

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32305

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890222

研究課題名(和文) 血中循環がん遺伝子によるがん診断における新たな臨床的有用性の探索

研究課題名(英文) Novel clinical significance of circulating tumor DNA biomarker for cancer diagnosis

研究代表者

梶田 昌裕 (Kajita, Masahiro)

高崎健康福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：40591871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：近年、がん患者の血液中に存在する血中循環がんメチル化遺伝子は、血液からがんを発見できるバイオマーカーとして臨床応用に向け盛んに研究されているが、検出感度が低いことから未だ実用化されていない。これまでに我々は、高い精度で血中循環がんメチル化遺伝子を検出できる新規測定法を構築してきた。そこで本研究では、新規測定法による進行性乳がんを対象とした診断法の臨床応用を目指して、早期の進行性乳がんを見出すことができる新しいメチル化遺伝子マーカーを、病態に即したモデル実験系を構築し、探索を行った。その結果、新規のメチル化遺伝子マーカーを複数候補見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a high-performance DNA methylation assay for circulating tumor genomes, and it was validated as cancer monitoring system with higher sensitivity than that of conventional tumor markers for early stages of breast cancer. In this study, to develop a monitoring system for aggressive cancers in early stage of breast cancer patients, we screened methylated genes in epithelial-mesenchymal transition (EMT)-induced breast cancer cells. EMT-induced breast cancer cell lines were prepared by transcription factor Snail over-expression, and comprehensive DNA methylation assay was performed for methylated cellular genes screening. As results, 370 methylation and un-methylation sites of 248 annotated genes were screened, and 11 methylation marker candidates were verified by quantitative RT-PCR. In conclusion, new methylated genes were selected as a biomarker for EMT-induced breast cancer cells, which could be candidate markers for early stage of aggressive breast cancer patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：応用薬理学

キーワード：バイオマーカー がん 診断 検査 血中循環がん遺伝子 メチル化 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年、血液中を循環している遺伝子(血中循環遺伝子)は、様々な疾病に関するバイオマーカーとしての臨床応用が期待されている。特に、がん患者の血液中に浮遊する血中循環がんメチル化遺伝子は、血液からがんを見つけるバイオマーカーとして実用化に向け盛んに研究されているが、実際に臨床応用されていない。その要因として、血中循環がんメチル化遺伝子の測定法の低い検出感度と再現性に問題があった。そこで我々はこれまでに、微量の血中循環がんメチル化遺伝子を高感度に検出することのできる新しい測定法(one-step methylation-specific PCR; OS-MSP)を構築し、臨床的有用性を実証してきた(Yamamoto, Kajita et al., Breast Cancer Res Treat. 2012)。すなわち、新規に構築した基盤技術により、血中循環がんメチル化遺伝子はがんの存否を診断することができるバイオマーカーであることを証明してきた。

一方で、進行性乳がんは、早期に発見することができれば、適切な治療につなげることが可能となり、予後改善に大きく寄与することが知られている。この進行性乳がんは、がん細胞の一部が上皮系細胞から間葉系細胞に変換(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)して、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)等を発現して運動能や浸潤能を獲得し、間質および血管内に浸潤する。このことから、EMT化したがん細胞を効率よく検出することができれば進行性乳がんの早期発見につながると推測された。そこで本研究では、がん細胞のEMT化に関わるメチル化遺伝子を網羅的に解析し、進行性乳がんの早期発見を可能にする新規のメチル化遺伝子マーカーを探索し、その有用性評価を行った。

2. 研究の目的

これまでに我々が構築した高感度な測定

法により、微量の血中循環がん遺伝子を検出することが可能になった。この高感度測定法を用いて進行性乳がんの早期発見に向けた臨床応用を可能にするためには、有効性の高いメチル化遺伝子マーカーを選定する必要がある。そのためには、がん遺伝子が血液中にどの程度循環しているのか、腫瘍の体積との相関性を明確にして、早期に進行性乳がんを発見するための病態に即したメチル化遺伝子マーカーを選定することが求められる。すなわち、進行性乳がんに特異的な現象に関わるメチル化遺伝子をバイオマーカーとすることが必須である。そこで本研究では、モデル実験系を用いた網羅的メチル化解析により、進行性乳がん細胞に特徴的なEMT化に関わるメチル化遺伝子を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1). 乳がん細胞株 MCF-7 細胞を免疫不全マウスの皮下組織に移植して、担がんマウスを作製した。移植した腫瘍の体積を測定後、担がんマウスおよびコントロールマウスから血液を採取して、MCF-7 細胞由来の血中循環がん遺伝子量を、ヒト LINE-1 遺伝子の定量的 PCR 法により測定した。

(2). MCF-7 細胞に、転写抑制因子 Snail を強制発現させて、EMT 化を誘導させた。細胞形態学的変化及び、細胞接着因子カドヘリンの発現量減少により EMT 化が誘導されたことを確認した後、ゲノム遺伝子を抽出精製し、HumanMethylation450[®] アッセイ(イルミナ社)により、45 万以上のメチル化部位をターゲットとした網羅的メチル化遺伝子解析を行った。得られた結果は、メチル化遺伝子群のプロファイル解析により、EMT 化に関連したメチル化遺伝子マーカーの抽出を行った。抽出された候補マーカー群は、mRNA 発現量を定量的 PCR により解析し、有用性検証を行った。

4. 研究成果

担がんマウスの血中循環がん遺伝子量を測定したところ、1-100ng/mLの範囲で存在することが観察され、コントロールマウスと比較して優位に高いことが示された。そこで、腫瘍の体積と血中循環がん遺伝子量との相関を調べた結果、腫瘍の組織体積が比較的大きい 800mm³ 以上で血中循環がん遺伝子量が増大することが確認された。このことから、腫瘍組織体積の小さい初期の進行性乳がんを検出するためのメチル化遺伝子マーカーは、細胞増殖に関わる因子では困難であることが想定され、進行性乳がんの病態に特異的な因子を見出す必要があると考えられた。そこで、進行性乳がん細胞で観察される EMT 化に着目し、新規のメチル化遺伝子マーカーの探索を行った。

転写抑制因子 Snail の強制発現により EMT 化させた乳がん細胞株 MCF-7 細胞を用いて、HumanMethylation450[®]による網羅的なメチル化遺伝子解析および、in silico によるプロファイル解析を行った。その結果、248 遺伝子に関連した 370 メチル化部位が EMT 化により選択的にメチル化及び、非メチル化されることが明らかになった。抽出された 248 遺伝子の中で、転移・浸潤に関わる可能性が高い転写因子および細胞接着因子等に関して、mRNA 発現量を定量的 PCR により解析したところ、少なくとも 8 遺伝子に関して発現が抑制され、3 遺伝子に関しては発現亢進が観察された。このことから、発現制御が確認された 11 遺伝子は、EMT 化に関わるメチル化遺伝子であり、進行性乳がんを早期に発見できるバイオマーカーに成り得ることが示唆された。

以上の本研究の成果より、これまで検出することが困難であった進行性乳がんを早期に発見することが可能なメチル化遺伝子マーカーとして、EMT 化により選択的にメチル化及び、非メチル化修飾される 11 遺伝子を新たに見出すことに成功した。今後は、本研

究により抽出された各遺伝子マーカー候補に関して、がん細胞の浸潤・転移における役割を明らかにする。さらに、血液からメチル化遺伝子マーカー候補を検出するための最適な検出部位を同定し、臨床検体を用いた有用性評価を追加することにより、新規のメチル化遺伝子マーカー候補の臨床応用への可能性を検証する。

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 1 件)

- (1) Noriko Oka, Masahiro Kajita, Ryuichiro Nishimura, Chiho Ohbayashi, and Tamotsu Sudo, L1 gene methylation in high-risk human papillomaviruses for the prognosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*. 2013; 23(2): 235-43.

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 松居 彩, 梶田昌裕, 横尾英明, 村上 孝: H-RAS^{G12V} 及び、v-SRC による NIH3T3 細胞の形質転換とマウス個体内転移動態の特徴, 第 134 回日本薬学会年会, 2014 年 3 月 27 - 30 日, 熊本
- (2) 野口沙斗美, 梶田昌裕, 原田 忍, 斎藤克代, 村上 孝: 恒常的な上皮間葉転換刺激はマウス乳がん細胞株 4T1 の腫瘍進展を遅延させる, 第 134 回日本薬学会年会, 2014 年 3 月 27 - 30 日, 熊本
- (3) Masahiro Kajita, Takashi Murakami, Masahiro Hayashi; High-risk human papillomaviruses (HPVs) L1 gene methylation as a prognostic biomarker for cervical intraepithelial neoplasias (CINs). The VIII Indochina

conference, Dec. 4-5, 2013, Ho Chi Minh City, Vietnam.

- (4) Masahiro Kajita, Shinzaburo Noguchi, Masahiro Hayashi; The recurrence monitoring system by one-step methylation specific PCR (OS-MSP) with biomarker of circulating tumor genome in breast cancer. 28th the Japanese Society for the study of Xenobiotics (JSSX) annual meeting, Oct. 9-11, 2013, Tokyo.
- (5) Masahiro Kajita, Takashi Murakami, Masahiro Hayashi; New methylated DNA biomarkers in circulating tumor genomes for the aggressive type of breast cancer cells. 72nd Annual meeting of the Japanese cancer association, Oct.3-5, 2013, Yokohama.
- (6) Takashi Murakami, Aya Matsui, Masahiro Hayashi, Masahiro Kajita; In vivo metastatic behaviour of H-RAS(G12V)-and v-SRC-transformed NIH3T3 cells in athymic mice. 72nd Annual meeting of the Japanese cancer association, Oct.3-5, 2013, Yokohama.

〔産業財産権〕

出願状況(計 5件)

- (1) 名称：大腸癌に関する情報の取得方法，
ならびに大腸癌に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット
発明者：酒井綾子，梶田昌裕，他3名
権利者：シスメックス(株)
種類：特許
番号：PCT/JP2013/075334
出願年月日：2013年9月19日
国内外の別：国内および国外
- (2) 名称：肝細胞癌に関する情報の取得方法，
ならびに肝細胞癌に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット

発明者：酒井綾子，梶田昌裕，他3名
権利者：シスメックス(株)
種類：特許
番号：PCT/JP2013/075335
出願年月日：2013年9月19日
国内外の別：国内および国外

- (3) 名称：脳腫瘍に関する情報の取得方法，
ならびに脳腫瘍に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット
発明者：酒井綾子，梶田昌裕，他3名
権利者：シスメックス(株)
種類：特許
番号：PCT/JP2013/075336
出願年月日：2013年9月19日
国内外の別：国内および国外
- (4) 名称：子宮体癌に関する情報の取得方法，
ならびに子宮体癌に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット
発明者：酒井綾子，梶田昌裕，他3名
権利者：シスメックス(株)
種類：特許
番号：PCT/JP2013/075337
出願年月日：2013年9月19日
国内外の別：国内および国外
- (5) 名称：肝細胞癌由来の癌細胞の存否の判定方法、判定用マーカーおよびキット
発明者：酒井綾子，梶田昌裕，他3名
権利者：シスメックス(株)
種類：特許
番号：PCT/JP2013/054961
出願年月日：2013年2月26日
国内外の別：国内および国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶田 昌裕 (KAJITA, MASAHIRO)
高崎健康福祉大学・薬学部・准教授
研究者番号：40591871