

168. 消化管癌 DNA メチル化と抗癌剤感受性に基づく個別化治療

楠本 哲也

Key words: ゲノムワイド DNA メチル化, LINE-1, 消化管癌, 染色体不安定性

*国立病院機構 九州医療センター
がん臨床研究部/消化器センター 外科

緒言

進行または再発消化管癌の治療成績向上のためには、手術療法に加え化学療法・放射線療法を含めた集学的治療のさらなる発展が望まれる。そのためには癌の病態を分子レベルで詳細にとらえ治療にフィードバックすることが求められる。

ゲノム全体にわたる CpG ジヌクレオチド部位でのシトシン低メチル化は、ヒト癌におけるエピジェネティックな異常であり、染色体不安定性およびゲノムインプリンティングの消失と関連し、発癌において重要な役割を担っている¹⁻³⁾。このようなゲノムワイドな DNA メチル化レベルの指標として長鎖散在性反復配列 long interspersed nuclear element (LINE)-1 のメチル化レベルを測定することが有用である⁴⁾。LINE-1 はヒトゲノムの約 17% に及び、5'-untranslated region (UTR) と 2 つの open-reading frame (ORF), 3'-UTR にて構成されている。近年、LINE-1 の低メチル化が食道扁平上皮癌を含むいくつかの癌で悪性度と関連し、予後不良因子となっていることが報告されている^{5,6)}。さらに、LINE-1 低メチル化は喫煙と有意な関連があるという報告もあることから⁷⁾、喫煙や飲酒による慢性炎症が危険因子とされる食道扁平上皮癌の発癌は、染色体不安定性とゲノムワイド DNA 低メチル化に関連すると予想される。

p53 は最も良く知られた癌抑制遺伝子であるが、胃癌や大腸癌と比較して食道扁平上皮癌では、そのエクソン 2 から 10 に突然変異が生じる頻度が高く、それらの癌は、転移しやすく染色体不安定性も増していると報告されている⁸⁾。p53 突然変異を伴った食道扁平上皮癌において、変異のない方のアレルを不活化する主なメカニズムは copy-neutral loss of heterozygosity (CNLOH) である可能性を我々は報告した⁹⁾。

今回、食道扁平上皮癌における LINE-1 のメチル化レベルと p53 変異および染色体不安定性との関連を調査し、治療感受性との相関をみるべき因子を検討した。

方法

1. 症例と検体

2001~2010 年までに術前治療を行わずに手術を施行した食道扁平上皮癌 105 例（癌部 105 例と対応する非癌部（正常食道粘膜）101 例）を対象とした。なお、非癌部での LINE-1 メチル化レベルと発癌の危険因子（喫煙とアルコール摂取量）との関連を分析するため、食道腺癌 13 症例の切除標本から得られた非癌部組織（正常食道粘膜）を追加した。すべての標本は、ヘマトキシリン・エオジン染色によって、扁平上皮癌と組織学的に診断された。各々の患者の喫煙及び飲酒量を聴取して解析に使用した。喫煙の度合いはブリンクマン指数（1 日の喫煙本数×喫煙年数）を用いて数値化した。飲酒量については、標準的な換算表を用いて 1 日あたりのアルコール摂取量をエタノールのグラム数で表し、飲酒量指数を 1 日のアルコール摂取量×飲酒年数で表記した。当研究は施設倫理委員会にて承認されている。

*現所属：国立病院機構 九州医療センター がん臨床研究部/消化器センター外科

2. p53 遺伝子の PCR ダイレクトシーケンス

p53 遺伝子エクソン 2～10 をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅させ、PCR ダイレクトシーケンス法を使用して p53 の突然変異を検索した。

3. バイサルファイト処理と LINE-1 メチル化解析

ゲノム DNA (50 ng) を、EpiTect Bisulfite kit (Qiagen) を使用してマニュアル通りにバイサルファイト処理を行った。DNA メチル化レベルは、バイサルファイトパイロシーケンス法 (PyroMark Q24, Qiagen) で測定した。以下のヌクレオチド配列を解析した：GCT CGT GTA GTC AGT CG。このアッセイでは、LINE-1 position 318～331 の 3 カ所の CpG 部位におけるメチル化レベルを定量化した。各々の CpG 部位において、シトシンとチミンの合計に対するシトシンの量の割合 (%) を計算した。3 カ所の CpG 部位の平均を求め、これを全体としての LINE-1 メチル化レベルとして使用した。

4. SNP-CGH 解析

切除された食道扁平上皮癌 11 検体と、食道正常粘膜 5 検体を使用して、single nucleotide polymorphism array comparative genomic hybridization (SNP-CGH) 解析を行った。KaryoStudio (Illumina) を使用して、コピー数異常 (CNAs) の解析を行った。percent defect (% defect) は、ゲノム全体の長さに対する染色体異常部位 (増幅, 欠失, CNLOH を含む) の長さの割合であり、各々の検体で測定を行った。

5. 統計解析

統計解析は、JMP ソフトウェア・バージョン 11.0.0 (Windows 版, SAS 社, Cary) を使用して行った。統計的有意差は、 $p < 0.05$ で設定した。

結 果

1. 食道扁平上皮癌部と非癌部の LINE-1 メチル化

食道扁平上皮癌症例の癌部における LINE-1 メチル化レベル平均値は、 $43.4 \pm 12.2\%$ (範囲 15-67.7)、非癌部でのメチル化レベルは $61.5 \pm 8.16\%$ (範囲 21-75.7) であり、非癌部に比べて癌部の LINE-1 メチル化レベルは有意に低値であった ($p < 0.0001$, 図 1)。

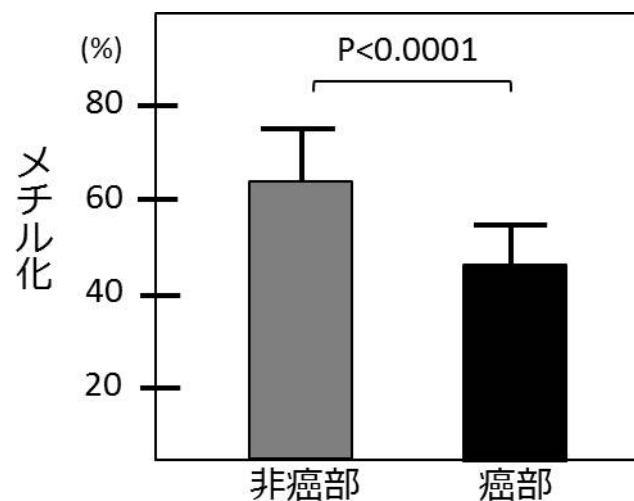


図 1. 癌部と非癌部の LINE-1 メチル化。

癌部と非癌部における LINE-1 メチル化レベルの平均はそれぞれ 43.4%, 61.5% であり、癌部で有意にメチル化が低下していた (Fisher 検定, $p < 0.0001$)。

2. 食道扁平上皮癌における LINE-1 メチル化レベルと臨床病理学的因子との関連

低メチル化群においてリンパ節転移のある症例 ($p = 0.036$), リンパ管侵襲のある症例 ($p = 0.0028$), 静脈侵襲のある症例 ($p = 0.0002$) およびステージ III 以上の症例 ($p = 0.0048$) の割合が有意に高かった。

3. LINE-1 メチル化レベルと p53 突然変異との関連

ダイレクトシーケンス法にて, 食道扁平上皮癌 73 症例中 48 症例 (66%) に p53 変異を確認した。高メチル化群と比して, 低メチル化群において p53 突然変異を生じた症例の割合が有意に高かった ($p = 0.0014$)。多変量ロジスティック回帰分析を用いて調査したところ, LINE-1 の低メチル化が p53 突然変異と有意に関連する危険因子であることが判明した (ハザード比: 5.46, 95%信頼区間: 1.82-18.1, $p = 0.0022$)。

4. 非癌部組織における LINE-1 メチル化レベルと喫煙歴 (プリンクマン指数) と飲酒歴との関連

食道の正常粘膜における LINE-1 メチル化レベルと食道癌のリスク因子 (年齢, 喫煙とアルコール) との関連を調査した結果, メチル化レベルとプリンクマン指数 ($p = 0.037$) 及びアルコール摂取歴 ($p = 0.0076$) とは有意な逆相関の関係であった。ただし, 年齢については有意な関連を認めなかった。

5. LINE-1 メチル化と予後との関連

食道扁平上皮癌患者 105 例のうち, 経過観察中に 52 例が癌死した。 Kaplan-Meier 分析を行い, LINE-1 低メチル化群は高メチル化群と比して統計的有意差をもって予後不良であった (ログランク; $p = 0.0026$, 図 2)。

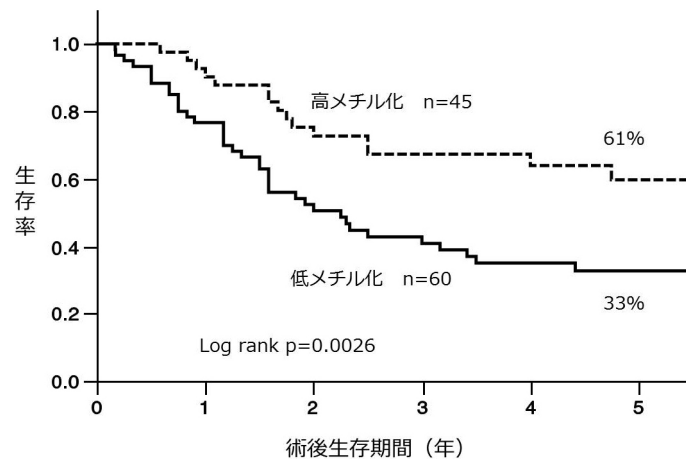


図 2. 食道癌における LINE-1 メチル化と予後。

LINE-1 低メチル化群は, 高メチル化群に比して有意に予後不良であった (Log rank 検定, $P=0.0026$)。

5年生存率は, LINE-1 高メチル化群では 61%だが, 低メチル化群では 33%であった。多変量解析においても, T 因子 (T3/T4) と LINE-1 低メチル化はそれぞれ独立した予後不良因子であった (T3/T4: ハザード比 3.11, 95%信頼区間 1.64-6.19, $p = 0.0004$), (LINE-1 低メチル化: ハザード比 1.90, 95%信頼区間 1.01-3.78, $p = 0.048$)。

6. SNP-CGH 解析による LINE-1 メチル化レベルと染色体不安定性との関連

食道扁平上皮癌 11 症例に対し SNP-CGH 解析を行った。二変量の相関分析において, LINE-1 メチル化レベルと % defect 値との間に有意な逆相関関係を認めた (図 3)。LINE-1 低メチル化症例 ($\leq 44\%$) のすべてにおいて, % defect 値は 30%以上であり, 比較的メチル化レベルが高かった 2 例においては % defect 値も 10%未満であった。

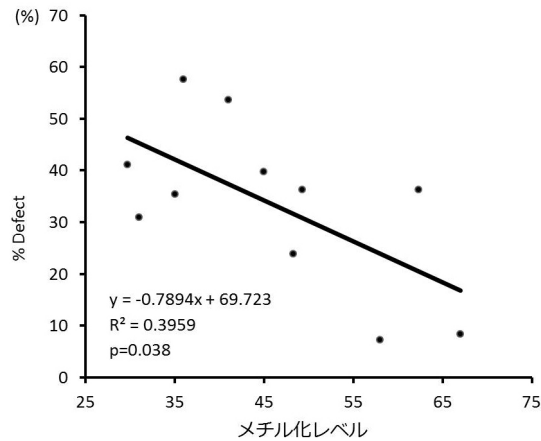


図3. 癌部メチル化レベルと染色体不安定性との関連.

LINE-1 のメチル化レベルと染色体不安定性との間に有意な逆相関を認めた (Pearson 検定, $P=0.038$).

考 察

この研究にて、ゲノムワイドの低メチル化が染色体不安定性と有意に相関することが判明した。更に、今回のデータは、食道正常粘膜におけるメチル化レベルと喫煙歴および飲酒歴とは有意な逆相関関係にあることが示された。食道扁平上皮癌の多段階発癌の過程において、ゲノムワイドな低メチル化は非常に早い時期に起こるため¹⁰⁾、タバコとアルコールに起因する慢性刺激がゲノムワイドな低メチル化を惹起することで染色体不安定性を生じ、その結果として食道扁平上皮癌が引き起こされる可能性が示唆された。さらに LINE-1 の低メチル化が p53 遺伝子突然変異の頻度と有意に相関していた結果も、同様に、慢性炎症に伴うゲノムワイドな低メチル化が食道扁平上皮の発癌を引き起こしている可能性を裏付けるものである。

食道扁平上皮癌の癌部でのメチル化レベルは非癌部よりも有意に低い値であり、LINE-1 低メチル化群は、有意に予後不良であった。LINE-1 低メチル化が脈管侵襲およびリンパ節転移と有意な関連があり、病理学的因子への関与が明らかとなった。

これらの結果に加えて、比較的低メチル化を示している食道扁平上皮癌症例において *SOX2*, *p63* および *FNDC3B* の増幅が認められることが明らかとなった。すなわち、食道扁平上皮癌においてゲノムワイド DNA 低メチル化が染色体不安定性を誘導し、それによって多くの遺伝子異常が生じた結果、脈管侵襲やリンパ節転移が引き起こされる可能性が示唆された。

ゲノムワイド DNA 低メチル化に伴う染色体不安定性が、発癌と進行に関与する可能性が示唆された。これらは、食道扁平上皮癌の予後およびリスクを予測する上で有用なマーカーとなる可能性があると同時に、種々の集学的治療に対する感受性を規定し得るか否か、他癌腫ならびに手術以外の治療 modality について、今後の研究を計画している。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学大学院消化器・総合外科の河野浩幸、佐伯浩司、沖 英次、徳永えり子、前原喜彦、および九州大学大学院がん分子病態学の北尾洋之である。

文 献

- 1) Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., Leonhardt, H. & Jaenisch, R. : Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, **300** : 489-492, 2003.
- 2) Holm, T. M., Jackson-Grusby, L., Brambrink, T., Yamada, Y., Rideout, W. M. 3rd & Jaenisch, R. : Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. *Cancer Cell*, **8** : 275-285, 2005.
- 3) Suzuki, K., Suzuki, I., Leodolter, A., Alonso, S., Horiuchi, S., Yamashita, K. & Perucho, M. : Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell*, **9** : 199-207, 2006.

- 4) Yang, A. S., Estecio, R., Doshi, K., Kondo, Y., Tajara, E. H. & Issa, J. P. : A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.*, **32** : e38, 2004.
- 5) Ogino, S., Nosho, K., Kirkner, G. J., Kawasaki, T., Chan, A. T., Schernhammer, E. S., Giovannucci, E. L. & Fuchs, C. S. : A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **100** : 1734-1738, 2008.
- 6) Iwagami, S., Baba, Y., Watanabe, M., Shigaki, H., Miyake, K., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., Sakamaki, K., Ohashi, Y. & Baba, H. : LINE-1 hypomethylation is associated with a poor prognosis among patients with curatively resected esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg.*, **257** : 449-455, 2013.
- 7) Shigaki, H., Baba, Y., Watanabe, M., Iwagami, S., Miyake, K., Ishimoto, T., Iwatsuki, M. & Baba, H. : LINE-1 hypomethylation in noncancerous esophageal mucosae is associated with smoking history. *Ann. Surg. Oncol.*, **19** : 4238-4243, 2012.
- 8) Egashira, A., Morita, M., Yoshida, R., Saeki, H., Oki, E., Sadanaga, N., Kakeji, Y., Tsujitani, S. & Maehara, Y. : Loss of p53 in esophageal squamous cell carcinoma and the correlation with survival: analyses of gene mutations, protein expression, and loss of heterozygosity in Japanese patients. *J. Surg. Oncol.*, **104** : 169-175, 2011.
- 9) Saeki, H., Kitao, H., Yoshinaga, K., Nakanoko, T., Kubo, N., Kakeji, Y., Morita, M. & Maehara, Y. : Copy-neutral loss of heterozygosity at the p53 locus in carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinomas associated with p53 mutations. *Clin. Cancer Res.*, **17** : 1731-1740, 2011.
- 10) Alvarez, H., Opalinska, J., Zhou, L., Sohal, D., Fazzari, M. J., Yu, Y., Montagna, C., Montgomery, E. A., Canto, M., Dunbar, K. B., Wang, J., Roa, J. C., Mo, Y., Bhagat, T., Ramesh, K. H., Cannizzaro, L., Mollenhauer, J., Thompson, R. F., Suzuki, M., Meltzer, S. J., Melnick, A., Grealley, J. M., Maitra, A. & Verma, A. : Widespread hypomethylation occurs early and synergizes with gene amplification during esophageal carcinogenesis. *PLoS Genet.*, **7** : e1001356, 2011.