

論文内容の要旨

論文提出者氏名 永田 啓明

論文題目

Genome-wide screening of DNA methylation associated with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma.

論文内容の要旨

【要旨】 エピジェネティクスは DNA の一次構造変化を伴わない遺伝子発現調節機構の一つとして重要であり、近年注目されている。癌におけるエピジェネティックな異常として DNA メチル化の異常、ヒストン修飾異常、ゲノムインプリンティング異常、などが挙げられる。癌における DNA メチル化の異常に関する研究は近年注目されており、癌抑制遺伝子の発現と DNA メチル化との関連が多く報告されている。DNA メチル化を含むこれらエピジェネティックな変化は可逆的な変化であると言われており、これは癌治療に於いて有用である可能性が示唆されている。また、同様に DNA メチル化異常は癌の存在診断、リスク診断等のバイオマーカーとしても着目されている。

一方で食道扁平上皮癌は近年の集学的治療の進歩にも関わらず依然、予後不良である悪性腫瘍のひとつである。予後規定因子の一つとしてリンパ節転移が挙げられるが、他の消化管腫瘍と比して早期のリンパ節転移が高率である事が予後不良である一因とされる。リンパ節転移存在診断は治療方針決定に重要であるが、これを予測する事は困難であり、高精度なバイオマーカーも存在しない。

そこで本研究では、非侵襲的な術前リンパ節転移存在予測バイオマーカーの同定を目的として、食道癌原発巣の DNA メチル化状態をゲノムワイドに解析した。その結果、HOXB2, SLC15A3 及び SEPT9 の 3 遺伝子を抽出した。これら遺伝子の特定領域のメチル化状態はリンパ節転移陽性の食道癌原発巣に於いて有意に高メチル化されており、一方でリンパ節転移陰性の食道癌原発巣に於いては低メチル化状態を示した。またそれぞれのペア検体である非癌部組織ではリンパ節転移の有無にかかわらず低メチル化状態であった。以上よりこれら 3 遺伝子のメチル化状態は食道癌原発巣から、そのリンパ節転移状態を予測し得る非侵襲的なバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

【方法】 臨床検体は東京医科歯科大学食道外科にて 2005 年から 2010 年に切除された前治療のない食道扁平上皮癌と、それぞれの非癌部のペアサンプル凍結臨床検体 67 患者 134 サンプルを discovery cohort とし、京都府立医科大学消化器外科にて切除された食道扁平上皮癌パラフィンブロック検体 59 サンプルを validation cohort として使用した。それぞれのサンプルより DNA を抽出しパイサルファイト処理を行い保存しておいた。discovery cohort より抽出した 134 サンプルの DNA を用いて網羅的なメチル化解析を施行した。解析はイルミナ社 Infinium HumanMethylation450 BeadChip array を用いたメチル化アレイを行った。その結果よりリンパ節転移が TNM 分類で N0 の群と N3 の群間のメチル化状態を比較し、候補の抽出を行った。得られた候補遺伝子について、メチル化アレイ結果の評価をキ

アゲン社 PyroMark Q96ID を用いたパイロシーケンスにて行った。パイロシーケンスによる候補遺伝子のメチル化状態と、アレイ結果との整合性を確認した後、validation cohort を用いて候補遺伝子のリンパ節転移予測マーカーとしての有用性の検証を行った。

【結果】 メチル化アレイ解析により、485,577 箇所のメチル化状態をゲノムワイドに解析した。リンパ節転移が N0 群と N3 群とを比較した結果 N3 群で特定の領域が有意に高メチル化状態である 10 の遺伝子 (HOXB2, NEFL, SLC15A3, OBSL1, MIR124-2, KDM2B, PAX6, PLEC, SEPT9, HOXD9) を抽出した。それらをパイロシーケンス法を用いて評価を行い、メチル化アレイ結果とパイロシーケンスの結果が相関する事を確認した。多変量解析により、さらに HOXB2, SLC15A3 及び SEPT9 の 3 遺伝子を最終的な候補として絞り込んだ。同 3 遺伝子につき、validation cohort についてパイロシーケンスを行ったところ、HOXB2 及び SEPT9 の 2 遺伝子についてリンパ節転移の有無と同定した領域のメチル化状態に統計学的有意差を認めた。

【考察】

食道扁平上皮癌は予後不良な消化器癌の一つである。その予後の向上のためには新規治療薬の開発もさることながら、予防、早期発見及び早期治療も重要である。近年、胃癌のスクリーニングのため上部消化管内視鏡が施行される機会が増えている。それに伴う食道の観察や、近年開発された画像強調内視鏡の恩恵もあり、食道癌の早期発見頻度も上昇しつつあるが、食道癌診断時に重要になってくるのは、治療方針を決定するための病期診断である。

現在食道癌診断時その壁深達度が粘膜層 (T1a) のうち、EP,LPM と定義される、粘膜固有層にとどまる病変までであれば内視鏡的切除の絶対的適応とされている。その根拠は、粘膜固有層にとどまる壁深達度である場合そのリンパ節転移率が 5%以下と稀であるとの報告による。ところが、粘膜筋板から粘膜下層にわずかに浸潤する (200 μ m まで) ものはリンパ節転移の可能性が上昇するため内視鏡的切除の相対的適応とされている。粘膜下層 200 μ m 以深へ浸潤するものでは 50%程度のリンパ節転移陽性率と言われており、これらは外科的切除の適応となってくる。この事から食道扁平上皮癌診断時のリンパ節転移陽性率を、より正確に診断する事は、患者にとって非侵襲的な内視鏡的切除術の選択に直結する。また、外科的切除適応症例に関してもリンパ節転移の有無により低侵襲手術の選択が可能になる場合や、食道癌の存在部位によってはリンパ節郭清の省略が可能になる事もあり、術前に、より正確にリンパ節転移の有無を把握する事は患者への手術侵襲を最小限に抑える事にもつながる。現状ではリンパ節転移診断は CT、MRI,PET といった画像診断に委ねられているが、その感度は 60~80%程度と言われておりリンパ節転移診断率の向上が望まれている。

以上より今回同定したリンパ節転移予測バイオマーカーは、食道癌治療方針決定に於いて、リンパ節転移診断率向上の一助となる可能性があり、ひいては患者にとってより非侵襲的な治療を選択できるための判断材料になり得ると考えられた。

【結語】 新規に食道扁平上皮癌におけるリンパ節転移予測エピジェネティックバイオマーカーとして HOXB2, SLC15A3 及び SEPT9 の 3 遺伝子を同定し、特に食道扁平上皮癌の治療方針決定の一助となる可能性につき報告した。