

15 - 20 がんの早期診断及び予後の予測を目指したヒト多段階発がん過程における DNA メチル化の変化に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 金井 弥 栄

研究成果の要旨

DNA メチル化の変化に着目したがんの早期診断・病態診断の実用化を目指して研究を進めた。消化器がん等において HRK 遺伝子・CHFR 遺伝子・SFRP1 遺伝子・BNIP3 遺伝子等が DNA メチル化により不活化されていることを示した。DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT1 の発現亢進が、細胞増殖活性の亢進に先行して多段階発がん過程に早期から寄与し、CpG アイランドメチル化形質と相関して症例の予後不良因子となることを示した。加齢によって DNA メチル化の生じる遺伝子の臓器・組織特異性を明らかにし、その DNA メチル化の亢進あるいは減弱が諸臓器におけるがんの早期診断・病態診断の指標として有用と考えられる遺伝子の特定を進めた。特に、FLNc 遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドの中心部と p41Arc 遺伝子 非プロモーター領域 CpG アイランドの 5' 領域における DNA メチル化は、胃がん手術材料より得られた非がん胃粘膜において既に有意に亢進しており、胃発がんのリスク評価の指標となると考えられた。「DNA メチル化診断チップ」の開発に着手し、限界希釈メチル化特異的 PCR (MSP) 法・リアルタイム定量 MSP 法でがん特異的メチル化 DNA を検出することにより、がんの血清診断の感度を飛躍的に向上させた。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
金井 弥 栄	国立がんセンター研究所 部長	ヒト多段階発がんにおける DNA メチル化の変化
豊田 実	札幌医科大学 講師	DNA メチル化によって不活化されるがん関連遺伝子の解析
田村 元	山形大学医学部 助教授	がんならびに前がん病変における DNA メチル化の変化
金田 篤 志	*1 国立がんセンター研究所 研究員	胃がんにおける DNA メチル化
三原 真 美	*2 国立がんセンター研究所 研究員	胃がんにおける DNA メチル化
守口 和 基	*3 国立がんセンター研究所 研究員	胃がんにおける DNA メチル化
北澤 荘 平	神戸大学大学院 助教授	DNA メチル化解析のヒトがん病理組織標本への展開
日比 健 志	名古屋大学大学院 助手	血清中がん特異的メチル化 DNA の検出によるがんの早期診断
井村 穰 二	*4 茨城県立中央病院・地域がんセンター 医長	膵がんにおける種々の関連遺伝子の methylation 状態と生物学的特性の比較検討

*1：平成15年4月1日～平成16年3月31日

*2：平成16年4月1日～平成16年9月30日

*3：平成16年10月1日～平成17年3月31日

*4：平成16年4月1日～平成17年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

本研究では、DNA メチル化によって不活化されるがん関連遺伝子の同定を進める。諸臓器の前がん状態・前がん病変ならびにがんにおける DNA メチル化の変化やその背景にある DNA メチルトランスフェラーゼの異常を包括的に解析し、臨床病理学的因子との相関を詳細に記載して、ヒト多段階発がん過程における DNA メチル化の変化の意義を見極める。以上より、DNA メチル化の変化に着目して症例の病態を把握し、適切な治療法を選択したり予後を予測出来るようにする。更に、「DNA メチル化診断チップ」開発・血清中メチル化 DNA 検出などにより、高い感度と特異性を兼ね備えた低侵襲性の検査法を確立し、発がんリスクの評価やがんの早期診断の実用化をめざす。

2 研究成果

(1) DNA メチル化によって不活化されるがん関連遺伝子の同定

分担研究者がゲノム規模で DNA メチル化の変化をスクリーニングする方法として開発したメチル化 CpG アイランド増幅 (MCA) 法により、胃がん・口腔扁平上皮がん・腎がん・前立腺がんにおいて DNA メチルにより不活化している遺伝子をスクリーニングした。

同定された遺伝子のひとつである HRK は、Bcl-2 遺伝子ファミリーの中の BH3 only サブファミリーに属している。がん細胞株において、HRK 遺伝子の DNA メチル化が亢進すると、ヒストン脱アセチル化と発現の消失が起こることを示した。検討の対象とした大腸がん症例の 24% と胃がん症例の 17% に HRK 遺伝子の DNA メチル化亢進を認め、同遺伝子の DNA メチル化ががんの CpG アイランドメチル化形質と有意に相関することがわかった。DNA メチル化阻害剤である 5-アザデオキシシチジン処理により、HRK 遺伝子の発現の回復を認めた。HRK 遺伝子の DNA メチル化亢進の不活化は、p53 の異常を介さないがん化経路に重要であると考えられた。

培養がん細胞の DNA メチル化阻害剤 5-アザデオキシシチジンならびにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A 処理により発現が誘導される遺伝子として、WNT シグナル伝達系の負の調節遺伝子である、secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) を同定した。同遺伝子は、大腸がんにおいて高頻度に DNA メチル化亢進により不活化されていた。SFRP1 の DNA メチル化亢進は、APC

遺伝子や β -カテニン遺伝子に変異を有する大腸がん細胞株においても認められ、TCF-4 の活性化には、APC 遺伝子や β -カテニン遺伝子の変異に加えて SFRP1 の DNA メチル化による WNT シグナル伝達系の制御異常が寄与することが示唆された。

前期チェックポイント遺伝子である CHFR が大腸がん・胃がんにおいて高頻度に DNA メチル化によって不活化されていることがわかった。CHFR 遺伝子が DNA メチル化亢進により不活化されている培養がん細胞においては、ドセタキセルやパクリタキセルなどの微小管障害剤投与による細胞周期の停止が起こらなかった。CHFR 遺伝子の DNA メチル化を認める腫瘍が微小管障害剤に高い感受性を示すことと、CHFR 遺伝子の DNA メチル化を指標として抗がん剤感受性の予測が可能になることが期待される。

腫瘍免疫には、CD4+細胞が MHC クラス II を介して腫瘍細胞を認識することが重要であることが示唆されている。約 40 種類の大腸がん・胃がんおよび白血病細胞株において、MHC クラス II 抗原のひとつである HLA-DR の発現消失を認めた。しかし、HLA-DR 遺伝子のプロモーター領域には DNA メチル化亢進を認めず、MHC クラス II 分子の転写共役因子である CIITA 遺伝子の発現が、一部のがん細胞で消失していることがわかった。CIITA 遺伝子の DNA メチル化亢進が、がん細胞が免疫監視機構を回避するのに重要である可能性が示唆された。

消化器がんにおいて低酸素誘導性アポトーシスに関連する遺伝子群に関して DNA メチル化亢進の有無を解析したところ、BNIP3 遺伝子のみが大腸がん・胃がん・膵がん細胞株ならびに臨床検体において高頻度に DNA メチル化を受けていることがわかった。BNIP3 遺伝子の DNA メチル化が亢進しているがん細胞株では遺伝子発現の消失もしくは低下を認め、5-アザデオキシシチジン処理による再発現が確認された。現在、DNA メチル化阻害剤により BNIP3 遺伝子の発現を誘導することにより、がん細胞にアポトーシスを誘導することができるかどうかの検討を行っている。

(2) 多段階発がん過程における DNA メチルトランスフェラーゼの異常ならびに DNA メチル化の変化の意義

病理アーカイブズに蓄積された莫大な量の生検・手術材料を DNA メチル化の評価に供しうるかどうかを確認するため、ホルマリン固定・パラフィン包埋がメチル化 DNA 検出に及ぼす影響を評価したところ、ホルマリン固定は概してメチル化シトシンの検出を妨げず、むしろホルマリンによる DNA の断片化がバイサルファイト処理後の

PCR 産物の検出効率を高めることがわかった。通常の病理組織検体のうち生検・手術検体の大部分が DNA メチル化解析に使用可能なことが確認された。マイクロダイセクション検体を、効率よく DNA メチル化解析に供すために開発したアガロースビーズ封入バイサルファイト変換法に、更に改良を加えた。同法を適用して、膵がんを高頻度に見られる神経周囲浸潤の分子機構の解明を試みた。末梢神経と腫瘍細胞に発現する神経成長因子 NGF と TrkA の相互作用が神経周囲浸潤の成因となる可能性を考慮し、膵がん症例手術材料より多数のマイクロダイセクション検体を採取して DNA メチル化の状態を詳細に解析した。TrkA 遺伝子発現が、腫瘍浸潤部位局所での非 CpG アイランド領域の AP-1 結合配列の DNA メチル化によって亢進する可能性が示された。

同様に多数の臨床検体における解析から、がん関連遺伝子の DNA メチル化は加齢によって一般に進展・拡大するが、APC 遺伝子・RASSF1A 遺伝子・E-カドヘリン遺伝子・DAPK 遺伝子・p16 遺伝子等の DNA メチル化亢進は臓器・組織特異性が極めて高いことがわかった。このような加齢に伴う DNA メチル化の状態の変化をふまえて、発がんのリスク評価やがんの早期診断の指標として有用な遺伝子を選択する必要があると考えられた。RUNX3 遺伝子プロモーター CpG アイランド内の 8 領域についてメチル化特異的 PCR (MSP) 法により胃がん細胞株における DNA メチル化の広がりを検討したところ、転写開始点を中心とした領域の DNA メチル化が RUNX3 遺伝子の発現制御に重要であり、同遺伝子の DNA メチル化は CpG アイランドの両端から転写開始点に向かって次第に拡大することがわかった。難治がんである膵がんにおいても、多数のがん関連遺伝子が DNA メチル化亢進によって不活化されることを示した。

胃がん組織において正常胃粘膜に比し 5-メチルシトシンの総量の低下を認めたと、このようなゲノム全体の低メチル化と LINE1 繰り返し配列の DNA メチル化減弱とはよく相関した。ゲノム全体の DNA メチル化減弱がある閾値を超えた時、プロモーター領域の DNA メチル化減弱が複数の遺伝子で同時に進む可能性があると考えられた。胃がんにおける SNGG 遺伝子や MAGE 遺伝子群の DNA メチル化の減弱は、進行がんやリンパ節転移陽性例で高頻度に検出された。

多段階発がん過程において、DNA メチル化のパターンの変化の背景となる要因として、DNA メチルトランスフェラーゼの異常にも着目してきた。ヒトの主要な DNA メチルトランスフェラーゼをコードする DNMT1 遺伝子の変

異を大腸がん症例において初めて証明したが、DNMT1 の遺伝子変異によるゲノム規模の DNA メチル化の変化はヒトの発がん過程における主要な事象ではないと考えられた。

他方で、DNMT1 の mRNA 発現は、正常肝組織に比し、肝細胞がんに対する前がん状態と考えられる慢性肝炎ないし肝硬変症の段階ですでに有意に亢進し、肝細胞がんにおいて更に亢進した。免疫組織化学的検討では、DNMT1 の蛋白発現亢進と肝細胞がんの分化度や門脈侵襲の有無との間に有意な相関があることがわかった。肝細胞がん症例の無再発生存率は、DNMT1 の蛋白発現亢進を示す肝細胞がん症例において有意に低かった。DNMT1 の発現は前がん状態から既に亢進し、肝細胞がんの悪性進展に至るまで、肝多段階発がん過程に継続して寄与する可能性があると考えられた。

DNMT1 発現亢進は、低分化胃がんを高頻度に認められ、hMLH1 遺伝子・THBS-1 遺伝子の CpG アイランドにおける DNA メチル化亢進・E-カドヘリン発現低下ならびに胃がんの CpG アイランドメチル化形質と有意に相関した。胃がんの発生過程において、DNMT1 の蛋白発現亢進は必ずしも細胞増殖活性の亢進に付随する事象ではなく、EB ウイルス感染等の発がん要因に関連して、低分化腺がん等の発生に特に寄与する可能性があると考えられた。

尿中にある発がん物質に既に暴露されて前がん段階にある可能性のある膀胱がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん移行上皮において、細胞増殖活性の亢進に先行して DNMT1 の蛋白発現が既に有意に亢進し、多数の CpG アイランドにおける DNA メチル化の蓄積が既に起こっていることがわかった。DNMT1 の蛋白発現亢進は、悪性度の高い膀胱の結節状浸潤がんの前駆病変と理解されている広汎進展上皮内がんの成立に寄与する可能性がある。膀胱がんの多段階発生過程において、DNMT1 の蛋白発現亢進が実際に DNA メチル化の局所的な亢進に帰結している可能性があると考えられた。

難治がんである浸潤性膵管がんはしばしば慢性膵炎に引き続いて発生するが、末梢膵管上皮における DNMT1 の蛋白発現は、遷延する炎症の存在を示唆するリンパ球浸潤と腺房の萎縮を伴うとき既に有意に亢進していた。DNMT1 蛋白発現陽性率は前がん病変 PanIN から浸潤性膵管がんへと段階的に亢進し、浸潤性膵管がんにおける DNMT1 発現レベルは患者の年齢と相関せず、わが国の「膵がん取り扱い規約」における t カテゴリーならびに診断時の病期と有意に相関した。更に、DNMT1 高発現群が有意に予後不良であることがわかった。手術材料・生検材

料において抗 DNMT1 抗体を用いた免疫組織化学的検討を施行することにより、症例の予後の予測に有益な情報が得られる可能性があると考えられた。

(3) DNA メチル化の変化を指標とする胃がん発生リスク評価

p16 遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドの辺縁部、HRASLS 遺伝子・FLNc 遺伝子・HAND1 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドの中心部、p41Arc 遺伝子の非プロモーター領域の CpG アイランドの 5' 領域と、がん抑制遺伝子 LOX のプロモーター領域の CpG アイランドの中心領域、候補がん抑制遺伝子 TM のプロモーター領域 CpG アイランド辺縁部の合計 7 領域について、DNA メチル化の程度を定量 MSP 法により評価した。いずれの領域についても、胃がん症例非がん胃粘膜において非胃がん症例（検診症例）胃粘膜に比し DNA メチル化指数（メチル化 DNA 量のメチル化 DNA と非メチル化 DNA 量の総和に対する比）は高値であった。特に、FLNc ならびに p41Arc 遺伝子においては、両者の DNA メチル化指数の間に統計学的に有意な差が認められた（それぞれ $P=0.02$ ならびに $P=0.04$ ）。これらの領域における DNA メチル化の程度の定量的評価が、胃がん発生のリスク予測に結びつく可能性があると考えられた。

(4) DNA メチル化の変化を指標とする診断技術の確立

「DNA メチル化診断チップ」の基材として、ハイブリダイゼーション効率とチップの均質性に優れた繊維型 DNA チップを採用した。この基材にメチル化特異的および非メチル化特異的プローブを搭載し、蛍光標識した PCR 産物をハイブリダイズしてシグナル強度を定量し、がん検体と非がん検体間等におけるメチル化特異的プローブと非メチル化特異的プローブのシグナル比率を比較するものとする。すでに 5 遺伝子搭載のチップを試作して安定的な反応条件を決定した。現在は、本研究班の成果に基づきその DNA メチル化の状態ががんの早期診断や病態診断の指標となることが期待される遺伝子等を含む、20 遺伝子を搭載した「DNA メチル化診断チップ」の作製に着手している。

胃がん組織において p16 遺伝子の DNA メチル化を呈する症例の 26%において、血清中にも同様の異常がみられ、同遺伝子の DNA メチル化は胃がん血清診断の指標として用いようと考えられた。大腸がん切除後に再発した患者の 69%において、血清中にも p16 遺伝子の DNA メチル化を認め、MSP 法により血清からの再発診断が可能である

と考えられた。つづいて、血清診断の感度向上を目指し、限界希釈 MSP 法の予備実験を行った。p16 遺伝子がメチル化された DNA とメチル化されていない DNA を 1:100000 の割合で混合し PCR による増幅が確認できる限界まで希釈し、適切な PCR 条件を設定することにより、非メチル化 DNA に反応障害を受けることがないようにして、メチル化 DNA を検出できることを確かめた。つづいて、がん組織において p16 遺伝子の DNA メチル化が検出されることを確認している大腸がん患者血清から抽出した DNA に限界希釈 MSP 法を適用したところ、66%の血清中よりメチル化 DNA を検出し得た。従来の MSP 法に比し検出率は飛躍的に向上したが、陰性対照とした健常者の血清中あるいはがん組織において p16 遺伝子の DNA メチル化を示さない大腸がん患者血清には DNA メチル化を認めず、がん特異性が完全に保持されていたことが確かめられた。臨床病理学的所見との比較では、stage もしくは Dukes A の段階から大腸がん患者血清よりがん細胞由来 DNA を検出できることがわかったので、限界希釈 MSP 法が血清によるがんの早期発見に有用であると考えられた。リアルタイム定量 MSP 法により血清中のメチル化 DNA と非メチル化 DNA の定量を試みた。偽陽性を生じないまま、がん組織において p16 遺伝子の DNA メチル化が検出されることを確認している大腸がん患者の 46%を陽性と判定できるように、DNA メチル化指数の閾値を設定することができた。今後、血清診断の指標として有用な遺伝子を複数組み合わせることにより、特異度を保ったまま更に検出感度を向上させ、検診におけるスクリーニングとしての実用化を目指したいと考える。

3 倫理面への配慮

平成 15 年厚生労働省告示第 255 号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、所属施設の倫理審査委員会の承認を得る等して倫理面に充分配慮して研究を進めた。手術で摘出した標本を診断のために検索した後に、残余の試料を医学の進歩を目的とした種々の研究に使わせていただくこと等に関して、患者に説明の上、文書で同意を得た。臨床症例の手術標本からの組織の採取にあたっては、患者の治療方針決定のための病理学的検索を切除後迅速かつ優先して行い、その残余の組織を研究に用いることにより患者への不利益はないようにした。組織検体の由来する患者の臨床情報のうち本研究に必要なものは、あらかじめ診療録より調査しておき、解析は連結可能匿名化して行い、患者のプライバシーを厳守した。