

学 位 論 文 要 旨

氏 名 横井 圭悟



論 文 題 目

「Comprehensive molecular exploration identified
promoter DNA methylation of the CRBP1 gene as a determinant of
radiation sensitivity in rectal cancer.

(包括的分子マーカー探索による CRBP1 遺伝子プロモーター領域DNAのメチル
化の同定)

指 導 教 授 承 認 印

渡辺 昌彦



Comprehensive molecular exploration identified promoter DNA methylation of the CRBP1 gene as a determinant of radiation sensitivity in rectal cancer.

(包括的分子マーカー探索による CRBP1 遺伝子プロモーター領域 DNA のメチル化の同定)

氏名 横井 圭悟

【背景】

今日の臨床で局所進行直腸癌に対して化学放射線療法が広く行われている。放射線療法に対する治療反応性は様々であり、完全奏効からほとんど反応のない症例まで存在する。完全奏効を認める症例は 8～24%程と報告されているが、治療施行前に放射線療法に対する治療反応性を予測する確立した分子マーカーは報告されていない。今までに幾つもの分子マーカーが報告されてきたが、臨床応用に至ったマーカーはない。腫瘍抑制遺伝子におけるプロモーター領域 DNA のメチル化による発現の抑制は悪性腫瘍における共通イベントとして報告されている。分子マーカーとして DNA メチル化を対象とすることによって腫瘍内の遺伝子的不均一性の問題は排除可能であると考えられ、我々は本研究で直腸癌における放射線感受性を規定する分子マーカーを同定することを目的とした。大腸癌細胞株で放射線感受性を示したものと抵抗性を示したものの遺伝子発現プロファイルを比較することで感受性規定遺伝子を同定し、対象遺伝子のプロモーター領域 DNA のメチル化が分子マーカーとして有用かどうかを評価した。

【対象と方法】

① 大腸癌細胞株に放射線照射を行い、放射線感受性株と抵抗性株を選別する。

大腸癌細胞株 DLD1, HCT116, HCT15, Colo205, Colo320, LoVo を対象とした。各細胞を 10cm disk に散布し、翌日から 1 Gy/日で 5 日間放射線照射を行い、7 日目に細胞数を計測した。同時に非照射株も培養して 7 日目に細胞数計測し、両者の比を細胞株間で比較した。感受性株として HCT116 が選別されたため、この株に 3 Gy/週で放射線照射を行い、60 Gy まで照射して放射線耐性獲得株 (I-HCT116)とした。同時に放射線照射を加えずに継代のみを繰り返した株も作成した (M-HCT116)。抵抗性株として HCT15, DLD1 が選別された。

② 感受性株と抵抗性株から mRNA を採取し、発現マイクロアレイによって両株における遺伝子発現の違いを比較し、感受性遺伝子候補、抵抗性遺伝子候補を選別する。

発現マイクロアレイ (Affymetrix) を用いて行った。感受性株において発現が高く、抵抗性株において発現が低い遺伝子を放射線感受性遺伝子候補として挙げ、逆に感受性株において低く、抵抗性株において高い遺伝子を放射線抵抗性遺伝子候補として挙げた。

③ 候補遺伝子の中からより有用であると思われる遺伝子を選別する。

感受性遺伝子候補から放射線感受性株(HCT116)に対して 10 Gy の短期間照射を行った場合と先述の放射線耐性獲得後の HCT116 において放射線照射前よりも遺伝子発現が亢進しているものを選別した。抵抗性遺伝子候補の中から放射線抵抗性株(HCT15,DLD1)に対して 10Gy の短期間照射を行った場合に放射線照射前より遺伝子発現が亢進しているものを選別した。

④ 放射線感受性遺伝子の強制発現による放射線感受性獲得の確認

放射線感受性遺伝子として CRBP1 遺伝子を選別されたため、この遺伝子を放射線抵抗性株に強制発現させて放射線感受性を獲得することを確認した。強制発現はプラスミド DNA を用いてリポフェクションによって行った。放射線照射は遺伝子導入後 1 日目より行い、5Gy/日で 2 日間照射し、その 2 日後に cell proliferation assay および細胞数計測によって評価した。

⑤ CRBP1 遺伝子について大腸癌細胞株、直腸癌検体におけるプロモーター領域 DNA のメチル化を評価する。直腸癌検体についてはメチル化と放射線治療効果の相関を検討する。

CRBP1 遺伝子のプロモーター領域 DNA のメチル化について検討した。また、大腸癌細胞株において DNA の脱メチル化処理によって対象遺伝子の再発現が起きることを確認した。メチル化の評価は Bisulfite sequence 法、定量的メチル化特異的 PCR 法を用いて行った。脱メチル化処理は細胞株に 5-Aza-dC およびトリコスタチン A を投与した。DNA のバイサルファイト処理は EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research)を用いて行った。定量的メチル化特異的 PCR 法は TaqMan probe を用いた Realtime PCR 法で行った。メチル化値 (TaqMeth V)は CRBP1 の蛍光強度を β -actin の蛍光強度で除算したものを 100 倍して算出した。

直腸癌検体は 2005 年から 2010 年までに北里大学病院および北里大学東病院で術前化学放射線療法を受けた患者 33 症例を用いた。

【結果】

- ① 非照射株との細胞数の比が高かった株は HCT15 (86%),DLD1 (73%)で、最も低かった株は HCT116(27%)であった。この結果より放射線抵抗性株として HCT15,DLD1 を、放射線感受性株として HCT116(P-HCT116)を選別した。I-HCT116 に対して同様に放射線照射を行ったところ非照射株との比は HCT116 親株と比較して有意に上昇した(62%および 29% $p=0.05$)。
- ② マイクロアレイの結果から放射線感受性遺伝子候補として 40 遺伝子、放射線抵抗性遺伝子候補として 26 遺伝子を選別された。
- ③ 感受性遺伝子候補の中から上記方法によってさらに遺伝子候補を選別し、さらに文献的検索を行い、腫瘍抑制遺伝子としての報告や DNA メチル化による発現

制御についての報告があった CRBP1 遺伝子に焦点を当てることとした。抵抗性遺伝子候補の中からは目的とした遺伝子候補を選別することはできなかった。

④ CRBP1 遺伝子の強制発現を HCT15,DLD1 に対して行った。強制発現によって cell proliferation は DLD1, HCT15 において優位に低下した($p<0.0001$ および $p=0.0004$)。このことから CRBP1 遺伝子が腫瘍抑制遺伝子としての働きを持つことが示唆された。CRBP1 遺伝子の強制発現を行ったのちに放射線感受性を評価したところ、Cell proliferation assay では HCT15,DLD1 のいずれも($p=0.0291$ および $p=0.0312$)、細胞数カウントでは DLD1 において感受性の増大が認められた($p=0.0071$)。このことから CRBP1 遺伝子の強制発現によって放射線抵抗性株が放射線感受性を獲得することが示唆された。

⑤ Bisulfite sequence 法では HCT15,DLD1 において CRBP1 遺伝子のプロモーター領域が高頻度でメチル化されていることが明らかになった。また、HCT116 ではほとんどメチル化が起きていないことが明らかになった。また TaqMeth V は HCT15,DLD1, HCT116 においてそれぞれ 11.4, 45.2, 0 であった。脱メチル化処理によって HCT15,DLD1 で CRBP1 遺伝子の再発現が認められた。CRBP1 遺伝子の発現が大腸癌細胞株において DNA メチル化によって制御されており、放射線感受性株ではメチル化の程度が低く、放射線抵抗性株ではメチル化の程度が高いことが考えられた。直腸癌組織検体と対照正常粘膜において TaqMeth V を比較したところ、癌組織において優位に TaqMeth V が高かった($p=0.0122$)。直腸癌に対する術前化学放射線療法の治療効果と TaqMeth V の相関を検討したところ、カットオフ値 2.79 を用いることで、治療効果 3 の症例では 1 から 2 の症例と比較して有意に 2.79 以下の症例が多かった($p=0.031$)。直腸癌症例において CRBP1 遺伝子の腫瘍特異的なメチル化が起きており、CRBP1 遺伝子の低メチル化が高い放射線治療効果を予測することが示唆された。

【考察】

本研究における放射線感受性規定遺伝子の候補として CRBP1 遺伝子が選別された。CRBP1 遺伝子は放射線抵抗性株で発現が認められず、感受性株で発現が高く認められた。また、感受性株では放射線照射後に CRBP1 遺伝子の発現が亢進するのに対して抵抗性株では放射線照射後にも発現量の変化が認められなかった。CRBP1 遺伝子の強制発現によって放射線抵抗性株は放射線に対して有意に感受性を上昇した。CRBP1 遺伝子の DNA メチル化値は放射線抵抗性株において高く、放射線感受性株において低かった。また、直腸癌組織検体において CRBP1 遺伝子メチル化値が低かったものは有意に放射線感受性が高い傾向が認められた。以上の結果より、CRBP1 遺伝子は大腸癌において放射線感受性を規定する因子であることが示唆され、その遺伝子発現は DNA メチル化によって制御されており、メチル化の程度が放射線感受性を予測することが考えられた。また、CRBP1 遺伝子はそれ自体が腫瘍抑制遺伝子と

しての働きを持つことが示唆された。CRBP1 遺伝子の高メチル化または低発現は多種の癌における報告がなされているが、大腸癌における腫瘍特異的メチル化について報告したのは本研究が初めてである。

直腸癌における術前化学放射線療法はその治療効果に非常にばらつきが多く、治療期間が長いことから、不応例における副作用や浪費時間が問題となる。したがって治療前に放射線不応例を選別可能な治療マーカーの発見が望まれる。本研究結果では CRBP1 遺伝子のメチル化と治療効果に相関関係が認められたものの、鋭敏に検出可能であったのは放射線治療効果が高かった患者であった。しかし、本研究では放射線感受性株に対して抵抗性を獲得させることに成功しており、今後の研究においてこの抵抗性獲得株における遺伝子発現プロファイルを分析することによってさらに有用な分子マーカーの同定につながると思われる。