

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701008

研究課題名(和文) 肺がんを標的とした早期診断・治療応用を目指した基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research for early diagnosis of lung carcinomas by the application of DNA methylation analysis

研究代表者

横山 勢也 (Yokoyama, Seiya)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：20569941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：2012年の癌による死亡は年間約36万人で、日本における死因の第一位となっている。そのなかで一番多いのが肺癌であり、難治性癌の代表となっている。我々は、肺腫瘍の生物学的悪性度と一連のムチン抗原発現について詳細な分析を行い、ムチンの発現と予後の関連を明らかにしてきた。さらに、新規DNAメチル化解析(MSE)法を開発した。

33例の肺がん患者より腫瘍部・非腫瘍部を採取しMSE法によりムチン遺伝子のメチル化を評価した。我々の結果は、ムチン遺伝子の発現とDNAのメチル化に強い相関を示した。さらに、TET1がMUC1とMUC4の発現を制御するDNA脱メチル化プロセスの重要な要因であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is still a disease of high mortality, despite advanced diagnostic techniques. Mucins (MUC) play crucial roles in carcinogenesis and tumor invasion in lung neoplasms. We have developed a novel 'methylation-specific electrophoresis (MSE)' method to analyze the DNA methylation status of MUC1 and MUC4 by high sensitivity and resolution.

By using the MSE method, we evaluated lung tissue samples from 33 patients with various lung lesions. Our results showed that the TET1 was important factor for DNA demethylation to regulate the expression of MUC1 and MUC4 in lung cancer. The analysis of the epigenetic changes of MUC1 and MUC4 may be useful for diagnosing the carcinogenic risk and predicting outcome of patients.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：lung adenocarcinomas mucin DNA methylation demethylation ten eleven translocation

1. 研究開始当初の背景

2012年の癌による死亡は年間約36万人で、日本における死因の第一位となっている。そのなかで一番多いのが肺癌であり、難治性癌の代表となっている。2012年のデータでは肺癌の年間死亡数は約7万1500人、1998年に年間約5万人の死亡者数を超えてから、毎年約1500人以上死亡数が増加しており、今後も肺癌による死亡数の増加が予測されている。肺癌は、小細胞肺癌と非小細胞肺癌に分類され、肺癌の約85%を非小細胞肺癌が占める。非小細胞肺癌は、さらに腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、その他分類不能に分かれる。扁平上皮癌患者の95%以上、腺癌の75%が喫煙者であり、小細胞肺癌の97~99%が喫煙者である。肺癌では、I期とII期が手術の対象となっているが、おおよその5年生存率は、I期が80%、II期が40%、III期は20%となっており、早期発見が非常に重要である。加えて、転移はなく手術で完全に切除したと判断されても、すでに目に見えない転移が存在し、手術後に遠隔転移で再発することも少なくない。そのため、「肺癌の早期診断法の確立」あるいは、「悪性度を規定する分子標的の同定」が望まれている。

2. 研究の目的

未だ人類の手中にない肺癌を、高度に発達してきた画像診断に、悪性度を推し量る「質的診断」を加味して、治療戦略を明確に立てられる診断システムを構築、さらには、発癌リスクの評価システムを構築することを目標としている。

現在、ムチン分子ファミリーの異常発現が、癌の増殖・浸潤転移・抗癌剤耐性・免疫機構回避などの各プロセスにおいて、悪性化に関与することが数多く報告されはじめている (Nat Rev Cancer 9:874, 2009)。当研究室では、早くからムチンに注目して研究を進め、ムチン発現と予後との関係やその発現機構を世界に先駆けて明らかにしてきた。

これまでの当研究室における研究により下記の成果を上げている。

- (1) 肺腫瘍の生物学的悪性度と一連のムチン抗原発現について詳細な分析を行い、MUC1・MUC4の発現と予後の関連を明らかにしてきた。(Modern Pathol 20: 638, 2007. Lung Cancer 55: 195, 2007)
- (2) エピジェネティクスの観点において MUC1・MUC4の発現制御についても解析を進め、各々プロモーター領域のメチル化やヒストンの化学修飾による発現制御機構が存在することを世界に先駆けて明らかにしてきた。(Cancer Res, 68: 2708-2716, 2008. Br J Cancer, 100: 344-351, 2009.)
- (3) 従来のメチル化検出限界 5%を越え、0.1%の感度を有する、新規微量 DNA メチル化解析法である MSE (Methylation

Specific Electro phoresis) 法 (PCT/JP20 11/060339) を開発した。

そこで、これまでの研究成果を踏まえ、ムチン遺伝子の「DNA メチル化異常」を MSE 法により評価する事で、「悪性度」や「発癌リスク」を含めた質的診断にも応用できるマーカーの探索および、その有用性の評価を目的とする。本研究においては、肺癌組織検体における肺癌分類におけるメチル化異常のプロファイルと、多段階発癌におけるメチル化異常の指標を作る事で、癌の浸潤性や転移能という悪性度の診断方法を新規メチル化解析法である MSE 法を用いて確立する事を目的とする。

3. 研究の方法

鹿児島大学医歯学総合研究科先端のがん診断治療研究センターでは、トランスレーショナルリサーチを効率的に推進するために、「組織バンク」を整備し、共同利用・共同研究拠点を形成している。組織バンクには、鹿児島大学医学部附属病院からはもとより、県内外からの臨床検体 (術前・術後/細胞診サンプル・病理診断検体) が、現在進行形で蓄積され続けている。そこで、本研究は鹿児島大学大学院医歯学総合研究科倫理委員会の承認の上、研究に関してインフォームドコンセントを得た患者より採取したサンプルを使用する。

(1) DNA メチル化異常プロファイルの作成

各種ムチン遺伝子 (MUC1・MUC2・MUC3A・MUC4・MUC5AC 及び MUC17) を対象に、各種肺癌組織型における腫瘍部・非腫瘍部の DNA メチル化解析を MSE 法にて行う。同一検体における各種ムチンコアタンパク質の発現状況を免疫染色・ウエスタンブロットで、mRNA の発現状況をリアルタイム PCR で解析する。各解析データをつきあわせて集積する事で、ムチンプロファイルの構築を行う。

(2) 肺癌の組織型と DNA メチル化異常の相関

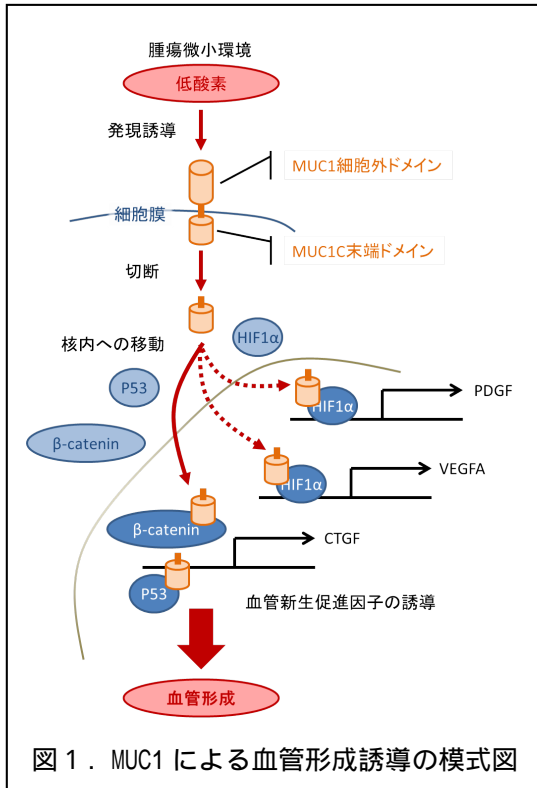
統計手法により、発癌のリスクファクターと DNA メチル化異常との関連性の検討、発癌過程における DNA メチル化異常の比較検討を行う。定量的な検討結果、検出の際の特異性、感度などを含め総合的に検討を行い、発癌リスクの診断や癌スクリーニングに有用な標的遺伝子を検索し、本研究の有用性を評価する。

4. 研究成果

(1) MUC1 発現の意義解明

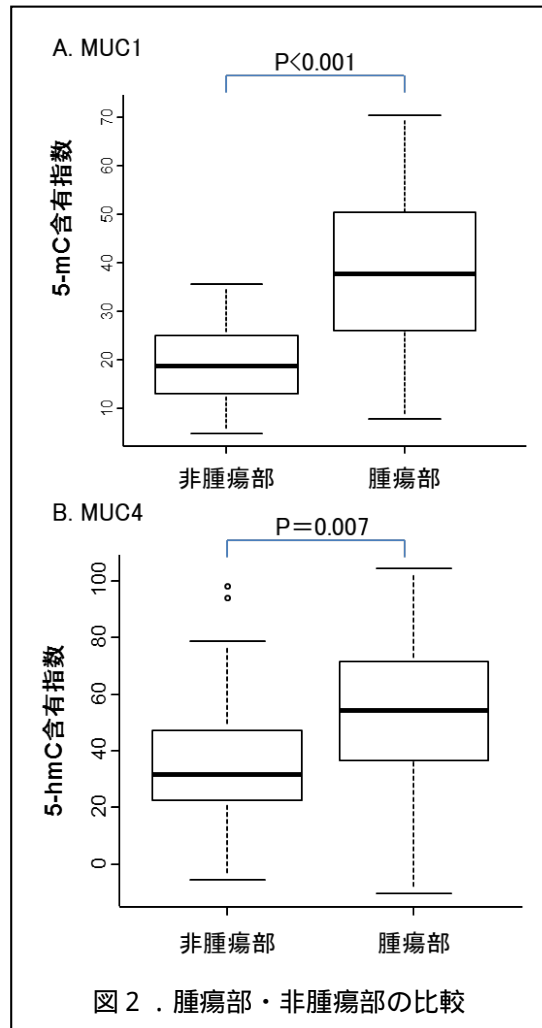
低酸素環境における MUC1 発現の機能的意義の解明を行い、以下の結果を得た。低酸素下 (酸素濃度 1%) で培養した肺癌の培養上清には血管内皮細胞の管腔形成誘導能がある。転移巣からの肺癌細胞株では MUC1 の低酸素応答性の発現上昇が顕著で、MUC1-cytoplasmic tail (MUC1-CT) が膜面から核へ移行する。核へ移行した MUC1-CT

は p53 や カテニンを伴い血管新生因子である CTGF の転写及び分泌を強く促進する。低酸素性 MUC1 発現は他の血管新生因子 VEGFA や PDGFB の分泌促進にも寄与する。これら血管新生因子の制御を介して MUC1 が血管内皮細胞の血管新生能を亢進させる「Key regulator」の一つであることが明らかになった。これらの知見は、低酸素環境に曝された癌細胞が MUC1 を介して転移能を獲得する可能性を示唆している（図 1）。

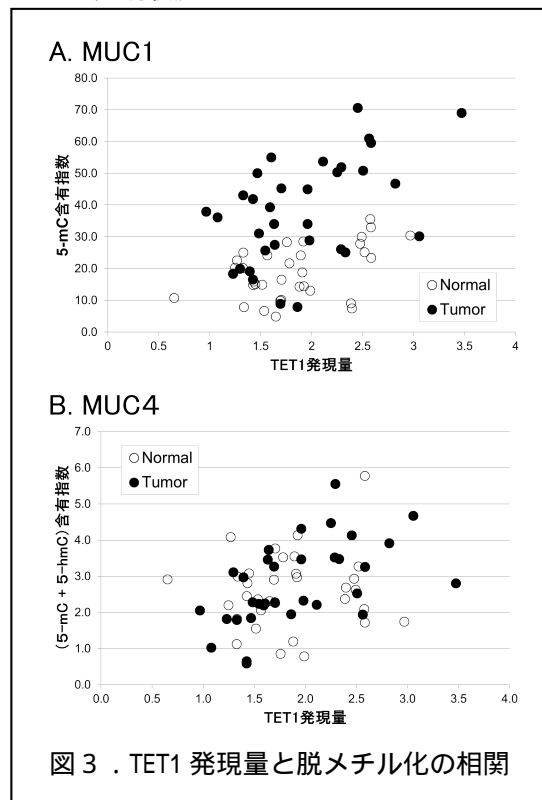


(2) 肺癌組織検体におけるムチン遺伝子のメチル化状況

肺癌組織におけるムチン遺伝子のメチル化状況の変化を MSE 法により評価し、以下の結果を得た。腫瘍部と非腫瘍部を比較した場合、MUC1 遺伝子のプロモーター領域において、5 位がメチル化されたシトシン残基 (5-mC) 含有量が腫瘍部において有意に亢進していた。MUC4 遺伝子のプロモーター領域においては、5-mC の酸化物である 5 位がヒドロキシル化されたシトシン残基 (5-hmC) 含有量が腫瘍部において有意に亢進していた（図 2）。組織における MUC1 遺伝子の発現は、5-mC 含有量と有意な相関を示した。MUC4 においては、遺伝子発現状況は 5-mC 含有量のみでは相関を示さなかった。しかし、5-mC 含有量に加え 5-hmC 含有量を勘案した場合、遺伝子発現と相関を示した。これらの結果により、肺組織においても、これまでに報告してきたエピジェネティックな発現制御によりムチン遺伝子の発現が制御されている可能性を示唆している。



(3) 肺癌組織検体における脱メチル化因子の発現状況



肺組織検体におけるムチン遺伝子の脱メチル化状況と、エピジェネティックな発現制御に関わる脱メチル化因子群 (Ten eleven translocation (TET), Activation-induced cytidine deaminase (AID), Glial cells missing (GCM)) およびメチル化因子群 (DNA Methyltransferases (Dnmt)) の発現状況との相関を評価し、以下の結果を得た。MUC1 遺伝子の脱メチル化において、TET1 発現が高い相関を示した。MUC4 遺伝子においては、5-mC 含有量と 5-hmC 含有量を総合的に勘案した場合、TET1 発現量と相関を示した(図3)。これらの結果により、肺癌組織においてムチン発現 (MUC1 および MUC4) を引き起こすプロモーター領域の脱メチル化は、TET1 発現により誘導されていることが示唆された。

(4) 小腸癌組織標本における各ムチン分子のコア蛋白発現状況の解析

肺癌におけるムチン発現様式との比較を行うために、小腸癌におけるムチンの臨床病理学的意義の解明を行った。小腸癌 60 症例を解析し、MUC1 (図4)、MUC5AC および MUC16 の発現が小腸癌において予後不良因子であることを報告した。

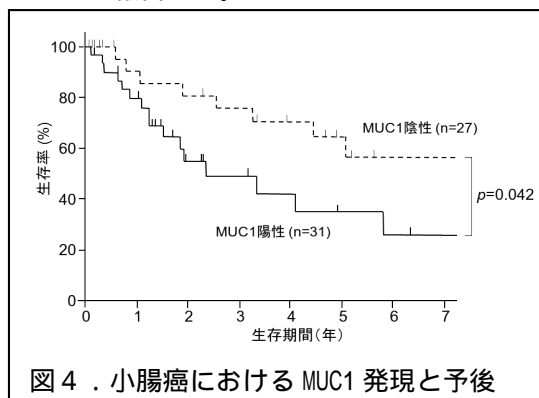


図4 . 小腸癌における MUC1 発現と予後

(5) 考察

肺癌組織検体におけるムチン遺伝子の詳細なメチル化状況と癌の関係を明らかにすることで、肺癌の組織型・進行ステージの診断材料になり、癌の早期発見・発癌リスク評価が可能になると考えられる。ひいては、DNAメチル化状況を精査することで癌患者の再発リスク評価を含めた病態経過観察、あるいは、一般集団を対象とした癌の検診が可能になると考えられ、関連分野へのインパクトは極めて大きいと思われる。DNAメチル化の解析によって肺癌の組織型・進行ステージを診断する本研究の成果はヒトゲノムに関するトランスレーショナルリサーチの典型的な例であり、これまでにない新しい診断技術として注目に値すると考えられる。肺癌の早期発見のための検査法の開発という、国民の健康に直結する公共性の高い先進的な研究であり、低侵襲性のサンプル (BAL 液や喀痰) に応用できれば、一般的な臨床検査としての経済効果も高く、医学的・社会的に重要であると考えられる。

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14件)

1. Yokoyama S, Kitamoto S, Higashi M, Goto Y, Hara T, Ikebe D, Yamaguchi T, Arisaka Y, Niihara, Nishimata H, Tanaka S, Takaori K, Batra S K, Yonezawa S: Diagnosis of pancreatic neoplasms using a novel method of DNA methylation analysis of mucin expression in pancreatic juice. *PLoS ONE*, 9(4):e93760, 2014, 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0093760.

2. Shibahara H, Higashi M, Koriyama C, Yokoyama S, Kitazono I, Yasuhiro K, Narita M, Kuze S, Takanori K, Mita S, Arai T, Kato T, Yuasa N, Yamaguchi R, Kubota H, Suzuki H, Baba S, Rousseau K, Batra S K, Yonezawa S: Pathobiological implications of mucin (MUC) expression in the outcome of small bowel cancer. *PLoS ONE*, 9(4):e86111, 2014, 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0086111.

3. Kitazono I, Higashi M, Kitamoto S, Yokoyama S, Horinouchi M, Osako M, Shimizu T, Tabata M, Batra S K, Goto M, Yonezawa S: Expression of MUC4 mucin is observed mainly in the intestinal-type of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Pancreas*, 42(7):1120-1128, 2013, 査読有, doi:10.1097/MPA.0b013e3182965915.

4. Kitamoto S, Yokoyama S, Higashi M, Yamada N, Takao S, Yonezawa S: MUC1 enhances hypoxia-driven angiogenesis through the regulation of multiple proangiogenic factors. *Oncogene*, 32(39):4614-4621, 2013, 査読有, doi:10.1038/onc.2012.478.

5. Matsuno YK, Dong W, Yokoyama S, Yonezawa S, Narimatsu H, Kameyama A: Identification of mucins by using a method involving a combination of on-membrane chemical deglycosylation and immunostaining. *Journal of Immunological Methods*, 394(1-2):125-30, 2013, 査読有, doi:10.1016/j.jim.2013.06.002.

6. 東美智代、柴原弘明、後藤優子、平木 翼、横山勢也、米澤 傑: 特集: 粘液産生性胆道系腫瘍の再発 - エビデンスとしての画像と病理 「胆道系腫瘍における粘液産生の組織学的側面」. *胆と膵* 34(5): 353-358, 2013、査読無

7. 米澤 傑、東美智代、横山勢也、後藤優子、北島信一： 特集 胆膵病理 II:胆膵共通のトピックス【胆膵共通疾患とトピックス】膵胆道腫瘍における MUC 発現 . 病理と臨床 31(4):399-408, 2013、査読無

8. Tamura Y, Higashi M, Kitamoto S, Yokoyama S, Osako M, Horinouchi M, Shimizu T, Tabata M, Batra SK, Goto M, Yonezawa S: MUC4 and MUC1 expression in adenocarcinoma of the stomach correlates with vessel invasion and lymph node metastasis: an immunohistochemical study of early gastric cancer. PLoS ONE, 7(11):e49251, 2012, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0049251.

9. Kitamoto S, Yokoyama S, Higashi M, Yamada N, Matsubara S, Takao S, Batra SK, Yonezawa S :Expression of MUC17 is regulated by HIF1 α -mediated hypoxic responses and requires a methylation-free hypoxia responsible element in pancreatic cancer. PLoS ONE, 7(9):e44108, 2012, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0044108.

10. Yonezawa S, Kitajima S, Higashi M, Osako M, Horinouchi M, Yokoyama S, Kitamoto S, Yamada N, Tamura Y, Shimizu T, Tabata M, Goto M: A novel anti-MUC1 antibody against the MUC1 cytoplasmic tail domain: use in sensitive identification of poorly differentiated cells in adenocarcinoma of the stomach. Gastric Cancer, 15(4), 370-381, 2012, 査読有, doi: 10.1007/s10120-011-0125-2.

11. Yokoyama S, Kitamoto S, Yamada N, Houjyo I, Sugai T, Nakamura S, Arisaka Y, Takaori K, Higashi M, Yonezawa S: The application of methylation specific electrophoresis (MSE) to DNA methylation analysis of the 5' CpG island of mucin in cancer cells. BMC Cancer, 12:67, 2012, 査読有, published online, doi: 10.1186/1471-2407-12-67.

12. Higashi M, Yamada N, Yokoyama S, Kitamoto S, Tabata K, Koriyama C, Batra SK, Yonezawa S: Pathobiological implications of expression of MUC16/CA125 in intrahepatic cholangiocarcinoma-mass forming type. Pathobiology, 79(2): 101-106, 2012, 査読有, doi: 10.1159/000335164.

13. 東美智代、横山勢也、北本 祥、米澤 傑： 胆管内乳頭状腫瘍 (IPNB) : 粘液, MUC 発現からのアプローチ . 肝胆膵 65(3):487-494, 2012、査読無

14. 米澤 傑、東美智代、横山勢也、北本 祥、山田宗茂： 癌におけるムチンの臨床病理学的意義および診断への応用 - 難治性膵胆管癌の早期診断に向けて - . MEDICAL TECHNOLOGY 40(4):419-425, 2012、査読無

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Yokoyama S, Kitamoto S, Tsutsumida H, Wakimoto J, Higashi M, Yonezawa S: TET1 was important factor for DNA demethylation to regulate the expression of MUC1 and MUC4 in lung cancer, 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 5th-8th July 2014, International Congress Center Munich (Munich, Germany), 発表確定

2. Yonezawa S, Yokoyama S, Kitamoto S, Higashi M: Application of a novel DNA methylation analysis method (MSE) for mucin expression in pancreatic, biliary and pulmonary neoplasms, MUCINS IN HEALTH AND DISEASE (12th International Workshop on Carcinoma-associated Mucins), 27th-31th July 2013, Robinson College (Cambridge, UK)

3. Yonezawa S, Yokoyama S, Higashi M, Goto Y, Kitajima S: Diagnosis of pancreatic neoplasms by application of a novel DNA methylation analysis method (MSE) for mucin expression in pancreatic juices, Worldwide Innovative Networking in personalized cancer medicine, 10th-12th July 2013, Le Palais des Congres (Paris, France)

4. Yonezawa S, Yokoyama S, Goto Y, Higashi M: Examination of mucin expression including a novel DNA methylation analysis method (MSE): Its application for diagnosis of human pancreatic neoplasms, 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research, 14th-16th February 2013, William Willis Hall (Kagoshima, Japan)

5. Yokoyama S, Kitamoto S, Tsutsumida H, Wakimoto J, Higashi M, Yonezawa S: DNA promoter methylation status and mRNA expression of MUC1 in human lung cancer, 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research, 14th-16th February 2013, William Willis Hall (Kagoshima, Japan)

6. Kitamoto S, Yokoyama S, Higashi M, Yamada N, Takao S, Yonezawa S: MUC1 Enhances Hypoxia-Driven Angiogenesis

Through the Regulation of Multiple Proangiogenic Factors, 2012年10月4日～6日, 京都国際コンベンションセンター (京都)

7. Yokoyama S, Kitamoto S, Hara T, Arisaka Y, Takaori K, Yamamoto T, Niihara T, Nishimata H, Tanaka S, Higashi M, Yonezawa S: The Application of New DNA Methylation Analysis, Designated Methylation Specific Electrophoresis (MSE) for Pancreatic Juice Analysis, 2012年10月4日～6日, 京都国際コンベンションセンター (京都)

8. Kitamoto S, Higashi M, Yokoyama S, Takao S, Yonezawa S: CTGF is enhanced by hypoxia through nuclear recruitment of MUC1 in pancreatic cancer, 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 2012年7月7～10日、バルセロナ国際会議場 (Barcelona, Spain)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

1. 名称: METHOD FOR DIAGNOSING TYPE OF PANCREATIC TUMOR

発明者: 横山勢也、米澤 傑、北本 祥

権利者: 鹿児島大学

種類: 特許

番号: 国際出願番号 2012JP067262

出願年月日: 2012年6月29日

国内外の別: 外国

2. 名称: NOVEL DNA METHYLATION ANALYSIS METHOD

発明者: 横山勢也、米澤 傑

権利者: 鹿児島大学

種類: 特許

番号: 国際出願番号 2011JP060339

出願年月日: 2011年4月21日

国内外の別: 外国

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

鹿児島大学医歯学総合絵研究科先進治療科学専攻腫瘍学講座人体がん病理学

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~byouri2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

横山 勢也(YOKOYAMA SEIYA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 20569941