

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590840

研究課題名（和文）肝細胞癌における血清中のメチル化遺伝子を用いた腫瘍ダイナミクスの推定と臨床応用

研究課題名（英文）Prediction of tumor dynamics using amount of serum methylated DNA in human hepatocellular carcinoma

研究代表者

西田 直生志 (NISHIDA NAOSHI)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：60281755

研究成果の概要（和文）：腫瘍ダイナミクスを鋭敏に反映するマーカーに、癌特異的な遺伝子メチル化を応用した。26種の癌抑制遺伝子のDNAメチル化レベルを定量し、ROC解析にて肝癌部と非癌部の区別に有用な遺伝子としてAPC、GSTP1を同定した。APC遺伝子のメチル化DNAと非メチル化DNAの割合（Me/NMe DNA比）を、血清中のDNAから高感度に定量的解析するアッセイを確立した。血清100 μ l中のMe/NMe DNA比を求めたところ、肝癌症例では全例で検出可能であり、正常者ではMe-DNAは検出されなかった。肝癌再発の際には、AFPよりも早期に検出され、治療による低下もAFPより早期に認められた。この方法は、dormant therapyを始めとした化学療法の効果判定に有用なマーカーとなり得る可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We applied tumor specific methylated DNA for prediction of tumor dynamics in HCC cases. The methylated APC and GSTP1 genes were identified as useful marker for discrimination of HCC cells from non-cancerous liver. We established a sensitive assay for quantifying of methylated/non-methylated (Me/NMe) DNA ratio from serum of 100 μ l. We successfully detect Me-DNA from all HCC cases examined and no normal control cases showed Me-DNA. The Me/NMe DNA ratio elevated quicker than conventional HCC marker, AFP, when tumor showed recurrence. This novel assay could be a promising approach for judgment of therapeutic effect of HCC including dormant therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学、肝細胞癌、診断、腫瘍マーカー、エピジェネティクス、癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

|

進行癌の治療は、細胞障害性の薬剤による intensive chemotherapy が主流であったが、高齢者の癌患者の増加や癌治療の進歩に伴い、副作用が少なく、QOLを重視した治療法の必要性が高まっている。加えて、分指標的療法の出現に伴い、血管新生阻害剤など腫瘍の増殖抑制期間の延長を目的とした dormant chemotherapy は、広がりを見せている。しかし、dormant therapy は遠隔転移例などの高度進行癌を対象とするため、体内の腫瘍全量を把握する事が困難である。さらに腫瘍塊が縮小することは稀であるため、治療開始早期に効果を確認することができない。一方、高度進行癌では、血中に腫瘍由来遺伝子が循環しており、その量的変化を知ることによって治療早期の効果確認が可能になると考えられる。

遺伝子プロモーターの異常メチル化は癌化の初期で認められ、循環血中の異常メチル化遺伝子の量的変化は、治療効果の評価に有力な手段と成り得る。

2. 研究の目的

上記の背景に基づき、本研究では、分子標的療法の出現に伴い今後ますます発展する dormant therapy に対し、主に肝細胞癌(肝癌)を対象とし、腫瘍ダイナミクスを早期に反映する新規マーカーの開発に、癌特異的な遺伝子メチル化の変化を応用することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 循環血液中の遺伝子メチル化定量法の確立:

申請者が肝発癌の各段階(正常肝、慢性肝炎、境界病変、早期肝癌、進行肝癌)で、検討した遺伝子プロモーターのメチル化の変化のうち、肝癌組織と非癌部間での平均メチル化レベルの差が大きい上位の 10 座位 (HIC-1, APC, GSTP1, RASSF1A, CASP8, p16, SOCS1, RUNX3, RIZ1, MINT31) について、肝癌、慢性肝炎症例、正常人の血清中より DNA を抽出し bisulfite 処理後、COBRA 法、MSP 法にてメチル化の有無を判定した。また、それぞれの遺伝子プロモーター領域 (COBRA で解析した CpG 部位を含む) に TaqMan Probe を設定し RealTime PCR (MethyLight 法) により、bisulfite 処理後の DNA を増幅し、異常メチル化を受けている遺伝子を定量した。

(2) 肝癌の治療経過における循環血液中のメチル化遺伝子量の変化:

肝癌治療中の症例、特に進行肝癌で化学療法施行の症例において、治療前後の経過にわたり、血清中の上記の遺伝子プロモーター

のメチル化を定量的に解析し、治療効果との関連を検討した。

(3) 肝癌の化学療法の治療効果と遺伝子メチル化との関連の検討:

新規分子標的療法である sorafenib の治療効果と、RASSF1A, RASSF2 遺伝子のプロモーターメチル化が関連するかどうかを、循環血中の血清由来 DNA の遺伝子メチル化から予想することを試みた。

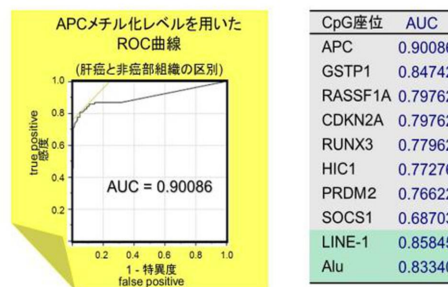
また 5-FU 代謝酵素 (DPYD) や RecQ helicase (WRN, BLM, RECQL, RecQ5, RTS) 遺伝子は、メチル化により不活化されるとの報告がある。DPYD が癌部特異的にメチル化で不活性化されていれば 5-FU の効果が増強され、また RecQ helicase 遺伝子の不活性化は Doxorubicin の治療効果と関連する事が予想される。この 2 剤は、肝動脈動注化学療法の際に頻用される細胞障害性薬剤であり、血清由来 DNA の遺伝子メチル化の定量値から、それらの治療効果予測を試みた。

3. 研究成果

本研究では、腫瘍ダイナミクスを鋭敏に反映する血清マーカーに、癌特異的な遺伝子メチル化の変化を応用することを目的とした。血清中の肝癌由来 DNA の検出に優れたメチル化マーカーを選択するため、133 例の肝癌例を対象とし、メチル化異常が知られている 26 種の遺伝子座位の癌、及び非癌部組織のメチル化レベルを COBRA 法にて定量し、ROC 解析にて癌部と非癌部の区別に有用な遺伝子座位と求めた。その結果、AUC が 0.8 以上を示す遺伝子は APC, GSTP1 であった (図 1)。

図 1

APC 遺伝子プロモーターのメチル化レベルは肝癌と非癌部を効率よく区別するマーカーである

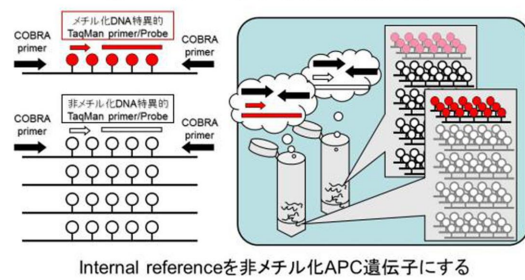


次に、APC 遺伝子のメチル化 DNA と非メチル化 DNA の割合 (Me/NMe DNA 比) を、血清中の遊離 DNA から高感度に検出、判定するため、APC プロモーターの CpG island に、Bisulfite 処理後の DNA をメチル化の状態に関わらず増幅するプライマーを設定し、さらにその内部にメチル化、非メチル化 DNA をそれぞれ特異的に増幅、検出する TaqMan プライマー、プローブを設定することにより、1 step で高感

度に Me/NMe DNA 比の定量的解析が可能となった (図 2)。

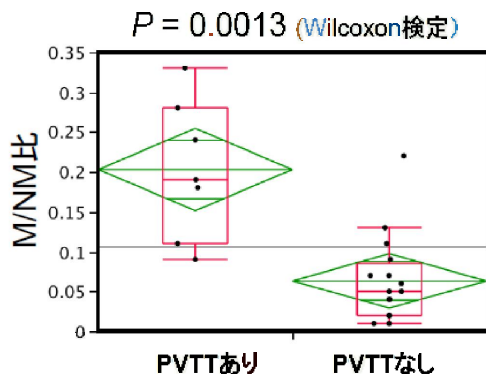
(図 2)

**高感度な“メチル化/非メチル化DNA”比の検出方法
(COBRAとMethyLight法の組み合わせ)**



肝癌組織 DNA を希釈し、このアッセイ系で Me/NMe DNA 比を求めたところ、COBRA 法の結果と一致した。次に、肝癌症例 23 例および正常者 8 例の血清 100 μ l より DNA を抽出、Bisulfite 処理し、上記の方法で Me/NMe DNA 比を求めたところ、肝癌症例の血清では全例で定量が可能であり、正常者では血清中に Me-DNA は検出されなかった。脈管浸潤のある肝癌例の血清では、脈管浸潤のない肝癌血清より有意に高レベルのメチル化 DNA が検出された (図 3 : $p=0.0013$)。

(図 3)



また肝癌再発の際には、従来の腫瘍マーカーである AFP よりも早期に検出され、治療による低下も AFP より早期に認められた。微量血清より、高感度に腫瘍由来 DNA に対する非腫瘍由来 DNA の比率 (Me/NMe DNA 比) を求めるアッセイ系を確立した。腫瘍の増殖状態ではこの比率が上昇し、非増殖状態では低下することが予想される。この方法は、dormant therapy を始めとした化学療法の効果判定に有用なマーカーになり得る可能性がある。

しかしながら、新規分子標的療法である sorafenib の治療効果と、RASSF1A, RASSF2 遺伝子のプロモーターメチル化、また 5-FU 代謝酵素 (DPYD) や RecQ helicase (WRN, BLM, RECQL, RecQ5, RTS) 遺伝子のメチル化による不活

化と肝動脈動注化学療法の治療効果に相関は見出し得なかった。

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 4 件)

- ① Nishida N, Goel A. Genetic and epigenetic signature of human hepatocellular carcinoma: A systematic Review. *Current Genomics* 12. 130-137, 2011. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21966251>
- ② Nishida N. Impact of Hepatitis Virus and Aging on DNA Methylation in Human Hepatocarcinogenesis. *Histol. Histopathol* 25. 647-654, 2010. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20238302>
- ③ Akitake R, Watanabe T, Zaima C, Uza N, Ida H, Tada S, Nishida N, Chiba T. Possible involvement of T helper type 2 responses to Toll-like receptor ligands in IgG4-related sclerosing disease. *Gut* 59. 542-545, 2010. 査読あり
doi:10.1136/gut.2009.200972
- ④ Nagasaka T, Tanaka N, Cullings H, Sun D, Sasamoto H, Uchida T, Koi M, Nishida N, Boland CR, Matsubara N, and Goel A. Analysis of fecal DNA methylation for detecting gastrointestinal neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 101. 1224-1258, 2009. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700653>

[学会発表] (計 14 件)

- ① 西田直生志. C 型慢性肝炎組織における癌抑制遺伝子メチル化と肝発癌. 第 19 回日本消化器関連学会週間 (第 15 回日本肝臓学会大会). ワークショップ 14: エピジェネティクスと消化器癌. 2011. 10. 20-22 (福岡).
- ② 西田直生志, 他. C 型肝炎関連発癌の初期段階における癌抑制遺伝子の異常メチル化の役割. 第 47 回日本肝臓学会総会、シンポジウム 1: ウイルス肝炎・肝癌制圧の分子基盤. 2011. 6. 2-3 (東京).
- ③ Nishida N, et.al. Characterization of step-wise accumulation of DNA methylation alterations during human hepatocarcinogenesis. (DDW Poster of

- Distinction). 81th Digestive Disease Week (DDW). 2011.5.7-10 (Chicago, IL).
- ④ Nishida N., et.al. Impact on aberrant methylation of a unique subset of tumor suppressor genes on the initial steps of human hepatocarcinogenesis. 62th Annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Parallel Session 31: Mechanism of hepatic carcinogenesis. 2011.11.4-8 (San Francisco, CA)
- ⑤ 西村貴文、他. Genetic and epigenetic analysis for the prediction of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. 第70回日本癌学会学術総会. 2011.10.3-5 (名古屋).
- ⑥ 西田直生志、他. ヒト肝発癌過程におけるゲノム・エピゲノムの包括的解析. 第18回日本消化器関連学会週間 (第14回日本肝臓学会大会). シンポジウム17: 肝臓のメカニズムと治療戦略. 2010.10.13. (横浜).
- ⑦ 西田直生志、他. 血清中の肝臓由来 DNA の定量化と治療マーカーへの応用. 第18回日本消化器関連学会週間 (第14回日本肝臓学会大会). ワークショップ7: 肝細胞癌に対する新たな診断・治療マーカーの確立. 2010.10.13. (横浜).
- ⑧ 西村貴文、他. 肝細胞癌に対する生体肝移植後の転移再発予測因子としての遺伝子メチル化の検討. 第69回日本癌学会総会. 2010.9.22-24 (大阪).
- ⑨ Nishida N. Epigenetic Alterations during HCV-related human hepatocarcinogenesis and its clinical implication. (Invited speaker). World Congress of Virus and Infections 2010, Hepatitis C Symposium. 2010.7.30-8.3 (Busan, Korea).
- ⑩ 西田直生志、他. 肝臓症例における血中メチル化DNAを用いた腫瘍ダイナミクスの推定. 第46回日本肝臓学会総会. 2010.5.28. (山形)
- ⑪ 西田直生志、他. 肝発癌過程における遺伝子メチル化の変化. 第17回日本消化器関連学会週間 (第13回日本肝臓学会大会). シンポジウム6: 消化器癌におけるエピジェネティクス. 2009.10.14. (京都).
- ⑫ 西田直生志. C型肝炎ウイルスによる肝発癌とDNAメチル化の不安定性 (Invited speaker). 第9回肝疾患フォーラム学術集会. 2009.10.10 (大阪).
- ⑬ 西田直生志. 肝臓癌の発生と遺伝子異

常-エピジェネティクスの面からみた肝臓癌診療への応用. (Invited speaker). 日本消化器病学会近畿支部例会. 第30回教育公演会. 2009.6.28 (京都).

- ⑭ 西田直生志、他. 肝発癌過程における遺伝子メチル化の変化と肝臓癌診断への応用. (第45回日本肝臓学会優秀演題: 同会長奨励賞受賞演題). 第45回日本肝臓学会総会. ワークショップ7: 肝臓癌発生・進展の分子機構と臨床への還元. 2009.6.5. (神戸)

[図書] (計2件)

- ① 西田直生志、医事出版社、肝臓フォーラム (西部) 記録刊行会 2010年、p196-210.
- ② 西田直生志、医学書院、消化器病学の進歩-原点から未来への情報発信、III 巻-複合領域、2009年、p54-60.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/shoukaki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田直生志 (NISHIDA NAOSHI)
近畿大学・医学部・准教授
研究者番号: 60281755

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

西村貴文 (NISHIMURA TAKAFUMI)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 40378732

福田善弘 (FUKUDA YOSHIHIRO)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 50127130