

博士(医学) 宮 木 祐一郎

論文題目

Identification of a potent epigenetic biomarker for resistance to camptothecin and poor outcome to irinotecan-based chemotherapy in colon cancer

(カンプトテシン耐性と大腸癌に対するイリノテカンを基軸とした化学療法の治療抵抗性に関する有力なエピジェネティックバイオマーカーの同定)

論文の内容の要旨

[はじめに]

転移性大腸癌治療における重要な抗腫瘍薬の一つとしてカンプトテシン(CPT)から合成されたイリノテカン(CPT-11)が用いられている。5-FU と併用する FOLFIRI 療法は一次治療で 50 % を越える奏効率を示すものの、一年以内に CPT-11 に耐性となることが多い。二次治療ではその奏効率はわずかに 4 % であり、薬剤耐性の克服が喫緊の課題である。CPT に対する耐性機序は未だ解明されていないが、遺伝子修飾異常、特に DNA メチル化異常の関与が示唆されている。我々は網羅的なメチル化検索方法を用いて、大腸癌と胃癌の患者において高頻度に異常メチル化している新規遺伝子 Dexamethasone induced protein (DEXI) を同定した。タンパク配列解析により、DEXI は膜貫通型タンパクで、ロイシンジッパー構造を介して DNA に結合すると考えられるが、その詳細は明らかでない。本研究では、DEXI の機能解析を行い、CPT 耐性機構に関わるメカニズムを検討した。さらに、CPT-11 を基軸とした大腸癌化学療法に耐性を示す患者を選別するバイオマーカーとしての有用性を検討した。

[対象ならびに方法]

網羅的メチル化検索には、大腸癌患者 73 例、胃癌患者 89 例の腫瘍組織を対象とした。細胞株を用いた機能解析には、胃癌細胞株(H111、GSS、HGC27、AZ521)、大腸癌細胞株(CW2、CACO2、HCT116、COLO320DM)、正常ヒト皮膚線維芽細胞株(NHDF)を対象とした。臨床症例での抗癌剤感受性の検討では、FOLFIRI 療法を受けた大腸癌患者の切除検体 16 例を対象とした。DNA メチル化異常をきたした遺伝子を同定するため、メチル化特異的増幅断片長多型解析(MS-AFLP) を行い、約 150 の遺伝子断片を網羅的に検索した。DNA メチル化の頻度と程度を評価するため、メチル化特異的制限断片 PCR 法、メチル化特異的 PCR 法(MSP)、バイサルファイト・シーケンシング法を行った。またリアルタイム定量逆転写 PCR 法により遺伝子発現量を測定し、メチル化の程度との相関を解析した。細胞株を用いた実験系で、異常メチル化細胞株に対して DNA 脱メチル化剤であるアザシチジンを投与し、遺伝子の発現回復を評価した。さらに細胞老化、細胞増殖能、アポトーシス誘導に関わる影響を評価するため X-Gal 細胞化学的分析、Ki-67 免疫組織化学的分析、ヘキスト染色による細胞観察を行った。遺伝子の発現調整には RNAi、発現プラスミドの一過性遺伝子導入を行った。抗癌剤感受性の検討では、対象患者を MSP 法によるメチル化の有無で二群に分け、奏効率(RR)、

病勢制御率(DCR)、無増悪生存期間(PFS)、全生存期間(OS)を比較検討した。

[結果]

MS-AFLP 法により胃癌患者で 31.5 %、大腸癌患者で 49.3 %と高頻度にメチル化異常を認める遺伝子 DEXI を同定した。その頻度はメチル化特異的制限断片 PCR 法の結果と相関した。次に種々の細胞株を用いて MSP 法で DEXI 異常メチル化の有無を評価した結果、癌細胞株ではすべて陽性であったが、線維芽細胞株である NHDF は陰性であった。細胞株で異常メチル化の程度に差を認めため、パイサルファイト・シーケンシングでプロモーター領域の個々のシトシンのメチル化の有無を解析したところ、メチル化の程度はメチル化シトシンの数と相関することが明らかとなった。さらに mRNA の発現量との相関も示した。またメチル化による DEXI 遺伝子の発現低下は、アザシチジンの投与により回復した。次に DEXI の機能解析を行うため、RNAi により非メチル化細胞株である NHDF の DEXI 発現抑制を行った。DEXI 発現低下による細胞老化や細胞増殖能への影響は認めなかったが、アポトーシスが抑制されることが明らかとなった。この変化は CPT 投与時に顕著に認められた。一方、高度メチル化大腸癌株で CPT 耐性を有する HCT116 に対し、アザシチジンを投与すると DEXI 発現が回復し、CPT に対するアポトーシス感受性が増強した。この変化は DEXI 発現プラスミドの遺伝子導入により再現されることより、感受性回復には DEXI そのものが関与していると考えられる。FOLFORI 療法を受けた大腸癌患者で、DEXI メチル化群(8例)は非メチル化群(8例)と比較して DCR、PFS、OS とともに成績が不良であった。以上より CPT 耐性に関するバイオマーカーとして DEXI メチル化評価が臨床的に有用であると示唆された。

[考察]

近年、転移性大腸癌化学療法は、新規抗癌剤と分子標的治療薬の併用で飛躍的な発展をとげてきた。一方、ここ数年の臨床試験結果を省みると新規薬剤への期待は薄く、Kras や Braf といった分子マーカーを指標とした個別化治療が治療成績の向上へ寄与してきている。個別化治療戦略において、薬剤耐性の予測やその克服は重要な課題の一つであり、有用な分子マーカーの実用化が急務である。本研究では大腸癌において高頻度にメチル化されている遺伝子 DEXI に着目し、その機能解析を行った。DEXI の異常メチル化によりアポトーシスは阻害され、CPT の抗腫瘍効果が抑制されるが、一方、その耐性は脱メチル化剤の投与で回復されることを明らかにした。さらに DEXI の異常メチル化の評価することが、CPT-11 を併用する大腸癌化学療法の耐性のバイオマーカーとして有用であることを示した。本研究は転移性大腸癌に対する抗癌剤治療の新たな治療戦略として期待される。

[結論]

大腸癌で高頻度にメチル化されている遺伝子 DEXI を同定した。DEXI メチル化はカンプトテシン耐性を誘導し、CPT-11 基軸大腸癌化学療法の治療抵抗性獲得に関与している。DEXI は CPT-11 基軸化学療法感受性のバイオマーカーや治療標的になることが期待される。

論文審査の結果の要旨

[申請者が取り組んだ研究の背景]

がんの化学療法の大きな課題は初期に奏功しても耐性となってしまう現象である。たとえば、カンプトテシン (CPT) 由来のイリノテカン(CPT-11)にしても、FOLFIRI 療法 (5-FU と併用するレジメ) のさい一次治療の奏効率 50%だが1年以内に耐性となり、二次治療の奏効率は4%に落ちる。この原因は不明である。申請者が大腸がんのメチル化を独自の方法で網羅的に調べていた過程で、Dexamethasone induced protein (DEXI)のメチル化を発見していたが、詳細な臨床的情報と併せて具体的に検討してみると、この遺伝子のメチル化とCPT-11 の効果を示す臨床的指標との関連が浮かび上がってきた。

[実験結果・考察]

MS-AFLP 法により胃癌患者で 31.5 %、大腸癌患者で 49.3 %と高頻度にメチル化異常を認める遺伝子 DEXI を同定した。DEXI 発現低下による細胞老化や細胞増殖能への影響は認めなかったが、アポトーシスが抑制されることが明らかとなった。この変化は *in vitro* ではCPT-11 投与時に顕著に認められた。臨床例でも、FOLFIRI 療法を受けた大腸癌患者で、DEXI メチル化群 (8 例) は非メチル化群 (8 例) と比較して病勢制御率(DCR)、無増悪生存期間 (PFS)、全生存期間(OS)ともに成績が不良であった。以上より CPT-11 耐性に関するバイオマーカーとして DEXI メチル化評価が臨床的に有用であると示唆された。

審査委員会では、大腸癌患者の治療効果予測の新規バイオマーカーを新たに発見し、その臨床的有用性を示した点を高く評価した。

以上により、本論文は博士 (医学) の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梶村 春彦
副査 前川 真人 副査 杉本 健