

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870569

研究課題名(和文)多段階DNAメチル化異常を来す肺がんの新規候補遺伝子解析

研究課題名(英文)Analyses of candidate genes with multi-step DNA methylation alterations in lung cancer

研究代表者

佐藤 崇 (Sato, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：20464836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺がんはがん関連死の主要な原因となっている。エピジェネティック機構がヒトの発がん過程に重要な寄与をなすことが知られており、研究代表者らのゲノム網羅的DNAメチル化解析から得られた候補遺伝子について検討した。候補遺伝子PTPRHのmRNA発現は、肺がん組織において非がん肺組織と比し高発現しており、肺腺がんコホートではDNAメチル化レベルと逆相関していた。細胞株の脱メチル化剤処理によってPTPRHの発現が回復し、PTPRH発現がDNA低メチル化によって制御されていると考えられた。さらに、そのDNAメチル化状態が肺腺がんの予後予測因子となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide. It is known that epigenetic changes contribute to human carcinogenesis. We examined candidate genes which were obtained from genome-wide DNA methylation analysis. mRNA expression of PTPRH, one of the candidate genes, were upregulated in non-small cell lung cancer tissues compared with non-cancerous lung tissues and inversely correlated with DNA methylation levels in a cohort of lung adenocarcinoma patients. DNA-demethylating treatment of cell lines restored mRNA PTPRH expression levels, suggesting that PTPRH gene expression was regulated by DNA hypomethylation. Furthermore, we identified the DNA methylation status of PTPRH as a novel prognostic factor for lung adenocarcinoma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺がん DNAメチル化 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

肺がんはがん関連死の主要な原因となっている。その原因遺伝子の同定に関わる研究が世界中で進められており、*EGFR*、*KRAS*、*BRAF*、*TP53*、*ERBB2*、*PIK3CA*、*MET* の遺伝子変異や *EML4-ALK*、*RET*、*ROS1* 融合遺伝子などが原因機構として明らかになっている。一方、これらジェネティックな異常だけでなく、エピジェネティック機構がヒトの発がん過程に重要な寄与をなすことが知られており、がん抑制遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化亢進によるサイレンシングが報告されている。さらに、DNA メチル化の変化は諸臓器がんの多段階発がん過程の早期から起きていることが知られている。研究代表者らは、肺がんに関するゲノム網羅的 DNA メチル化解析で、前がん段階の DNA メチル化異常が特定の遺伝子のサイレンシングを介して腫瘍の悪性度および予後を規定していることを明らかにした (Sato et al. *Plos One*, 2013)。また、肺腺がん症例より得られた非がん肺組織の DNA メチル化プロファイルを用いて教師なし階層的クラスタリングを行ったところ、肺腺がん症例は発がん経路・臨床病理像とよく相関するクラスターに分類された (Sato et al. *Int J Cancer*, 2014)。前がん段階における DNA メチル化プロファイルを元に、喫煙による慢性閉塞性肺疾患などを基盤に発がんする経路、非喫煙者の発がん経路、軽喫煙などにより惹起され予後不良の転帰を辿る発がん経路があることが示唆された。これらの研究で得られた候補遺伝子の機能を評価し、新規の分子標的や分子機構を解明したいと考えた。

## 2. 研究の目的

これまでの研究において申請者らは、前がん段階から DNA メチル化異常が生じ、遺伝子サイレンシングを介して腫瘍の悪性度を規定している、*ADCY5*、*GFRA1*、*PDE9A* などの候補遺伝子を見出した。また、発がん経路を反映したクラスターに特徴的な遺伝子も、前がん段階から DNA メチル化異常が起きていた。しかしながら、このような前がん段階から DNA メチル化異常を来し発がんに関与する遺伝子が、実際にどのような機能を持ち、発がんに影響しているかどうかは明らかになっていない。そこで、本研究の当初の目的はこれらのすでに抽出している候補遺伝子の機能解析とした。これによって、新規の分子標的を見出すこと、および発がんに関与する新規の分子機構を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) これまでの研究データから機能解析を行う候補遺伝子の優先順位付けを行った。発現マイクロアレイを用いた mRNA 発現レベルのスクリーニング結果、文献報告、パスウェ

イツール、ドライバー遺伝子異常との関連を参考とした。

(2) 各種細胞株における候補遺伝子の mRNA 発現レベルを定量 RT-PCR によって調べ、DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine 処理を用いて DNA メチル化による発現制御の検証を行った。

(3) 候補遺伝子の高発現細胞株に対する siRNA を用いたノックダウン、低発現細胞株に対するプラスミドベクターを用いた候補遺伝子の過剰発現モデルを作成し、細胞増殖等の形質変化を検討した。

(4) 候補遺伝子 *PTPRH* について、非小細胞肺がん組織と対応する非がん肺組織における mRNA 発現を調べた。非小細胞肺がんの主要なサブタイプである肺腺がん症例からなる別のコホートで DNA メチル化と遺伝子発現の関連を調べ、さらに *PTPRH* の DNA メチル化の予後への関与について検討した。

## 4. 研究成果

(1) 定量 RT-PCR による mRNA 発現レベルとがんの悪性度を示す臨床病理学的因子との相関を確認した候補遺伝子 *ADCY5* と *GFRA1* について、各種細胞株でプラスミドベクターを用いた過剰発現、siRNA を用いたノックダウンを行ったが、細胞増殖などの有意な形質変化を示すことはできなかった。

(2) がん組織における DNA メチル化異常が予後と相関するとスクリーニングされた候補遺伝子 *PTPRH* に着目した。*PTPRH* の遺伝子発現を 89 症例の非小細胞肺がん組織と対応する非がん肺組織について cDNA マイクロアレイで調べたところ、肺がん組織において対応する非がん肺組織と比較し有意に高発現していた。定量 RT-PCR によってマイクロアレイデータを検証し、肺がん組織での高発現、マイクロアレイデータとの相関を確認した。次に、*PTPRH* の発現異常が DNA メチル化異常に起因するという仮説に基づき、145 の肺腺がん症例からなる別のコホートで DNA メチル化と *PTPRH* 遺伝子発現との関連について調べたところ、Infinium HumanMethylation27 アレイ CpG 部位 cg11261264 における DNA メチル化レベルは非がん肺組織と比し肺腺がん検体で有意に減弱していた。同コホートで定量 RT-PCR により mRNA 発現レベルも調べたところ、やはり肺腺がん組織で対応する非がん肺組織より高発現しており、DNA メチル化レベルとは逆相関していた (図 1)。 *PTPRH* の DNA 低メチル化が mRNA 高発現に帰結している可能性が示唆された。

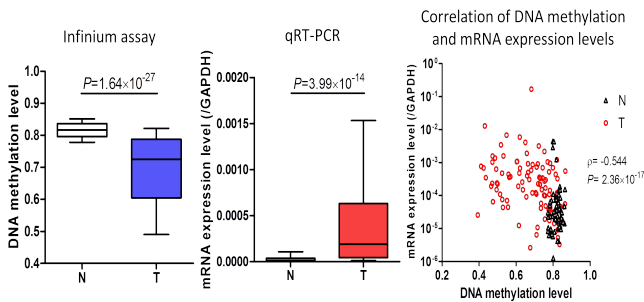


図 1 DNA メチル化と mRNA 発現との相関

(3) *PTPRH* の DNA メチル化の mRNA 発現への影響を理解するため、肺がん細胞株を DNA メチル化阻害薬 5-aza-2'-deoxycytidine で処理したところ、*PTPRH* 発現の低い細胞株で DNA メチル化減弱に伴い *PTPRH* の mRNA 発現は回復した。*PTPRH* 高発現が DNA 低メチル化によって主に制御されていると考えられた。

(4) Infinium アレイ cg11261264 を含む比較的 CpG 豊富な領域の DNA メチル化レベルを MassARRAY を用いて評価した。Infinium アッセイで得られた DNA メチル化レベルは MassARRAY で得られた同一 CpG 部位 (CpG\_9.10) の DNA メチル化レベルとよく相関していた。非がん肺組織、非再発症例の肺がん組織、再発症例の肺がん組織における DNA メチル化パターンを図 2 に示した。ほとんどの CpG 部位において、再発例では非再発例と比較して DNA メチル化レベルは有意に減弱していた。CpG 部位 CpG\_9.10 における DNA 低メチル化は、男性、重喫煙歴、進行した病理病期、*EGFR* 野性型と有意に相関していた。

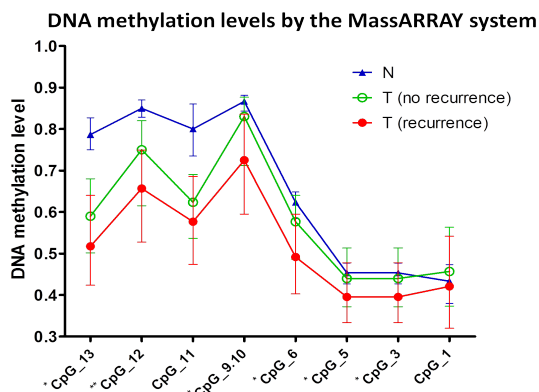


図 2 MassARRAY による *PTPRH* の DNA メチルレベル

(5) ROC 曲線分析で *PTPRH* の DNA メチル化レベルの最適なカットオフを定め、 Kaplan-Meier 法を用いると、肺がん組織における CpG\_9.10 の DNA 低メチル化症例は高メチル化症例と比較して無再発生存期間、全生存期間が有意に短かった (図 3)。Cox の比例ハザードモデルで多変量解析を行うと、*PTPRH* の DNA メチル化は、性別、病理病期とともに、無再

発生存期間の独立した予後予測因子であることが明らかになった。

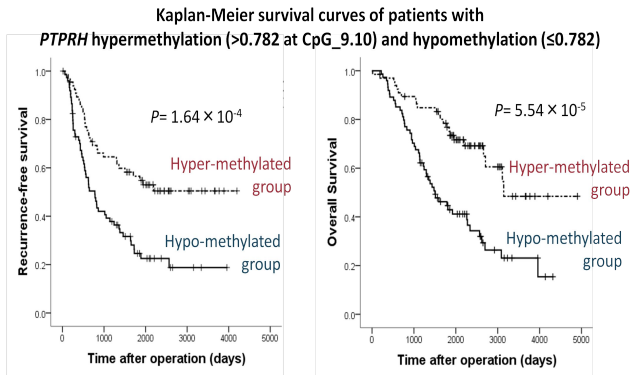


図 3 カプラン・マイヤー生存曲線

(6) 肺がん細胞株において *PTPRH* の siRNA による一時的ノックダウンを行い、細胞増殖やシグナル伝達への関与を検討したが、有意な変化を確認できていない。

(7) すでに臨床検体において調べている *EGFR* 遺伝子変異、*KRAS* 遺伝子変異、*EML4-ALK* 融合遺伝子などのドライバー遺伝子異常と相関する DNA メチル化の変化をきたしている遺伝子を抽出し、さらに DNA メチル化の変化と cDNA マイクロアレイによる発現との関連をもとに候補遺伝子の絞り込みを行った。パスウェイツールも利用し、分子経路に特有の DNA メチル化異常の関与を模索している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takashi Sato, Kenzo Soejima, Eri Arai, Junko Hamamoto, Hiroyuki Yasuda, Daisuke Arai, Kota Ishioka, Keiko Ohgino, Katsuhiko Naoki, Takashi Kohno, Koji Tsuta, Shun-ichi Watanabe, Yae Kanai, Tomoko Betsuyaku. Prognostic implication of *PTPRH* hypomethylation in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*. 査読有. 34 巻. 2015 年. 1137-1145. doi: 10.3892/or.2015.4082.

〔学会発表〕(計 2 件)

佐藤 崇、副島 研造、新井 恵史、浜本 純子、安田 浩之、荒井 大輔、石岡 宏太、扇野 圭子、猶木 克彦、河野 隆志、渡辺 俊一、金井 弥栄、別役 智子、非小細胞肺がんにおける *PTPRH* の DNA 低メチル化と予後への関与、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日~27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Takashi Sato, Kenzo Soejima, Eri Arai,

Junko Hamamoto, Hiroyuki Yasuda, Daisuke Arai, Kota Ishioka, Keiko Ohgino, Katsuhiko Naoki, Takashi Kohno, Koji Tsuta, Shun-ichi Watanabe, Yae Kanai, Tomoko Betsuyaku. Hypomethylation and Prognostic implication of PTPRH in non-small cell lung cancer. IASLC 16th World Conference on Lung Cancer. 2015年9月6日~9日、デンバー（アメリカ合衆国）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 崇 (SATO, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：20464836

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし