌原発巣と転移巣におけるLINE-1メチル化レベルの比較」第24回日本消化器癌発生学会、2013年9月6日、石川県立音楽堂

馬場祥史、渡邊雅之、村田飛鳥、志垣博信、岩上志朗、石本崇胤、岩槻政晃、吉田直矢、馬場秀夫、「食道癌におけるLINE-1メチル化レベルとDNAコピー数異常の関係」第24回日本消化器癌発生学会、2013年9月5日、石川県立音楽堂

Baba Y, Watanabe M, Murata A, Shigaki H, Iwagami S, Ishimoto T, Baba H. Association of IGF2 DMR0 hypomethylation in esophageal squamous cell carcinoma with poor prognosis. 2013 ASCO Annual Meeting, 2013.5.30~2013.6.1, Chicago, USA.

村田飛鳥、馬場祥史、渡邊雅之、志垣博信、石本崇胤、岩槻政晃、尾崎宣之、岩上志朗、坂本快郎、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫、「食道扁平上皮癌におけるIGF2 DMR0メチル化レベルと予後の関係」第113回日本外科学会学術集会、2013年4月13日、マリンメッセ福岡

Baba Y, Watanabe M, Murata A, Shigaki H, Iwagami S, Iwatsuki M, Ishimoto T, Baba H. Relationship between LINE-1 methylation level, allelic imbalance and PIK3CA mutation in esophageal squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2013, 2013.4.9, Washington, DC, USA

Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H,

Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H. Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer. AACR Annual Meeting 2013, 2013.4.9, Washington, DC, USA

Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ozaki N, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H. Hypomethylation of the IGF2 DMRO in Esophageal Squamous Cell Carcinoma, Detected by Bisulfite Pyrosequencing, is Associated with Poor Prognosis. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference (AACR-JCA), 2013.2.23, Hyatt Regency Maui, Hawaii.

Baba Y, Watanabe M, Murata A, Shigaki H, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Beppu T, Baba H. Clinical and prognostic significance of LINE-1metastases from colorectal cancer. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference (AACR-JCA), 2013.2.23, Hyatt Regency Maui, Hawaii.

〔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：  
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

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

### (2)研究分担者

坂本 快郎 (SAKAMOTO, Yasuo)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00452897

石本 崇胤 (Ishimoto, Takatsugu)

熊本大学・大学院生命科学研究部・特任助教

研究者番号：00594889

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

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：