

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5044837号
(P5044837)

(45) 発行日 平成24年10月10日(2012.10.10)

(24) 登録日 平成24年7月27日(2012.7.27)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z N A A
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	M
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

請求項の数 4 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2006-303331 (P2006-303331)
 (22) 出願日 平成18年11月8日(2006.11.8)
 (65) 公開番号 特開2008-118866 (P2008-118866A)
 (43) 公開日 平成20年5月29日(2008.5.29)
 審査請求日 平成21年10月5日(2009.10.5)

(73) 特許権者 504179255
 国立大学法人 東京医科歯科大学
 東京都文京区湯島 1-5-4 5
 (73) 特許権者 591083336
 株式会社ビー・エム・エル
 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号
 (74) 代理人 100103160
 弁理士 志村 光春
 (72) 発明者 稲澤 譲治
 東京都練馬区東大泉5丁目43番地1-9
 04号
 (72) 発明者 井本 逸勢
 東京都文京区本郷3丁目23番地3-40
 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食道癌の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

食道上皮細胞におけるヒトCRABP1遺伝子の不活性化を検出することにより、当該食道上皮細胞の癌化を検出する、食道癌の検出方法。

【請求項 2】

前記検出方法において、ヒトCRABP1遺伝子の不活性化が、食道上皮細胞における、当該遺伝子のゲノムDNA、当該遺伝子を鋳型として発現するmRNA、当該mRNAを鋳型とするcDNA、又は、ヒトCRABP1蛋白質、を介して検出される、請求項1記載の食道癌の検出方法。

【請求項 3】

前記検出方法において、検体中の当該遺伝子を、DNAチップ法、サザンプロット法、ノーザンプロット法、リアルタイムRT-PCR法、FISH法、CGH法、又は、免疫染色法を用いて検出する、請求項1又は2に記載の食道癌の検出方法。

【請求項 4】

前記検出方法において、ヒトCRABP1遺伝子の不活性化が、当該遺伝子のCpGアイランドのメチル化に起因する不活性化である、請求項1～3のいずれかに記載の食道癌の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌の検出方法に関する発明である。より具体的には、本発明の癌の検出方法

は、食道癌を初期に診断するために、さらには食道癌の悪性度、リンパ節転移を正確に予測するために、ヒトCellular Retinoic Acid Binding Protein 1 (ヒトCRABP1) 遺伝子の不活性化を検出することを目的とする発明である。

【背景技術】

【0002】

食道癌 (Esophageal carcinoma) は、食道に発生する上皮性由来の腫瘍 (癌) である。組織学的分類では扁平上皮癌 (Esophageal Squamous-cell Carcinoma) と腺癌がある。前者は食道の粘膜上皮細胞が癌化するもので、全体の90%以上を占める。日本人では食道癌全体の93%を占める。後者はパレット食道の細胞が癌化するもので、両者を合わせると食道癌全体の95%以上を占める。診断法としては、食道造影、内視鏡、超音波内視鏡検査、CT (コンピュータトモグラフィ)、PET (ポジトロン放射断層撮影装置) 等の画像所見とSCC (扁平上皮癌関連抗原) 及びCEA (癌胎児抗原) 等の腫瘍マーカーに基づく方法が知られているが、必ずしも精度が高いとはいえず、悪性度を含めて初期食道癌診断を行うことは困難である状況が続いている。食道癌は初期の診断が困難であることも一因として、その予後が極めて悪く、手術或いは放射線・化学療法の奏効率が悪い癌として知られている。これは、食道癌にはリンパ節転移が多いことと、食道は他の消化器臓器と異なり、漿膜 (外膜) を有していないために、癌が比較的周囲の組織に浸潤しやすいことが挙げられる。

10

【0003】

ごく最近、Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1B (LRP1B) の発現低下或いは当該ゲノム遺伝子の欠失が食道癌の診断に使用できることが報告された (非特許文献1)。

20

【非特許文献1】Sonoda I, Imoto I, Inoue J, Shibata T, Shimada Y, Chin K, Imamura M, Amagasa T, Gray J W, Hirohashi S, and Inazawa J: Frequent Silencing of Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein1B(LRP1B) Expression by Genetic and Epigenetic Mechanisms in Esophageal Squamous Cell Carcinoma, Cancer Research 64, 3741-3747, 2004

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

現状において、食道癌の遺伝子検査法については、非特許文献1の技術が公知となっている。さらに新たな遺伝子検査法を見出し、それらを用いた総合的な食道癌の診断方法の確立が要望されている状況である。このような状況の中、本発明の課題は、癌の悪性度やリンパ節転移の可能性までも判断可能な、新たな食道癌の遺伝子レベルの検出方法を提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0005】

一般に、癌細胞ではゲノム遺伝子の欠失及び増幅、CpGアイランドのメチル化による発現抑制、ヒストン蛋白質の脱アセチル化による遺伝子の発現抑制、遺伝子点突然変異等が起こっている場合が多く例で報告されている。食道癌細胞で染色体DNA及び遺伝子発現について詳細に検討し、食道癌の悪性度及び早期診断に結びつく遺伝子群を探索し、診断の決め手となる遺伝子を見出すことは極めて重要である。さらに、食道癌細胞で特徴的な遺伝子の変化を見出し、遺伝子変化と癌の臨床病理学的所見との相関を解析することにより、食道癌の診断法を確立することができると考えられる。

40

【0006】

今般、本発明者は、ヒトCellular Retinoic Acid Binding Protein 1 (ヒトCRABP1) 遺伝子の不活性化が、初期の食道癌 (食道上皮細胞癌) の指標として用いることが可能であり、かつ、当該指標により、初期の食道癌の検出、さらには、食道癌の初期発見とリンパ節の転移の可能性の判断もできることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

50

すなわち、本発明は、食道上皮細胞におけるヒトCRABP1遺伝子の不活性化を検出することにより、当該食道上皮細胞の癌化を検出する、食道癌の検出方法（以下、本検出方法ともいう）を提供する発明である。

【0008】

本発明者等は、ゲノム上での食道癌細胞株でのメチル化の亢進を、BAMCA法を用いて網羅的に解析した。BAMCA法は、Bacterial Artificial chromosome array-based Methylated CpG island Amplificationの略称であり、特定遺伝子におけるメチル化を検出することができるアッセイ法である。BAMCA法の代表的な態様を例示すれば、下記ようになる。すなわち、食道癌細胞と正常食道細胞よりDNAを調製し、各々のDNAを制限酵素SmaI（メチル化感受性制限酵素）で消化する。この場合、SmaIサイトがメチル化されている場合には、当該メチル化サイトはSmaIで消化されないために、次のステップのXmaI（メチル化非感受性制限酵素）で消化される。XmaI切断端特異的アダプターライゲーションを行い、PCR法で食道癌細胞に由来するXmaI断片を蛍光色素Cy-3にて標識し、増幅する。一方、正常食道細胞に由来するXmaI断片を蛍光色素Cy-5にて標識する。その両者を混ぜ、数多くのBAC（Bacterial Artificial Chromosome）DNAを搭載した高密度ゲノムアレイ上で競合ハイブリダイゼーション（Comparative Genomic Hybridization）を行う。その結果、食道癌細胞DNAにおいて近位SmaIサイトの両方がメチル化されている場合に、当該メチル化領域に対応したXmaI断片が生成し、Cy3/Cy5の比が上昇する。例えば、この値が1.5以上を指標として、癌特異的にメチル化されたDNA断片に一致する配列を含むBACクローンを同定することができる。この一連のBAMCA法の過程を、図1に示す。

【0009】

その結果、高度にメチル化されているBAC DNAとしてRP11-10K12が見出され、その中に含まれる遺伝子解析の結果、ヒトCellular Retinoic Acid Binding Protein 1（CRABP1）遺伝子がメチル化の標的遺伝子であり、食道癌で高頻度にメチル化されていることが見出された。

【0010】

ヒトCRABP1は16kDa分子量の蛋白質で、レチノイン酸と高い親和性で結合する性質を有する。ヒトCRABP1はレチノイン酸と結合し、レチノイン酸を保護して細胞質から核まで運ぶ役割を有する蛋白質であることが知られている。核内でレチノイン酸はRAR（Retinoic Acid Receptor）及びRXR（Retinoic X Receptor）と結合し、シグナル伝達に関する重要な役割を果たす。ヒトCRABP1とホモロジーの高い蛋白質としてヒトCRABP2があり、両蛋白質はアミノ酸レベルでのホモロジーが75%である。ヒトCRABP1遺伝子の塩基配列と当該配列がコードするアミノ酸配列は、すでに知られている [GenBank番号：NM_004378 「Homo sapiens cellular retinoic acid binding protein 1 (CRABP1)」 (遺伝子)：配列番号1、アミノ酸配列：配列番号2]。

【0011】

[本検出方法]

前述したように、本検出方法は、食道上皮細胞におけるヒトCRABP1遺伝子の不活性化を検出することを特徴とする方法である。

【0012】

ヒトCRABP1遺伝子の不活性化を検出する対象となる食道上皮細胞は、検体提供者の生検組織細胞が好適である。この検体組織細胞は、健常人の食道細胞か、食道癌患者の当該癌組織であるかを問わないが、現実的には、1)内視鏡検査等の結果、食道に癌化が疑われる病変部が認められた場合の当該病変組織、または、2)食道癌であることが確定しているが、その悪性度や進行度を判定する必要がある食道癌の組織、等が主な対象となり得る。

【0013】

本検出方法により、「内視鏡検査等の結果、食道に癌化が疑われる病変部が認められた場合の当該病変組織」におけるヒトCRABP1遺伝子の不活性化が認められた場合には、当該病変組織は癌化に向かって進行しているか或いは既に癌化の状態であり、かつ、悪性度が

10

20

30

40

50

高くなりつつあることが判明し、早急な本格的治療（手術等による病変部の除去、本格的な化学療法等）を行う必要性が示される。また、「食道癌であることが確定しているが、その悪性度や進行度を判定する必要がある食道癌の組織」におけるヒトCRABP1遺伝子の不活性化が認められた場合にも、当該癌組織の悪性度が高くなりつつあり、かつ、リンパ節転移が疑われる。よって、早急な本格的治療（手術等による病変部の除去、リンパ節隔清、本格的な化学療法等）を行う必要性が示される。検体として採取された食道細胞組織は、必要な処理、例えば、採取された組織からのDNA或いはRNAの調製を行い、本検出方法を行う対象とすることができる。

【0014】

本検出方法は、上述したように、食道細胞におけるヒトCRABP1遺伝子の不活性化を検出することにより、当該細胞の癌化（特に、癌化のイニシエーション）を特定することが可能である。このヒトCRABP1遺伝子の不活性化の主要な原因は、当該遺伝子のCpGアイランドのメチル化であり、その他の原因としては、当該遺伝子の欠失及び発現の著しい低下等が挙げられる。CpGアイランドのメチル化による不活性化については、CpGリッチプロモーター及びエキソン領域を密にメチル化すると転写不活化がおこることが報告されている（Bird, A.P. & Wolffe, A.P.: Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin, Cell 99, 451-454, 1999）。癌細胞では、CpGアイランドはそれ以外の領域と比較すると高い頻度で密にメチル化されており、プロモーター領域のHypermethylationは、ヒト癌での癌抑制遺伝子の不活化に深く関与している（Ehrlich, M., Jiang, G., Fiala, E., Dome, J.S., Yu, M.C., Long, T.I., Youn, B., Sohn, O.S., Widschwendter, M., Tomlinson, G.E., Chintagumpala, M., Champagne, M., Parham, D., Liang, G., Malik, K. & Laird, P.W.: Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors, Oncogene, 21, 6694-6702, 2002）。

【0015】

本発明ではBAMCA法の感度と精度を上げ、全染色体を網羅的に解析するために4523種類のBAC DNAを搭載した高密度ゲノムアレイであるMCG Whole Genome Array-4500上でComparative Genomic Hybridization (CGH)を行い、食道癌細胞でメチル化されている染色体の領域を同定した。さらに、その領域に局在する遺伝子を調べた結果、ヒトCRABP1ゲノム遺伝子の同定に成功した。さらに、ヒトCRABP1ゲノム遺伝子のCpGアイランドのうちCpG-1領域がメチル化されることにより、プロモーター活性が抑制され、ヒトCRABP1遺伝子の発現が低下していることが判明した。43種類の食道扁平上皮癌細胞株を用いてヒトCRABP1遺伝子の発現を調べると、34種類の細胞株でヒトCRABP1遺伝子の発現は非常に低いレベルか、又は、発現していない状況であった。これは、CpGアイランドが高度にメチル化されていることがその原因であると推定される。これらの結果より、ヒトCRABP1遺伝子の不活性化は、主にそのゲノム遺伝子のCpGアイランドのメチル化により行なわれていると結論付けられた。

【0016】

なお、遺伝子の欠失を伴わない遺伝子の不活性化の代表的な態様として、ヒストン蛋白質のアセチル化の度合いの低下による不活性化が挙げられるが、食道癌細胞におけるヒトCRABP1遺伝子においては、このような現象は検出されていない。

【0017】

遺伝子の欠失を伴わない遺伝子の不活性化の確認は、遺伝子の転写産物、すなわち、検体におけるヒトCRABP1蛋白質の存在又は不存在、あるいは、増量又は減量を検出することにより行うことができる（遺伝子の欠失が伴う場合も可）。代表的な方法として、免疫染色法を挙げることができる。すなわち、検体（代表的には食道細胞組織の標本）におけるヒトCRABP1蛋白質を、当該蛋白質に対して特異的な抗体（モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体：既知のヒトCRABP1遺伝子又はヒトCRABP1蛋白質<通常は組換蛋白>を用いて常法により調製することが可能であり、市販もされている）を用いて直接的（標識されたヒトCRABP1蛋白質に対する抗体を用いた直接抗体結合法）、又は、好適には間接的に（標識された第2若しくは第3抗体を用いた二重抗体法又は三重抗体法）検出することが可

10

20

30

40

50

能である。かかる免疫染色法は常法に従い行うことができる。

【0018】

ヒトCRABP1遺伝子の欠失は、CpGアイランドのメチル化に比べれば、頻度はそれほど多くない。遺伝子欠失の検出を直接的に行うことができる代表的な方法として、CGH (Comparative Genomic Hybridization) 法とFISH法[蛍光in situ ハイブリダイゼーション (FISH: Fluorescence in situ hybridization): Yasui, K., Imoto, I., Fukuda, Y., Pimkahaokham, A., Yang, Z. Q., Naruto, T., Shimada, Y., Nakamura, Y., and Inazawa: Identification of target genes within an amplicon at 14q12-q13 in esophageal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 32, 112-118, 2001]を挙げることができる。この態様は、ヒトCRABP1遺伝子を有するBAC (Bacterial Artificial Chromosome) DNA、YAC (Yeast Artificial Chromosome) DNAまたはPAC (Phage Artificial Chromosome) DNA (以下、BAC DNA等ともいう) を標識し、FISHを行うと、ヒトCRABP1遺伝子の欠失部分を検出することができる。このような方法は、ゲノムDNA定着基板を用いて行うことが、好適であり、かつ、現実的である。通常に得られるBAC DNA等は、ゲノムDNA定着基板を多数製造して実用化するには少量であるので、当該DNAを遺伝子増幅産物として得る必要がある(この遺伝子増幅工程を「無尽蔵化又は無尽資源化」ともいう)。無尽蔵化においては、まずBAC DNA等を、4塩基認識酵素、例えば、RsaI、DpnI、HaeIII等で消化した後、アダプターを加えてライゲーションを行う。アダプターは10~30塩基、好適には15~25塩基からなるオリゴヌクレオチドで、2本鎖は相補的配列を有し、アニーリング後、平滑末端を形成する側の3'末端のオリゴヌクレオチドをリン酸化する必要がある。次に、アダプターの一方のオリゴヌクレオチドと同一配列部分を有するプライマーを用いて、PCR法により増幅し、無尽蔵化することができる。一方、各BAC DNA等に特徴的な配列を有する50~70塩基のアミノ化オリゴヌクレオチドを、アレイ上にスポットし、検出基板上で使用することもできる。

【0019】

このようにして無尽蔵化したBAC DNA等を基板上、好適には固体基板上に定着させることにより、所望するDNA定着基板を製造することができる。固体基板としては、ガラス、プラスチック、メンブレン、3次元アレイ等があげられ、スライドガラス等のガラス基板が好ましい。ガラス等の固体基板は、ポリ-L-リジン、アミノシラン、金・アルミニウム等の凝着により基板をコートすることがより好ましい。

【0020】

上記の無尽蔵化したDNAを基板上にスポットして乾燥させることにより、無尽蔵化したBAC DNA等を基板上、好適には固体基板上に定着させることにより、所望するDNA定着基板を製造することができる。

【0021】

また、このヒトCRABP1遺伝子の欠失を直接的に検出する手段の一つとしてサザンプロット法を挙げることができる。サザンプロット法は、検体から得られるゲノムDNAを制限酵素消化し、それを電気泳動後、ニトロセルロース膜上に固定し、これと、ヒトCRABP1遺伝子とのハイブリダイズを検出することにより、検体中の当該遺伝子の存在を検出する方法である。

【発明の効果】

【0022】

本発明により、食道細胞検体における癌化の兆候、癌の進行度や悪性度を的確に把握することが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

[参考例1] 多数の癌関連遺伝子を搭載した高密度CGHアレイの作製

National Cancer for Biotechnology及びUniversity of California Santa Cruz Biotechnologyのゲノムデータベースウェブサイト並びに選択されたDNAのBLAST検索の結果から、ヒトゲノムのユークロマチン領域に存在する4523種類のBAC/PACクローンを選択し

10

20

30

40

50

た。

【 0 0 2 4 】

BAC及びPAC DNAをDpnI、RsaI、HaeIIIで消化し、その後アダプター合成オリゴヌクレオチドとのライゲーションを行った。次に、アダプターの配列を有するプライマーを用いてPCRを2回行った。このプロセスを無尽蔵化といい、得られたDNAを無尽蔵化DNAと定義する。無尽蔵化DNAをインクジェットタイプのスポットター（GENESHOT、NGK Insulators、名古屋）を使用してDuplicateでアレイ上にスポットして、所望の高密度CGHアレイを作製した（MCG Whole Genome Array-4500）。

【 0 0 2 5 】

[参考例 2] 試験に用いたプライマーの開示

以下に、本試験にて用いた各種の遺伝子増幅用プライマーの内容を、下記表 1 にて開示する。下記の実施例にて用いた、遺伝子増幅工程は、この表 1 に示した内容のプライマーを用いて実行された（配列番号 4 ~ 25）。

【 0 0 2 6 】

【 表 1 】

方法	遺伝子名	フォワード・プライマー	リバース・プライマー
RT-PCR	<i>CRABP1</i>	5'-GCACGCAAACCTCTCTTGAAG (配列番号 4)	5'-CGGACATAAATCTGGTGCAG (配列番号 5)
	<i>p21</i>	5'-GAAGACCATGTGGACCTGT (配列番号 6)	5'-GGTAGAAATCTGTCAATGCTG (配列番号 7)
	<i>p27</i>	5'-GGACCCAAAGACTGATCCGT (配列番号 8)	5'-CAGAACCGGCATTTGGGGA (配列番号 9)
	<i>cyclin D1</i>	5'-CTGGCCATGAACTACCTGGA (配列番号 10)	5'-GTCACACTTGATCACTCTGG (配列番号 11)
	<i>GAPDH</i>	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT (配列番号 12)	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA (配列番号 13)
COBRA及び Bisulfite シーケンス法	<i>CRABP1</i> CpG-1	5'-TTGGAGGTTGAGGTATAATTGG (配列番号 14)	5'-TTCCACCCCTCCAAAACC (配列番号 15)
	CpG-2	5'-GAGGAAAGTTATTTATTTTGT (配列番号 16)	5'-CAACAACAATAAACCATAAACAC (配列番号 17)
遺伝子変異解析	<i>CRABP1</i> エクソン 1	5'-AGTTGAGCGCATACCGAGTA (配列番号 18)	5'-AACTTCCACCCCTCCAGG (配列番号 19)
	エクソン 2	5'-TTCTAAAGTTAGGGTATGACCA (配列番号 20)	5'-GAGACACAGGTTCTCCAGC (配列番号 21)
	エクソン 3	5'-TGACAGGGACCATGTGTTGA (配列番号 22)	5'-CCGAGTGAGGAGGACATAAT (配列番号 23)
	エクソン 4	5'-CAGGAAATTGAATGTCTGTTAC (配列番号 24)	5'-GTGCTAAGGACAGTAGGTAC (配列番号 25)

【 0 0 2 7 】

[実施例 1] 食道扁平上皮癌細胞のゲノム DNA メチル化の状況

食道扁平上皮癌細胞でどのような染色体遺伝子が高度にメチル化されているかを B A M C A 法 (Bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification) を用いて調べた。B A M C A 法を用いた解析の実例は Misawa A., Inoue J., Sugino Y., Hosoi H., Sugimoto T., Hosoda F., Ohki M., Imoto I., Inazawa J.: Methylation-associated silencing of the nuclear receptor 112 gene in advanced-type neuroblastomas, identified by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification, Cancer Research 65, 10233-10242, 2005 に報告されている。B A M C A 法を用いた解析の要約と結果の一部を図 2 A に記載した。

【 0 0 2 8 】

食道扁平上皮癌細胞としてTE-4、TE-5、KYSE-150、KYSE-510を用いた。正常な食道上皮細胞として正常食道上皮由来細胞株NEK2を用いた。癌細胞と正常細胞からDNAを調製し、MCG Whole Genome Array-4500を用いてBAMCA法での解析を行った(図2A:1と11参照)。上記4種類の食道扁平上皮癌細胞でCy3(癌細胞)/Cy5(コントロール正常細胞)の比が1.5以上を示す高度にメチル化されている染色体DNAに相当するBACクローンは61種類でその中に105種類の遺伝子を含んでいた(図2A:2参照)。次に、これらの105種類の遺伝子について、CpGアイランドと制限酵素SmaI認識配列(BAMCA法でのメチル化認識部位)が転写開始部位に近い領域にあるものを調べ(<http://genome.ucsc.edu/>を使用して検索)、さらに多数の組織及び癌での発現プロファイルを検討し(<http://www.lsbm.org/database/index.html>及び<http://www.ncbi.nih.gov/index.html>を使用して検索)、食道扁平上皮癌細胞で高度にメチル化されているために発現が著しく低下している可能性がある59種類の遺伝子を選び出した(図2A:21と3参照)。最後に、(a)各々の遺伝子の発現状況、(b)DNAメチル化阻害剤5-アザ-デオキシシチジン(5-aza-dCと略称)及び/或いはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチンA(TSAと略称)処理による遺伝子発現の回復の有無、(c)食道扁平上皮癌細胞での各々の遺伝子領域でのCpGアイランドのメチル化状態を解析することにより、BACクローンRP11-10K12内にあるCellular Retinoic Acid Binding Protein 1(CRABP1と略称、GenBank番号:NM_004378:配列番号1)が食道扁平上皮癌細胞で特異的に遺伝子発現が抑制されたメチル化標的遺伝子であることが判明した(図2A:31と4、図2B参照)。図2Bは、食道扁平上皮癌細胞TE-4細胞株についてBAMCA法で解析した典型的なアレイのデータを示している。異なる色(本来は、緑、黄色、赤色の3色)のスポットは、それぞれ、TE-4細胞株で正常食道細胞MEK2と比較して各々高度にメチル化された、同程度にメチル化された、メチル化されないゲノムDNA断片を示している。矢印で示したBACクローンRP11-10K12は、CRABP1ゲノム遺伝子の領域を有し、今回、BAMCA法を用いて検討したすべての細胞株(TE-4、TE-5、KYSE-150、KYSE-510)で、アレイ上の本BACクローンが高いCy3(食道癌検体)/Cy5(健常者検体)の比を示した。

【 0 0 2 9 】

ここで使用した4種類の食道扁平上皮癌細胞でヒトCRABP1周辺の制限酵素SmaI認識配列が高度にメチル化されていることを確認するために、Bisulfiteシーケンス解析(Sonoda I. et. al., Cancer Research 64, 3741-3747, 2004)によりメチル化状況を検討した。その結果、4種類の食道扁平上皮癌細胞すべてにおいて、3種類のSmaI認識部位のうちの前2ヶ所あるいは後ろ2ヶ所のいずれかのパターンで高度にメチル化されていることが判明した(図2C)。図2Cは、ヒトCRABP1ゲノム遺伝子の構造と、BAMCA法で解析したその予想プロモーター領域のSmaIサイトのメチル化の状況を示している。図2Cにおいて、3種類のCpGアイランド(CpG-1、-2、及び-3)が、ヒトCRABP1ゲノム遺伝子のエキソン1、エキソン2、及びイントロン2の領域に存在する(GenBankアクセス番号:ヒトCRABP1cDNA配列はNM_004378:配列番号1を、ヒトCRABP1ゲノム配列はNT_010194:配列番号3を参照)。5種類の細胞株を用いて、bisulfiteシーケンス法で解析した結果をCpGアイランドの下に示した。白及び黒塗りの扇状或いは円形は各々非メチル化及びメチル化されたSmaIサイトを示す。食道扁平上皮癌細胞では3種類のSmaIサイトの2ヶ所以上が高度にメチル化されているが、正常食道上皮細胞であるNEK2はいずれのSmaIサイトもメチル化されていないことがわかった。

【 0 0 3 0 】

対象として用いた正常細胞NEK2では3種類のどのSmaI認識部位もメチル化されていない。従って、この3種類のSmaI認識部位の間が高度にメチル化されている領域である可能性が高いことがわかった。

【 0 0 3 1 】

[実施例 2] 食道扁平上皮癌細胞株でのCRABP1の発現

図3A・Bでは、RT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)法に

10

20

30

40

50

て、食道扁平上皮癌細胞でのヒトCRABP1遺伝子の発現とメチル化の状況を検討した結果を示している。

【 0 0 3 2 】

図 3 A では、食道扁平上皮癌細胞 (KYSE 及び TE シリーズ) と正常食道上皮細胞 (Normal と表示) での、RT-PCR を用いたヒト CRABP1 mRNA 遺伝子発現の結果を示している。具体的には、4 3 種類の食道扁平上皮癌細胞株について RT-PCR を用いてヒト CRABP1 の発現を検討した所、3 4 種類の細胞株でヒト CRABP1 遺伝子は発現していないか非常に低いレベルの発現であった。グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子を内部標準として使用した。B A M C A 法の解析で使用した 4 種類の食道扁平上皮癌細胞では、KYSE-150 及び KYSE-510 細胞株はヒト CRABP1 の発現を検出できなかったが、TE-4 株と TE-5 株はヒト CRABP1 の発現を回復していたことが確認された。

10

【 0 0 3 3 】

図 3 B では、細胞を DNA メチル化阻害剤である 5-アザデオキシシチジン (5-aza-dCyd と略省、0~10mM) 存在下で 5 日間培養した後、ヒト CRABP1 遺伝子発現を培養細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法で解析した結果を示している。GAPDH 遺伝子を内部標準として使用した。この時、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A (TSA、100ng/ml) を加えて 1 2 時間培養し、両薬剤の相乗効果についても検討した。その結果、ヒト CRABP1 遺伝子発現が検出されない食道扁平上皮癌細胞でその発現の回復が認められた。一方、ヒト CRABP1 遺伝子発現を検出できなかった食道扁平上皮癌細胞株 KYSE-510 と TE-14 について、DNA メチル化阻害剤 5-aza-dC を加えて脱メチル化を行うことにより CRABP1 遺伝子発現が回復したが、ヒストン蛋白質の脱アセチル化阻害剤 TSA を加えてもヒト CRABP1 の発現は回復しなかった。TSA の添加は 5-aza-dC による CRABP1 遺伝子発現の回復に対して何ら促進効果は示さなかった (以上、図 3 B)。

20

【 0 0 3 4 】

【 実施例 3 】 食道扁平上皮癌細胞株の CRABP1 遺伝子内 CpG アイランドのメチル化

CpG PLOT (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>) を用いて検出したヒト CRABP1 遺伝子の CpG アイランドのメチル化の状況を解析した。図 2 C と図 3 A に示したように、ヒト CRABP1 遺伝子の発現が消失していた KYSE-150 と KYSE-510 細胞で認められた SmaI 認識部位のメチル化は、3 種類の SmaI 認識部位のうちの前 2 ヶ所が高度にメチル化されているパターンであったのに対し、ヒト CRABP1 遺伝子の発現があった TE-4 と TE-5 細胞では、3 種類の SmaI 認識部位のうちの後 2 ヶ所が高度にメチル化されているパターンであった。このことから、ヒト CRABP1 遺伝子発現抑制に關与する DNA メチル化は、前の 2 ヶ所の SmaI 認識部位周辺にある CpG アイランドに生じていることが予測された。

30

【 0 0 3 5 】

このため、前の 2 ヶ所の CpG アイランド (ヒト CRABP1 遺伝子の -142 IVS から +67 までのエキソン 1 をカバーする 355 塩基対からなる CpG-1 及び -117 IVS から +25 までのエキソン 2 をカバーする CpG-2) のメチル化状況と、ヒト CRABP1 遺伝子の発現を詳細に検討した。

【 0 0 3 6 】

まず、一連の食道扁平上皮癌細胞株と NEK2 株を使用して、COBRA 法を用いて CRABP1 の発現と CpG-1 と CpG-2 領域のメチル化状況の関連を解析した。図 3 C では、ヒト CRABP1 遺伝子を発現している食道扁平上皮癌細胞、ヒト CRABP1 遺伝子を発現していない食道扁平上皮癌細胞、及び、正常食道上皮細胞 NEK2 細胞、における COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) 法を用いた CpG-1 及び CpG-2 領域のメチル化に関する結果を示している。本図では、CpG-1 を有する 395 塩基対から成る PCR 産物、及び、CpG-2 を有する 427 塩基対からなる PCR 産物を水平の太線で示した。前者は BstUI 制限酵素で、後者は TaqI 制限酵素で消化される。縦のチェックの線は制限酵素消化部位を、電気泳動図の矢印はヒト CRABP1 ゲノム遺伝子の非メチル化を、矢頭はメチル化されたアレルを示す。

40

【 0 0 3 7 】

図 3 C においては、ヒト CRABP1 発現の消失していた食道扁平上皮癌細胞株では CpG-1 領域の高度のメチル化が検出されたことが示されたが、ヒト CRABP1 発現のある食道扁平上皮

50

癌細胞株やNEK-2細胞株ではCpG-1領域の高度なメチル化は検出されなかった。他方、CpG-2領域のメチル化は、食道扁平上皮癌細胞株でのヒトCRABP1遺伝子発現状況に関らず認められた。従って、CpG-1領域のメチル化がCpG-2領域以上にヒトCRABP1遺伝子発現と強く関連する重要な部位であると結論される。

【 0 0 3 8 】

さらに詳細にBisulfiteシーケンス解析を行うとCOBRA法での結果と一致して、CRABP1遺伝子発現が認められないKYSE-30、KYSE-510、及びKYSE-770細胞株ではCpG-1領域が高度にメチル化され、ヒトCRABP1遺伝子発現が認められるTE-4とKYSE-1260細胞株、及びNEK2細胞株ではメチル化されなかった(図4A)。

【 0 0 3 9 】

図4Aにおいて、上段の部分は、ヒトCRABP1のエキソン1を含む領域に存在するCpGアイランドのマップである。CpGアイランドを縦棒マークで示した。中段の部分は、ヒトCRABP1遺伝子を発現していない細胞株(KYSE-30、KYSE-510及びKYSE-770)、ヒトCRABP1遺伝子発現細胞株(TE-4及びKYSE-1260)及び正常食道上皮細胞株NEK2から抽出したゲノムDNAを用いてBisulfiteシーケンス解析を行った結果を示した。白塗り及び黒塗りの四角はそれぞれ非メチル化及びメチル化CpGサイトを示した。各列は1種類の細胞株でのメチル化状況を示す。BstUI制限酵素消化部位を矢印で示した。下段の部分は、領域1~5に種分けし、プロモーター活性を調べたゲノムDNA断片を水平の太線バーで示した。

【 0 0 4 0 】

[実施例 4] ヒトCRABP1遺伝子のCpGアイランド(CpG-1)のプロモーター活性

ヒトCRABP1遺伝子のCpGアイランドであるCpG-1領域のプロモーター活性を検討した。35塩基対から成るCpG-1領域を領域1から領域5までの5種類に分け(図4A)、各々のゲノムDNA断片をpGL3-Basicレポータープラスミド(Promega Madison WI)にクローニングした。それらのプラスミドを食道扁平上皮癌細胞株TE-4、KYSE-30、KYSE-510、KYSE-960にトランスフェクションし、36時間後に蛍ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、領域4と領域5、特に後者が強いルシフェラーゼ活性を示した(図4B)。従って、CpG1領域にヒトCRABP1遺伝子発現に関与するプロモーターが局在しており、その中で特に領域5のメチル化がヒトCRABP1遺伝子発現を抑制する上で十分な役割を果たしていることが推定された。

【 0 0 4 1 】

[実施例 5] 食道扁平上皮癌から誘導したプライマリー細胞株でのヒトCRABP1遺伝子のメチル化

食道扁平上皮癌臨床検体でもCRABP1遺伝子の異常メチル化が起こっているかどうかを検討するために、30名の患者より摘出した食道扁平上皮癌臨床検体由来のゲノムDNAを調製し、COBRA法を用いてCpG-1領域のメチル化状態を調べた(手法は、図3Cに準ずる)。その結果、調べたプライマリー癌細胞の約半数で明確なメチル化が検出された(図4Cと未記載データ: 図4Cの電気泳動図の下に示した矢頭はCpG-1の領域がメチル化されたプライマリー食道扁平上皮癌の検体を示す)。この結果をさらに定量的に確認するためにCpG-1領域のBisulfiteシーケンス解析を行った[図4D: 手法は図4Aに準じ、水平のバーは図4Bで解析したプロモーターと予想される領域(領域5)を示す]。その結果、食道扁平上皮癌臨床検体(症例1、4、10)で、CpG1領域が高度にメチル化されていることが確認された。従って、食道の癌化過程において、ヒトCRABP1遺伝子のCpGアイランド(CpG-1領域)の高度なメチル化により、ヒトCRABP1遺伝子発現が低下することが一般的なメカニズムであると推定された。

【 0 0 4 2 】

[実施例 6] ヒトCRABP1遺伝子発現が回復することによる食道扁平上皮癌細胞株の増殖の抑制

食道の癌化の過程でCRABP1遺伝子が癌抑制遺伝子として作用することを示すために、ヒトCRABP1遺伝子の発現が消失している食道扁平上皮癌細胞株を用いて、本遺伝子の強制発現が増殖を抑制するかどうかを検討した(図5A・B)。

10

20

30

40

50

【0043】

図5Aは、食道扁平上皮癌細胞を用いたコロニー形成能を調べるアッセイを示している。具体的には、ヒトCRABP1遺伝子を発現しない細胞株(KYSE-30及びKYSE-510)を、Myc-タグのヒトCRABP1発現プラスミド(pCMV-Tag3-CRABP1)又は空ベクター(pCMV-Tag3-empty)を用いて一過性にトランスフェクションし、その後3週間適切な濃度の抗生物質G418存在下で細胞を選択した結果を示している。

【0044】

図5Aの上段では、細胞抽出液(20µg蛋白質)を用いて電気泳動後、ウエスタンブロットを行い、抗Myc抗体を用いてヒトCRABP1蛋白質を検出すると、pCMV-Tag3-CRABP1プラスミドをトランスフェクションした細胞株(ヒトCRABP1と表示)では、Myc-タグCRABP1蛋白質が検出されたことが示されている。一方、空ベクターをトランスフェクションした細胞(Emptyと表示)ではヒトCRABP1蛋白質は検出されなかったことが示されている。同中段では、トランスフェクション3週間後G418耐性細胞を選択すると、pCMV-Tag3-CRABP1プラスミドをトランスフェクションした細胞株(CRABP1と表示)では空ベクターをトランスフェクションした細胞(Emptyと表示)と比較するとコロニー数が顕著に減少していたことが示されている。同下段は、コロニー形成能の定量的解析結果を示している。具体的には、2mm以上のサイズのコロニーを計数した。3回の実験結果を平均値±標準偏差(棒グラフの上の小さいバーで示す)で示した。各々について3回の実験を行った。

【0045】

さらに、図5Bにおいて、同じ食道扁平上皮癌細胞株KYSE-30及びKYSE-510と、ヒトCRABP1発現プラスミドを用いて、ヒトCRABP1を安定的に発現する細胞株(CRABP1 cloneと表示)を作製して、その増殖を、空ベクターを安定的に導入した細胞株(Empty Cloneと表示)と比較した結果を示す。すなわち、pCMV-Tag3-CRABP1プラスミド或いは空ベクターでトランスフェクションを行い、G418で選択して分離したヒトCRABP1遺伝子を安定して発現する細胞株(KYSE-30及びKYSE-510)の生育の低下が認められた。

【0046】

図5Bの上段では、pCMV-Tag3-CRABP1プラスミドをトランスフェクションしたKYSE-30株とKYSE-510株の抽出液(20µg蛋白質)を抗Myc-タグ抗体を用いたウエスタンブロット法での解析により、両細胞株はMyc-タグCRABP1蛋白質を発現していることが示されている。同下段では、KYSE-30株とKYSE-510株が、安定的にヒトCRABP1を発現することが生育に及ぼす影響を検討している。具体的には、ヒトCRABP1を発現する細胞と空ベクターをトランスフェクションした細胞を用いて、生存細胞数を比色法で測定する水可溶性テトラゾリウムソルト(WST)アッセイにより測定している。本試薬は株式会社同仁化学研究所(熊本)が販売しているCell Counting kit-8である。3回の実験結果を平均値±標準偏差で示した。Mann-Whitney Uテストを用いた統計解析を行うとすべての場合でP値が0.05以下であった。

【0047】

[実施例7] CRABP1遺伝子発現をノックダウンした癌細胞での増殖の促進

ヒトCRABP1特異的なsiRNA(CRABP1-siRNA)を食道扁平上皮癌細胞株TE-4にトランスフェクションし、ヒトCRABP1の発現をノックダウンした。その結果、トランスフェクション48~96時間後に、ヒトCRABP1タンパク量は顕著に減少した。その細胞株はコントロールsiRNA(Luc-siRNA)をトランスフェクションした細胞と比較して増殖が促進した(図5C:アッセイ法は図5Bの説明を参照のこと)。さらに、ヒトCRABP1発現プラスミドの導入により、ヒトCRABP1を安定的に発現するようにしたKYSE-30及びKYSE-510癌細胞株由来の細胞株(クローン)を用いた実験でも、ヒトCRABP1遺伝子発現をノックダウンすることにより増殖が部分的に回復した(図4D:図5Cの説明を参照のこと)。

【0048】

[実施例8] 食道扁平上皮癌のセルサイクルアレストに及ぼすヒトCRABP1遺伝子発現の影響

食道扁平上皮癌に及ぼすヒトCRABP1蛋白質の役割を明らかにするために、ヒトCRABP1遺

10

20

30

40

50

伝子を安定的に発現している遺伝子導入細胞及び空ベクターを導入したコントロール細胞でのセルサイクルをFluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)により用いて解析した。

【 0 0 4 9 】

KYSE-30及びKYSE-510細胞から樹立したCRABP1遺伝子導入細胞 (CRABP1 clone1とclone2) はコントロール細胞と比較すると、セルサイクルがG₀-G₁期に集積し、S₁期の細胞は減少した (図 6 A)。以下、詳細に説明する。

【 0 0 5 0 】

図 6 A では、ヒトCRABP1を安定して発現する細胞 (CRABP1クローンと表示) 及びそうでないコントロール細胞 (Empty Cloneと表示) を用いてFACS解析を行うことにより、ヒトCRABP1の抗増殖効果の機構を解析した結果を示している。KYSE-30及びKYSE-510株から樹立した安定してヒトCRABP1を発現する細胞は、G₀-G₁期に細胞周期が停止し、その結果、コントロール細胞株と比較するとS期の細胞が減少していた。この結果はヒトCRABP1の発現が、食道扁平上皮癌細胞でG₁-S期のセルサイクルのチェックポイントで細胞をアレストする、即ちG₀-G₁アレストを誘導することを示している。しかし、遺伝子導入細胞はsub-G₁期で増加していないこと、並びに、老化のアッセイであるSA-β-galactosidase陽性細胞が観察されなかったことより、ヒトCRABP1遺伝子の発現によりアポトーシスも老化も起こっていないことが示唆された。

【 0 0 5 1 】

次に、図 6 B では、G₁-S期のセルサイクルのチェックポイントに関係する蛋白質の発現レベルを検討している。具体的には、KYSE-30及びKYSE-510株から樹立した、安定してヒトCRABP1を発現する細胞 (CRABP1と表示) 及びコントロール細胞 (Empty Cloneと表示) から調製した20 μg蛋白質抽出液について電気泳動を行い、ウエスタンブロット法でMyc-CRABP1、p21、p27、CyclinD1、及びp44/42蛋白質 (MAPキナーゼ) の発現レベルを調べた。p21及びp27蛋白質はサイクリン依存性リン酸化酵素の阻害剤である。その結果、ヒトCRABP1遺伝子導入細胞 (KYSE-30及びKYSE-510細胞) は、コントロールと比較すると、G₁期からS期への移行を抑制する蛋白質であるp27量が増大したことが示された。これに対し、p27と同じ役割を果たす蛋白質p21の量は、KYSE-30遺伝子導入株で上昇したが、KYSE-510遺伝子導入株ではコントロールと同じであった。

【 0 0 5 2 】

図 6 C では、KYSE-30及びKYSE-510株から樹立した安定してヒトCRABP1を発現する細胞 (CRABP1と表示) 及びコントロール細胞 (Emptyと表示) を用いて、G₁-S期のセルサイクルのチェックポイントと関連する遺伝子 (p21、p27及びCyclinD1遺伝子) のRT-PCRでの解析結果を示している。RT-PCRによる解析では、ヒトCRABP1遺伝子導入細胞でp21及びp27遺伝子発現は上昇しなかった。この結果は、ヒトCRABP1遺伝子導入細胞でp21及びp27蛋白質レベルが増大したことは蛋白質の安定性の上昇が原因で、転写及びmRNA安定性の結果ではないといえる。

【 0 0 5 3 】

さらに、図 6 D では、内因性ヒトCRABP1遺伝子発現の影響をチェックするために、食道扁平上皮癌細胞TE-4に、CRABP1-siRNA及びコントロールsiRNA [luciferase-siRNA (Luc-siRNA)] をトランスフェクションし、その72時間後にp21及びp27の量をウエスタンブロット法で調べた。その結果、ヒトCRABP1遺伝子をノックダウンすることにより、p21蛋白質のレベルは変化がなかったが、p27蛋白質は減少した (図 6 D)。

【 0 0 5 4 】

[実施例 9] 食道扁平上皮癌でのヒトCRABP1遺伝子体細胞変異についての検討

ヒトCRABP1の不活化要因として、ヒトCRABP1遺伝子体細胞変異の可能性も考えられるので、43種類の細胞株と30種類の食道扁平上皮癌臨床検体を用いて検討した。その結果、KYSE-110株においてのみ、ヒトCRABP1遺伝子の新規な遺伝子変異がエキソン1のA1C変異 (開始コドンATGのAがCに置換) に見出された。本変異により、開始コドンが欠失し、ヒトCRABP1の最初の9アミノ酸残基が失われる。しかし、KYSE-110株を樹立した由来

10

20

30

40

50

となる食道癌臨床検体では、同じ変異は検出されず、細胞株樹立の過程で獲得された変異と考えられた。従って、ヒトCRABP1遺伝子の体細胞変異の起こる確率は低いと考えられる。

【 0 0 5 5 】

[実施例 1 0] 食道扁平上皮癌臨床検体でのヒトCRABP1蛋白質の発現と病理との関連
食道扁平上皮癌でのヒトCRABP1発現の低下とそれがもたらす臨床病理的重要性を検討するために、113種類の食道扁平上皮癌臨床検体でのヒトCRABP1蛋白質の発現を、ヒトCRABP1に特異的に結合する抗体を用いた免疫染色により検討した(図7A~Cは、顕微鏡下(×200)における免疫染色像である)。

【 0 0 5 6 】

ヒトCRABP1蛋白質の染色は、ホルマリン固定、パラフィン包埋した食道癌組織切片を用いて間接蛍光抗体法で行った。すなわち、シランコートしたガラススライド上の食道癌切片を脱パラフィン処理し、エタノール濃度を段階的に変えて脱水した。次に、スライド上の抗原蛋白質を、クエン酸緩衝液(pH6.0)中で電子レンジにより95℃で10分間処理を行い、その後、室温まで冷却した。組織由来のパーオキシダーゼは、5%過酸化水素を使用してブロックした。さらに、非特異的染色について2%ブタ血清を用いてブロックした。そのスライドを、抗ヒトCRABP1マウスモノクローナル抗体(Sigma社製のclone C-1を100倍に希釈して使用)を用いて、一晚4℃でインキュベートした。食道癌組織中のヒトCRABP1蛋白質を検出するために、さらに、そのスライドを2次抗体とパーオキシダーゼ(Dako社製のEnvision Plus)を含むデキストランポリマー試薬と、室温で2時間反応させた。0.2%Diaminobenzidine tetrahydrochlorideと過酸化水素を加えて、ヒトCRABP1を発色させた。さらに、Mayer's hematoxylinを用いて対比染色を行った。

【 0 0 5 7 】

ヒトCRABP1mRNAが発現しているホルマリンで固定した食道扁平上皮癌細胞(TE-4)は、細胞内ヒトCRABP1染色が細胞の50%以上で検出されており、それを陽性コントロールとして使用した。ブタ血清を用いてインキュベーションを行った組織切片を陰性コントロールとして使用した。ヒトCRABP1蛋白質を陽性に染色した総細胞数のパーセントを、各々の実験で求めて評価を行った。ヒトCRABP1蛋白質の発現が癌細胞の10%以上で検出される場合を陽性、当該検出が10%未満の場合、又は、検出されない場合を陰性と判定した。2人の顕微鏡観察により最終評価を行った。2人の間で大きな違いが認められた場合には、議論を行い、統一見解を示した。組織を提供した患者の臨床情報を伏せて組織染色の結果を出した。

【 0 0 5 8 】

正常食道上皮組織周辺の非癌部ではCRABP1の染色は棘状細胞層から開始し、表在層の方向に従って染色は強くなった(図7A)。他方、食道扁平上皮癌であっても、良く分化した領域ではヒトCRABP1染色陽性の所見が認められたが(図7B:ヒトCRABP1蛋白質染色が癌細胞の10%以上に認められるヒトCRABP1遺伝子を発現する食道扁平上皮癌臨床検体)、分化度が低い癌部では検出されなかった(陰性、図7C:ヒトCRABP1蛋白質染色が癌細胞の10%以下のCRABP1遺伝子を発現しない扁平上皮癌細胞)。ヒトCRABP1の免疫染色は主に正常食道細胞及び食道扁平上皮癌細胞の細胞質に検出された。検討した113種類の食道扁平上皮癌臨床検体の中で、39種類(34.5%)は癌細胞の10%以上でCRABP1の免疫反応が陽性であり、74種類(65.5%)はその免疫反応は10%以下或いは陰性であった(表2)。食道扁平上皮癌での113例のヒトCRABP1発現と臨床病理との関連も表2に記載した。

【 0 0 5 9 】

10

20

30

40

【表 2】

	n	CRABP1 免疫反応性		P値
		陽性 (%)	陰性 (%)	
合計	113	39 (34.5)	74 (65.5)	
性別				
男性	93	31 (33.3)	62 (66.7)	0.569
女性	20	8 (40.0)	12 (60.0)	
年齢 (歳)				
平均	63.7			
>60	37	13 (35.1)	24 (64.9)	0.923
=60	76	26 (34.2)	50 (65.8)	
癌の部位				
頸部	5	1 (20.0)	4 (80.0)	0.820
胸郭上部	42	15 (35.7)	27 (64.3)	
胸郭中部	57	19 (33.3)	38 (66.7)	
胸郭下部	9	4 (44.4)	5 (55.6)	
組織病理学的分類				
高分化癌	38	20 (52.6)	18 (47.3)	<u>0.004</u>
中程度の分化癌	60	18 (30.0)	42 (70.0)	
低分化癌	15	1 (6.7)	14 (93.3)	
pT分類				
pT1	19	2 (10.5)	17 (89.5)	<u>0.017</u>
pT2/3	94	37 (39.4)	57 (60.6)	
pN分類				
pN0	31	12 (38.7)	19 (61.3)	0.564
pN1	82	27 (32.9)	55 (67.1)	
pM分類				
pM0	95	37 (38.9)	58 (61.1)	<u>0.029</u>
pM1/1a/1b	18	2 (11.1)	16 (88.9)	
病期 (ステージ)				
I	9	1 (11.1)	8 (88.9)	<u>0.032</u>
IIA/II B	36	16 (44.4)	20 (55.6)	
III	50	20 (40.0)	30 (60.0)	
IV/IVA/IV B	18	2 (11.1)	16 (88.9)	

注：統計的に有意な値には、下線が引かれている。

* P値は、カイニ乗 (χ^2) またはフィッシャーの正確確率検定による値であり、0.05未満の時に統計的に有意であるとする。

【0060】

表 2 に示した通り、ヒトCRABP1の検出が陰性の例は良く分化した癌よりも分化度が低い癌で顕著に認められた。即ち、pTの癌のカテゴリーではpT2/3よりもpT1で、pMのカテゴリーの癌ではpM0よりもpM1/1a/1bで、ステージではステージII或いはIIIよりもステージIで

10

20

30

40

50

陰性の頻度が高かった。

【 0 0 6 1 】

リンパ節転移の有無は食道扁平上皮癌患者での治療法を選択する上で重要な情報であることから、CRABP1免疫染色が遠位リンパ節転移を予想するために有用かどうかを検討した。pM1食道扁平上皮癌患者（18人中16人で88.9%を占める）では癌の進達度に関係なくCRABP1免疫染色は陰性であった〔表3：転移（レベルpM1、pM1a、及びpM1b）を伴った各々の患者の背景となるデータを開示した〕。

【 0 0 6 2 】

【表3】

CRABP1免疫反応性	年齢（歳）	性別	癌の分化度	癌の発生部位	pT	pN	pM	pステージ
陰性	7 5	男性	中程度	胸郭中部	1	0	1 b	IVB
	5 4	男性	中程度	胸郭中部	1	0	1 b	IVB
	6 2	男性	中程度	胸郭中部	1	1	1 b	IVB
	7 6	男性	低分化	胸郭中部	1	1	1 b	IVB
	6 0	男性	中程度	頸部	2	1	1	IV
	7 1	男性	高分化	胸郭下部	2	1	1 b	IVB
	4 6	女性	中程度	胸郭下部	2	1	1 b	IVB
	6 2	男性	低分化	胸郭中部	2	1	1 b	IVB
	4 9	女性	中程度	頸部	3	1	1	IVB
	4 5	男性	中程度	胸郭下部	3	1	1 a	IVA
	7 6	男性	中程度	胸郭下部	3	1	1 a	IVA
	8 4	男性	中程度	胸郭上部	3	1	1 a	IVA
	6 1	男性	中程度	胸郭上部	3	1	1 a	IVA
	6 2	男性	低分化	胸郭上部	3	1	1 a	IVA
	6 5	男性	中程度	胸郭下部	3	1	1 b	IVB
	7 5	男性	中程度	胸郭下部	3	1	1 b	IVB
陽性	4 9	男性	中程度	胸郭中部	3	1	1 b	IVB
	5 5	女性	中程度	胸郭中部	3	1	1 b	IVB

10

20

30

【 0 0 6 3 】

さらに、pT2/T3食道扁平上皮癌患者では、治療法を正しく選択するために癌の微小転移を正しく予想する必要があるが、ヒトCRABP1免疫染色陰性の患者は有意にリンパ節転移が陽性である（表4：pT2/3レベルの患者のpMのカテゴリーとヒトCRABP1発現の関係を開示した）。これらの結果より、より進展した食道扁平上皮癌患者は、ヒトCRABP1免疫染色が陰性であることを裏付けている。

40

【 0 0 6 4 】

【表 4】

	n	CRABP1 免疫反応性		P値
		陽性 (%)	陰性 (%)	
M0	80	35 (43.8)	45 (56.3)	<u>0.042</u>
M1/1a/1b	14	2 (14.3)	12 (85.7)	

注：統計的に有意な値には、下線が引かれている。

* P値は、フィッシャーの正確確率検定による値であり、0.05未満の時に統計的に有意である。

10

【0065】

以上、実施例において開示した事項から、食道癌が疑われる患者の食道より癌の可能性のある組織の一部を採取し、DNAを調製する。健常者のDNAをコントロールとして用いてCOBRA法あるいはメチル化特異的PCR法を用いてヒトCRABP1ゲノム遺伝子のメチル化の有無を解析することが可能であることが示された。或いは、ヒトCRABP1遺伝子のmRNA発現のNorthern blotting、RT-PCR、マイクロアレイによる解析や、ヒトCRABP1蛋白の免疫染色を行うことにより、それぞれヒトCRABP1遺伝子mRNA発現が低下しているかどうか、ヒトCRABP1蛋白が免疫染色で検出されないかどうかを調べることが可能であり、その結果、食道癌の悪性度、リンパ節転移の可能性についての予測・診断を行うことができることが示された。さらに、血液中のメチル化ヒトCRABP1遺伝子の有無をメチル化特異的PCR法を用いて検出することにより、遠隔臓器への転移の有無の予測・診断が可能であることも明らかとなった。

20

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1】BAMCA法の手順の概略を示した図面である。

【図2A】BAMCA法を用いた解析の要約と結果の一部を示した図面である。

【図2B】食道扁平上皮癌細胞TE-4細胞株についてBAMCA法で解析した典型的なアレイのデータを示した図面である。

30

【図2C】ヒトCRABP1ゲノム遺伝子の構造と、BAMCA法で解析したその予想プロモーター領域のSmaIサイトのメチル化の状況を示した図面である。

【図3A】食道扁平上皮癌細胞と正常食道上皮細胞での、RT-PCRを用いたヒトCRABP1mRNA遺伝子発現の結果を示した図面である。

【図3B】細胞をメチル化阻害剤存在下で培養した後、RT-PCR法で解析した結果を示した図面である。

【図3C】ヒトCRABP1遺伝子を発現している食道扁平上皮癌細胞と、同遺伝子を発現していない食道扁平上皮癌細胞と、正常食道上皮細胞、におけるCOBRA法を用いたCpG領域のメチル化に関する結果を示した図面である。

【図4A】ヒトCRABP1遺伝子のCpGアイランドであるCpG-1領域のメチル化とプロモーター活性を検討した図面的一方である。

40

【図4B】ヒトCRABP1遺伝子のCpGアイランドであるCpG-1領域のプロモーター活性を検討した図面他方である。

【図4C】食道扁平上皮癌から誘導したプライマリー細胞株でのヒトCRABP1遺伝子のメチル化について検討した図面的一方である。

【図4D】食道扁平上皮癌から誘導したプライマリー細胞株でのヒトCRABP1遺伝子のメチル化について検討した図面他方である。

【図5A】ヒトCRABP1遺伝子発現が回復することによる食道扁平上皮癌細胞株の増殖の抑制について検討した図面的一方である。

【図5B】ヒトCRABP1遺伝子発現が回復することによる食道扁平上皮癌細胞株の増殖の抑

50

制について検討した図面の他方である。

【図5C】ヒトCRABP1遺伝子発現をノックダウンした癌細胞での増殖の促進について検討した図面的一方である。

【図5D】ヒトCRABP1遺伝子発現をノックダウンした癌細胞での増殖の促進について検討した図面の他方である。

【図6A】ヒトCRABP1を安定して発現する細胞と、そうでないコントロール細胞を用いてFACS解析を行うことにより、ヒトCRABP1の抗増殖効果の機構を解析した結果を示した図面である。

【図6B】G₁-S期の細胞周期チェックポイントに関する蛋白質の発現レベルを検討した結果を示す図面である。

【図6C】安定してヒトCRABP1を発現する細胞と、コントロール細胞を用いて、G₁-S期の細胞周期チェックポイントと関連する遺伝子のRT-PCRでの解析結果を示した図面である。

【図6D】内因性ヒトCRABP1遺伝子発現の影響について検討した結果を示す図面である。

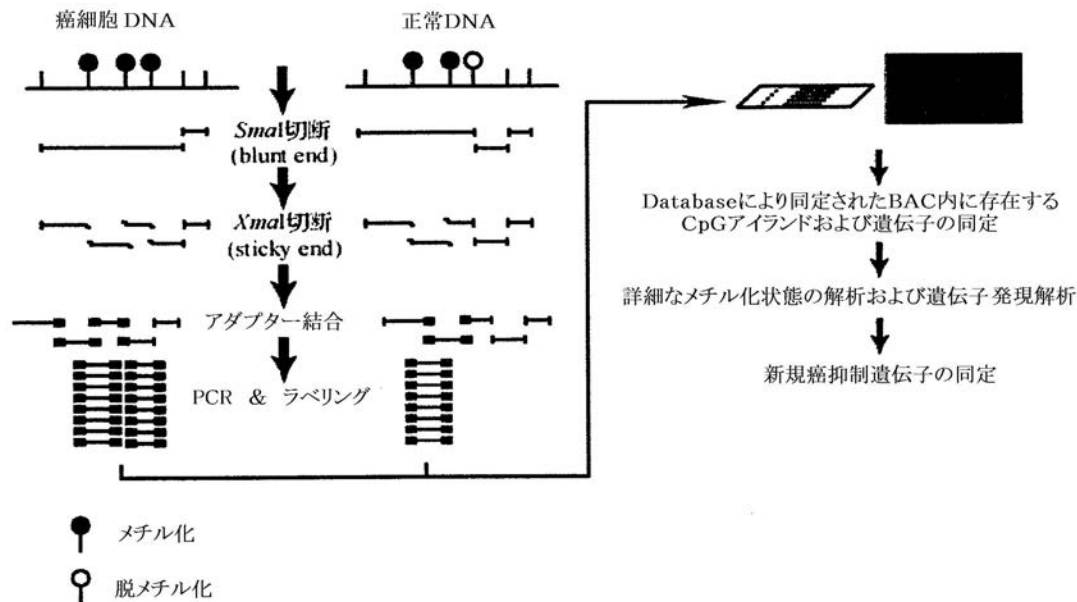
【図7A】食道扁平上皮癌臨床検体でのヒトCRABP1蛋白質の発現と臨床病理との関連について、正常細胞株にて、免疫染色により検討した結果を示す図面である。

【図7B】食道扁平上皮癌臨床検体でのヒトCRABP1蛋白質の発現と臨床病理との関連について、高分化癌株（悪性度低い）にて、免疫染色により検討した結果を示す図面である。

【図7C】食道扁平上皮癌臨床検体でのヒトCRABP1蛋白質の発現と臨床病理との関連について、低分化癌株（悪性度高い）にて、免疫染色により検討した結果を示す図面である。

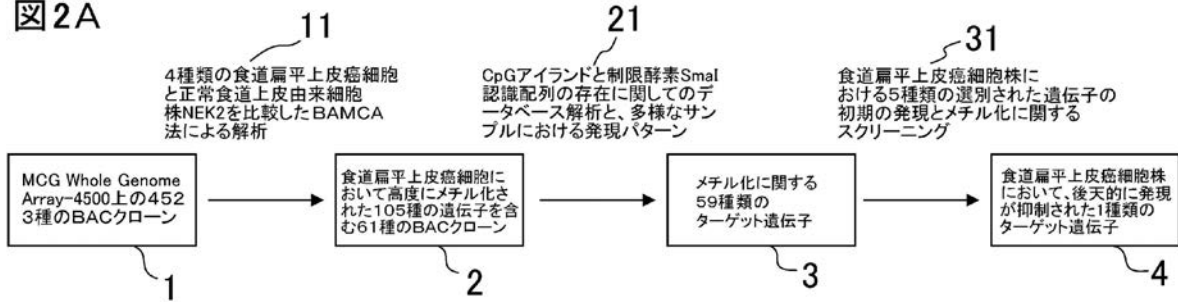
【図1】

図1



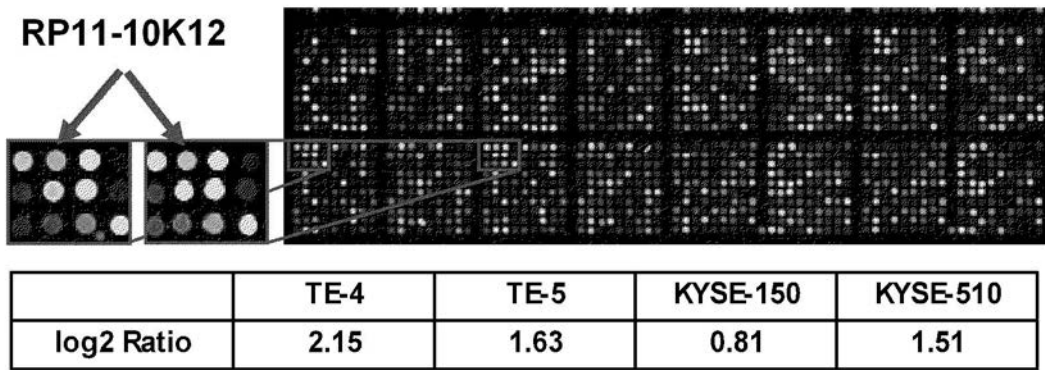
【図2A】

図2A



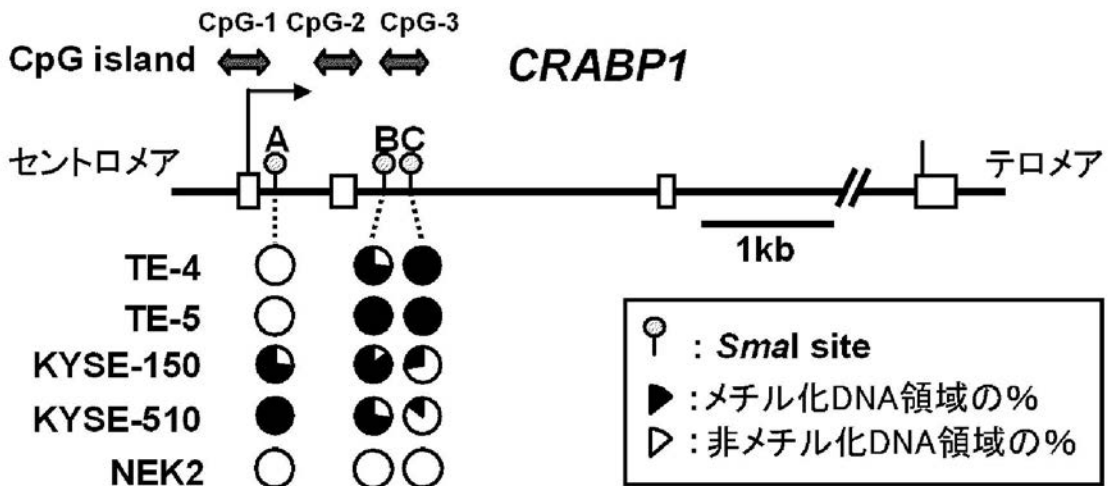
【図2B】

図2B



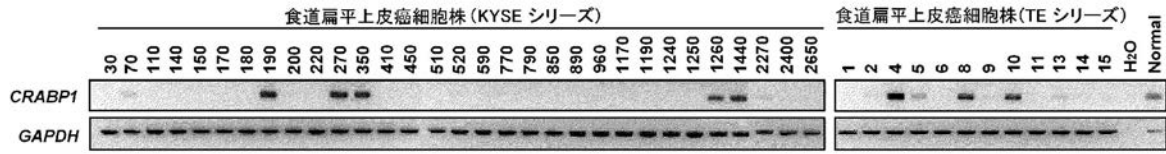
【図2C】

図2C



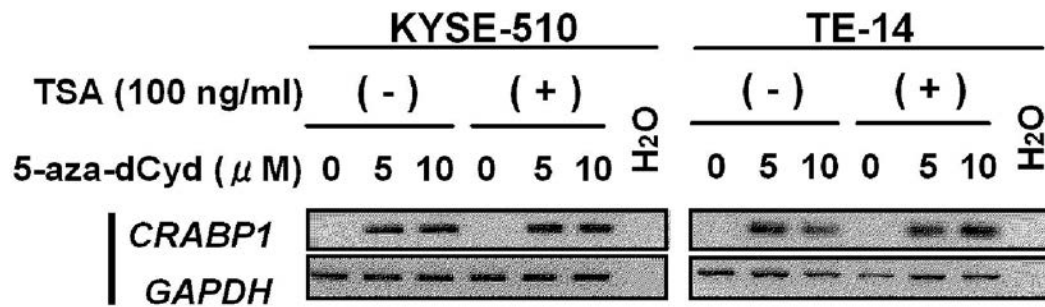
【 図 3 A 】

図3A



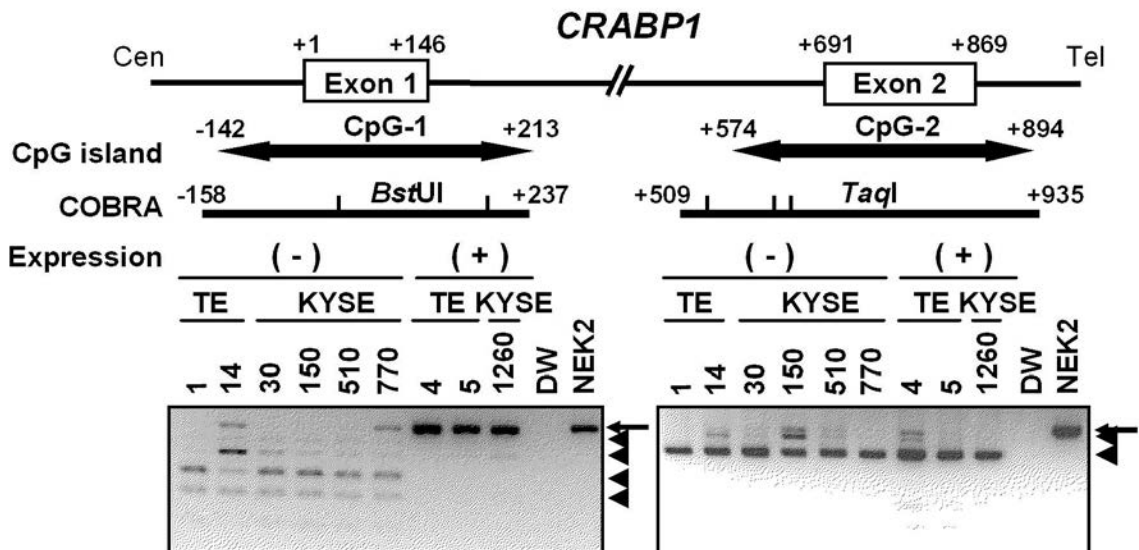
【 図 3 B 】

図3B



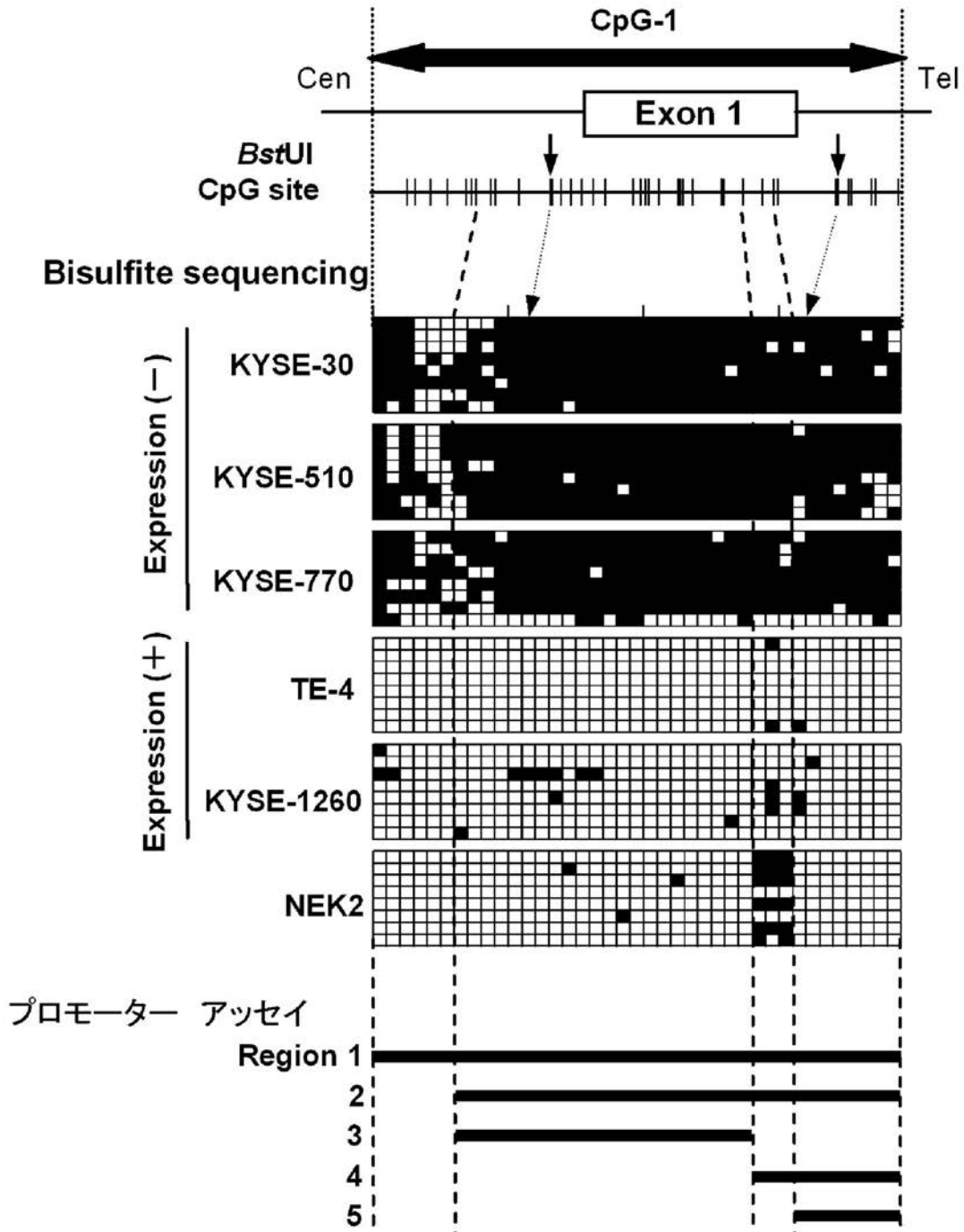
【 図 3 C 】

図3C



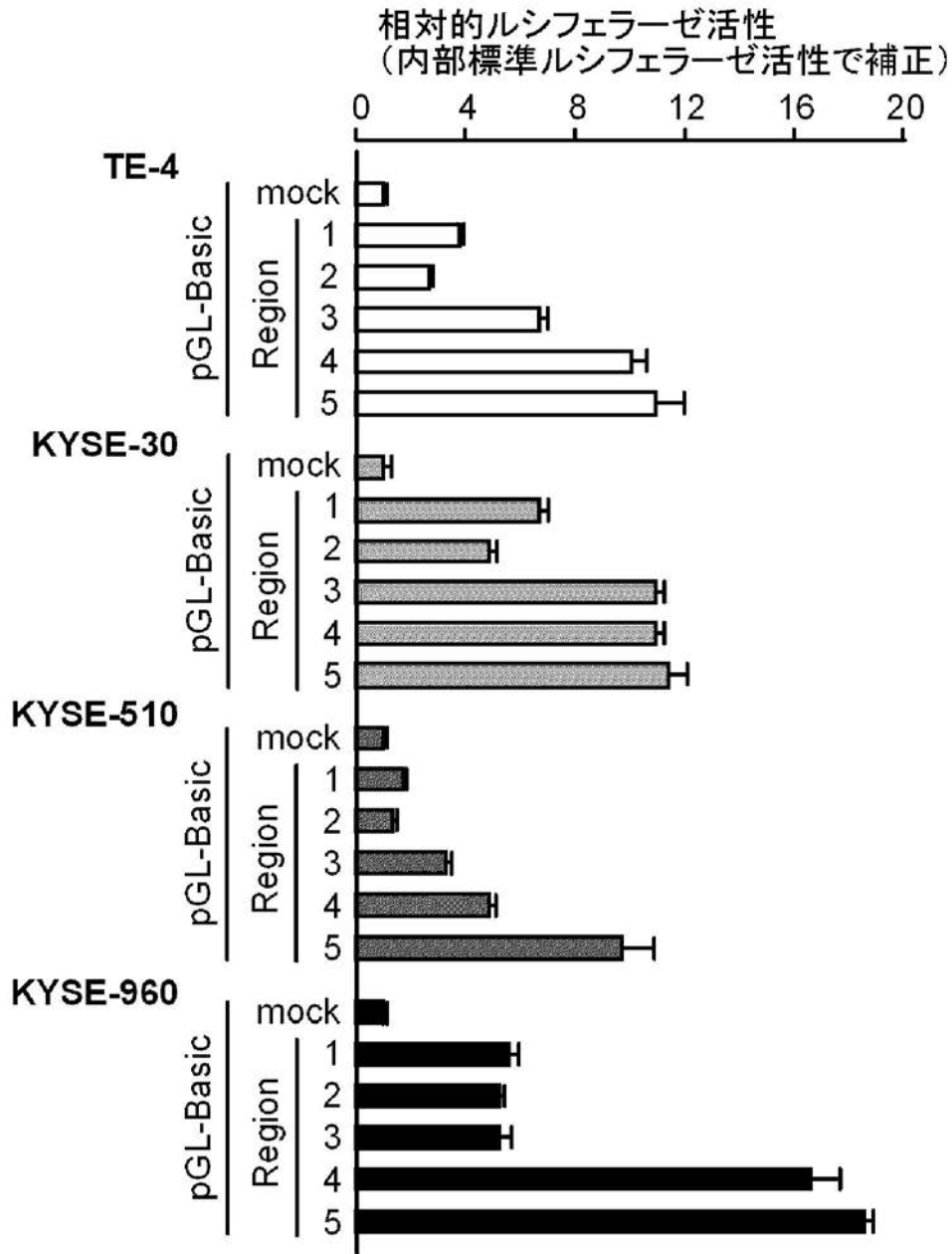
【 図 4 A 】

図 4A



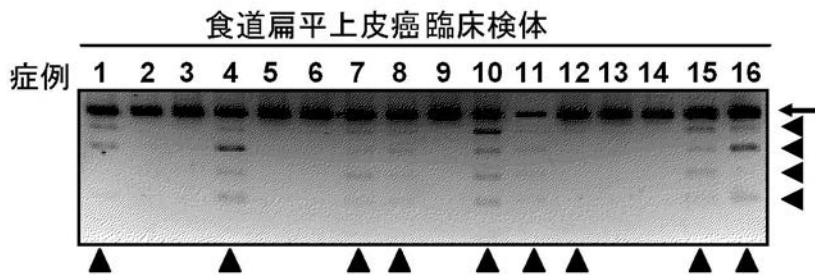
【 図 4 B 】

図 4 B



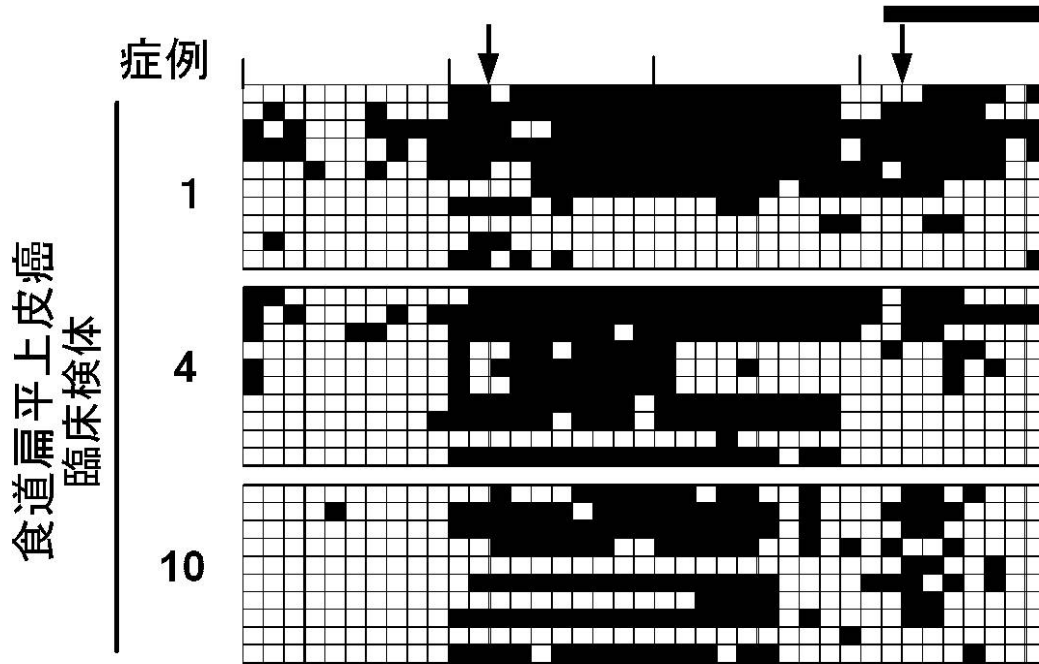
【 図 4 C 】

図 4 C



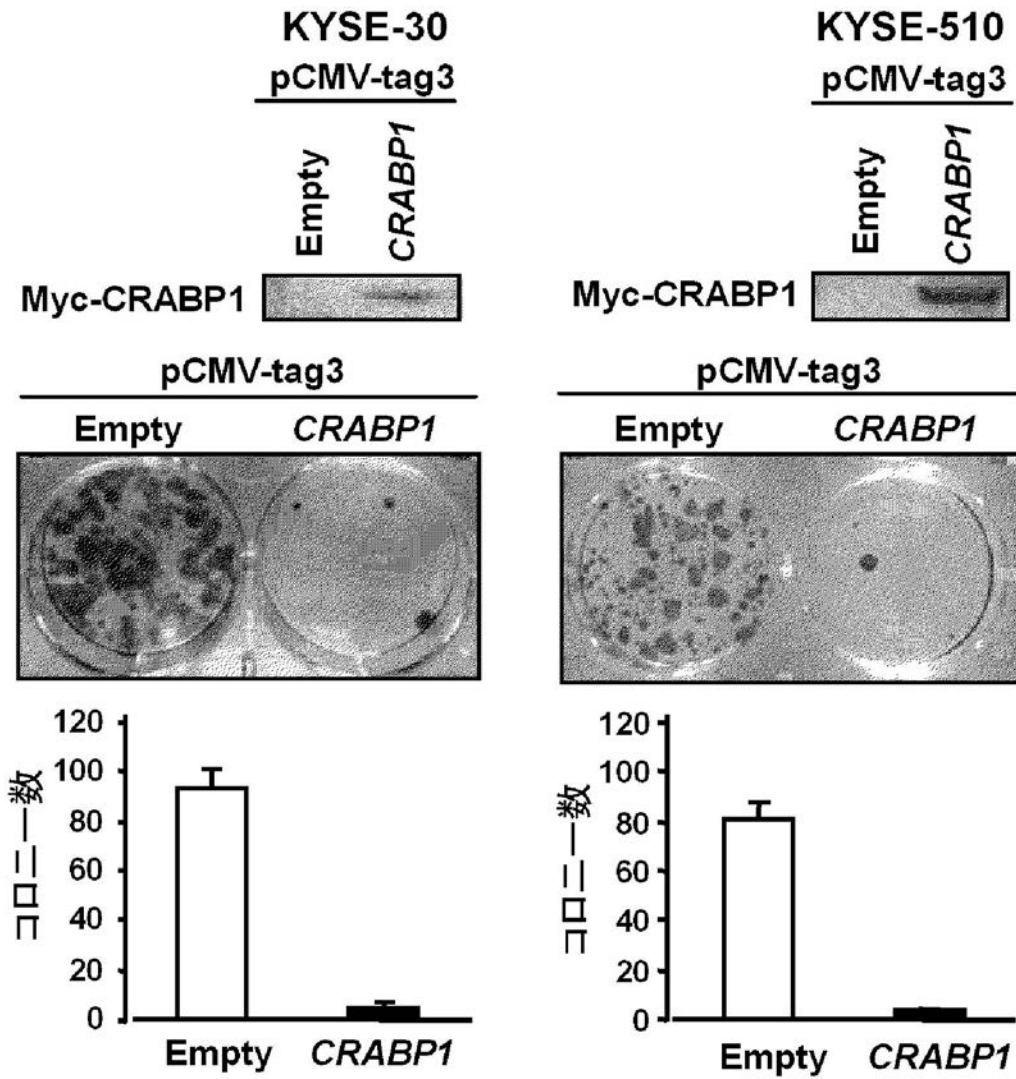
【図4D】

図4D



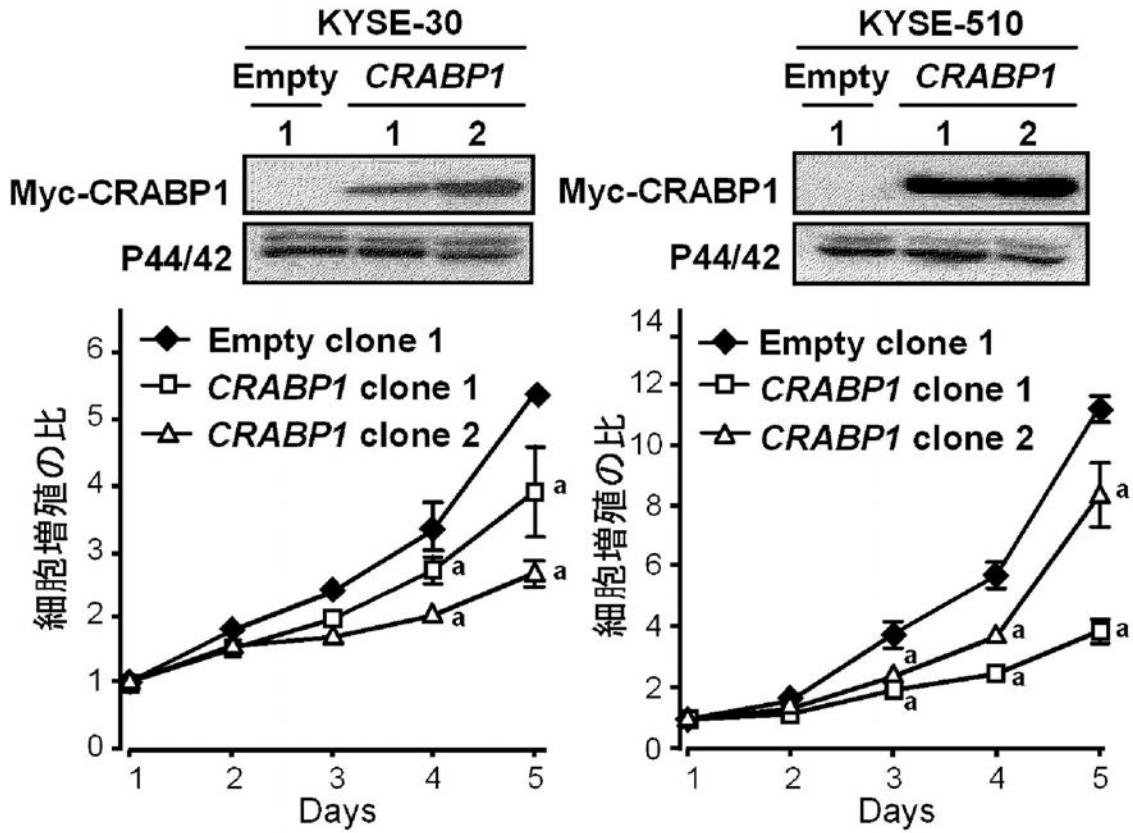
【 図 5 A 】

図 5 A



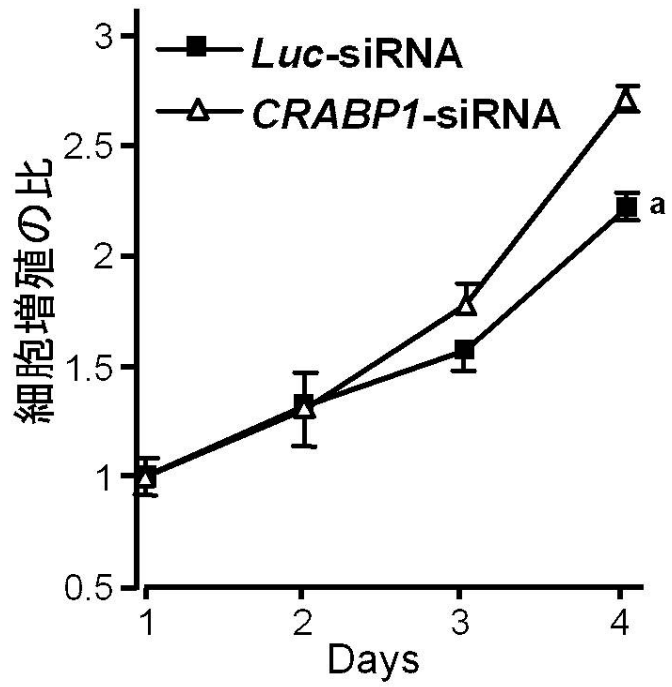
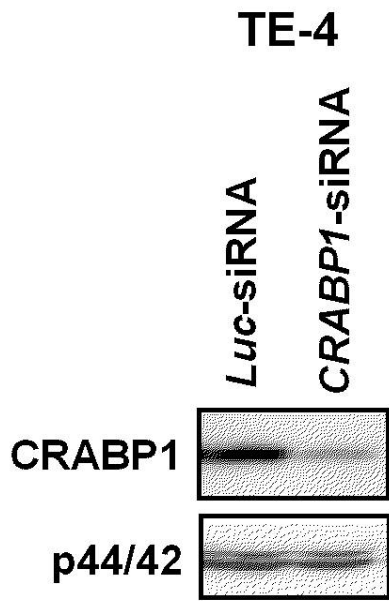
【図5B】

図5B



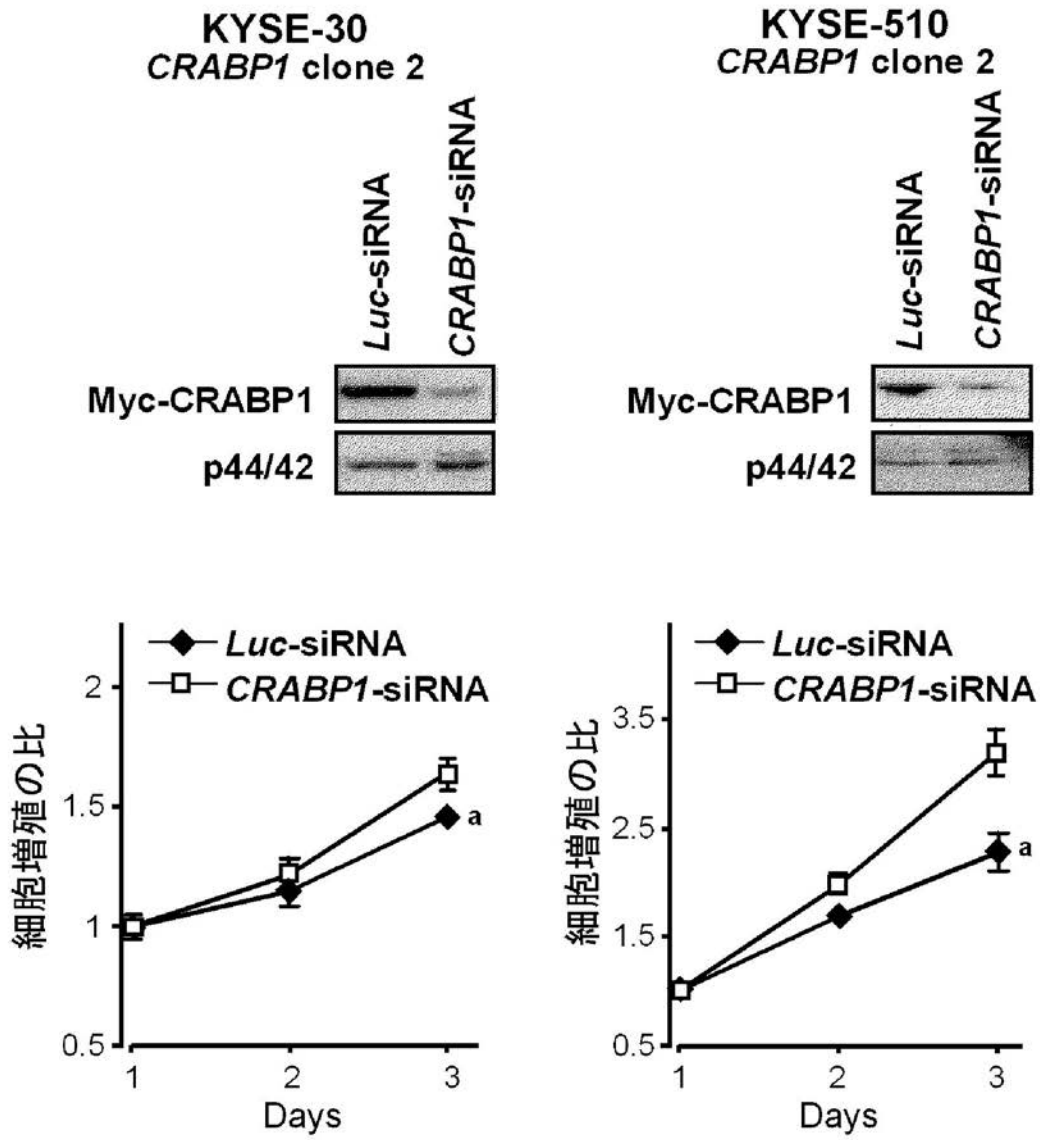
【 図 5 C 】

図 5 C



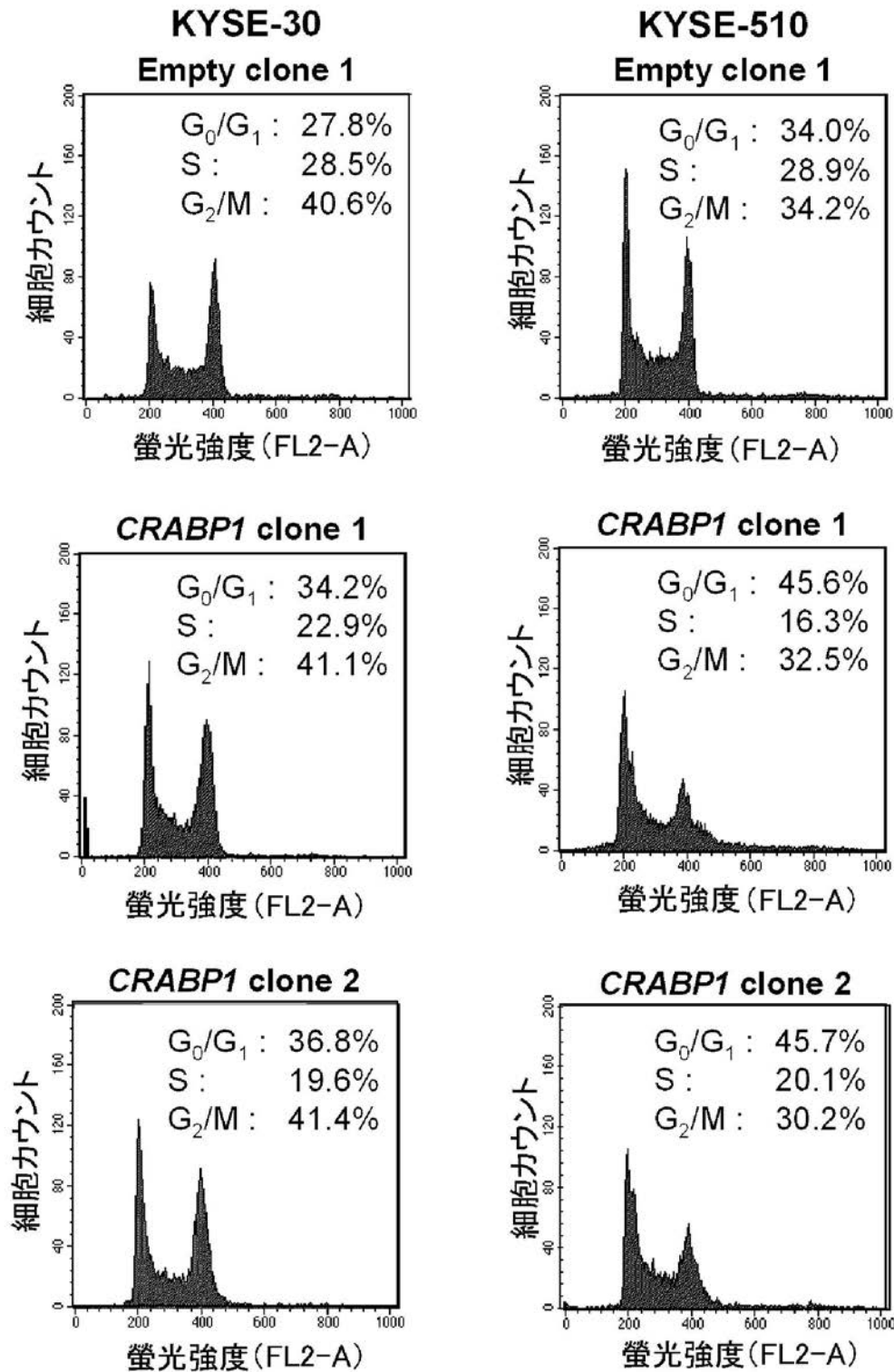
【 図 5 D 】

図 5 D



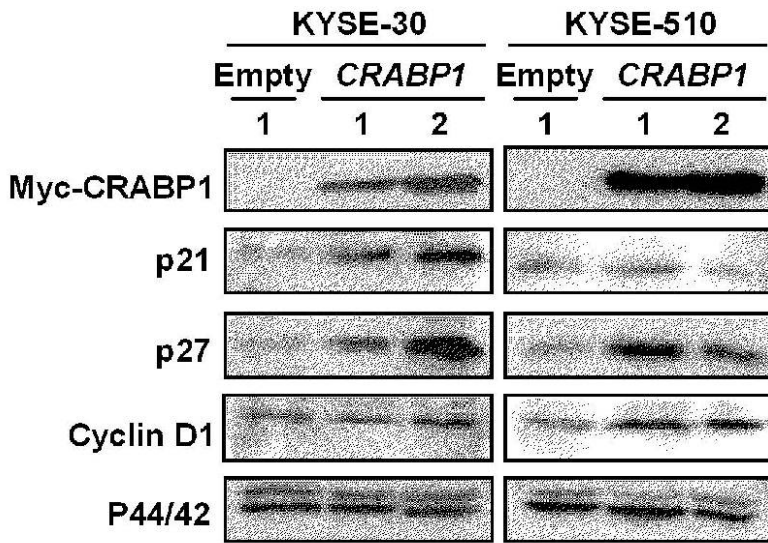
【図6A】

図6A



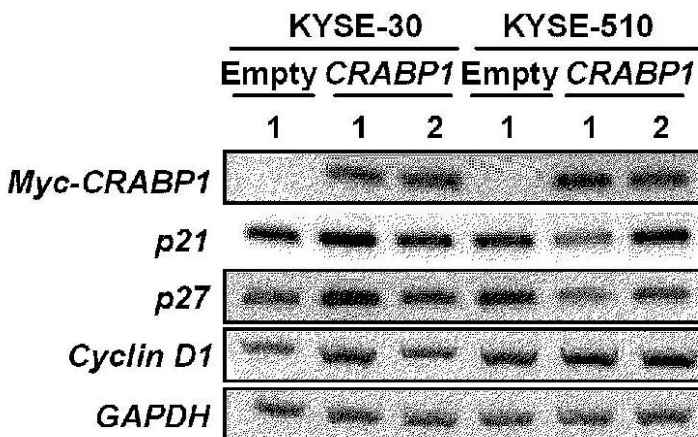
【 6 B 】

6 B



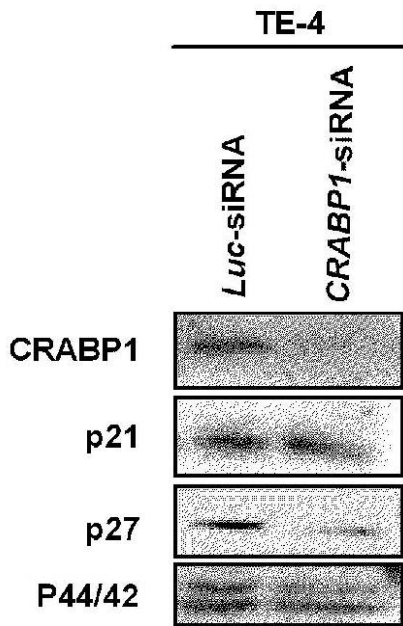
【 6 C 】

6 C



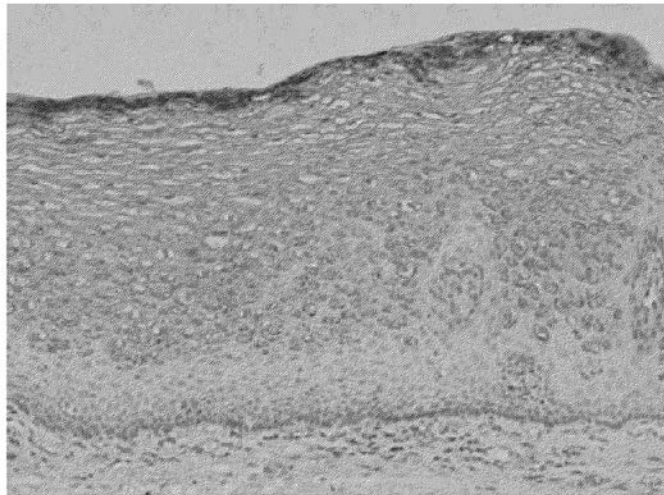
【 6 D 】

6 D



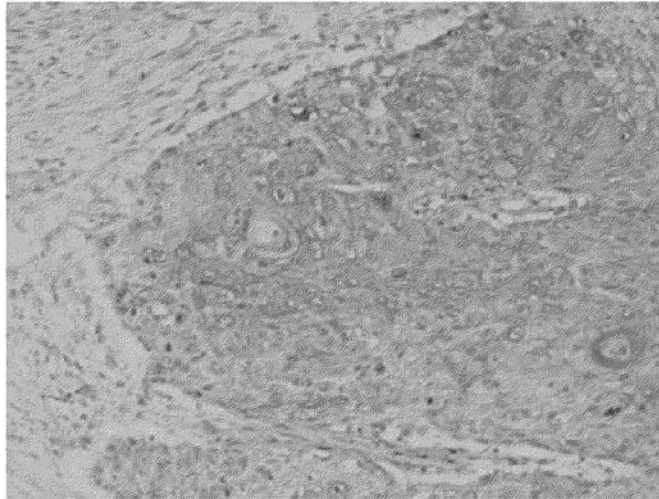
【 7 A 】

7 A



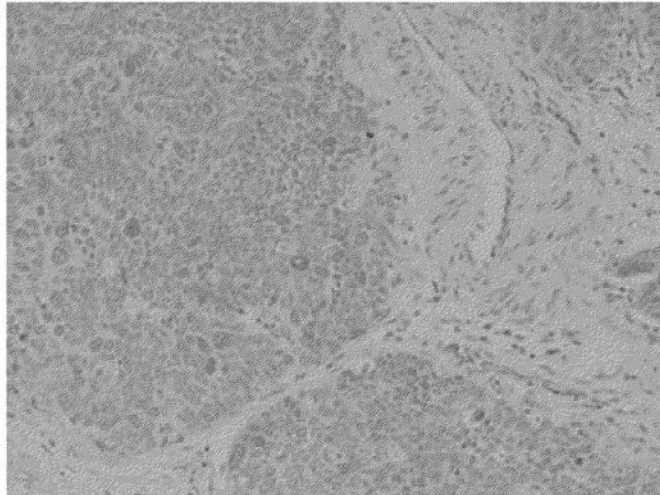
【図7B】

図7B



【図7C】

図7C



【配列表】

0005044837000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 田中 浩司
東京都文京区音羽1 - 8 - 3 パークスクエア文京音羽1 1 0 5
- (72)発明者 津田 均
埼玉県所沢市並木3 - 2 防衛医科大学校病態病理学講座

審査官 小金井 悟

- (56)参考文献 Cancer Res. , 2 0 0 4年 6月 1日 , Vol.64, No.11 , pp.3741-3747

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

CA / BIOSIS / MEDLINE / WPIDS (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamII)

PubMed

专利名称(译)	检测食道癌的方法		
公开(公告)号	JP5044837B2	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	JP2006303331	申请日	2006-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	BM萨尔瓦多		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京医科齿科大学 BML有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京医科齿科大学 BML有限公司		
[标]发明人	稻澤讓治 井本逸勢 田中浩司 津田均		
发明人	稻澤 讓治 井本 逸勢 田中 浩司 津田 均		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M C12N15/00.A C12N15/00.J C12N15/117.Z C12Q1/68.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36		
代理人(译)	志村光晴		
其他公开文献	JP2008118866A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(经修改) 要解决的问题: 提供一种检测新的食管癌基因水平的方法, 该方法还可以判断癌症的恶性程度和淋巴结转移的可能性。 解决方案: 食管上皮细胞中人CRABP1 (细胞维甲酸结合蛋白) 基因失活引起的失活, 特别是所述基因CpG岛的甲基化, 是在基因组DNA, mRNA, CRABP1蛋白等水平上进行的, 并通过DNA芯片法等方法检测细胞的癌变。 【选择图】无

	n	CRABP1 免疫反応性		P値
		陽性 (%)	陰性 (%)	
合計	113	39 (34.5)	74 (65.5)	
性別				
男性	93	31 (33.3)	62 (66.7)	0.569
女性	20	8 (40.0)	12 (60.0)	
年齢 (歳)				
平均	63.7			
≥60	37	13 (35.1)	24 (64.9)	0.923
<60	76	26 (34.2)	50 (65.8)	
癌の部位				
頭部	5	1 (20.0)	4 (80.0)	0.820
胸部上部	42	15 (35.7)	27 (64.3)	
胸部中部	57	19 (33.3)	38 (66.7)	
胸部下部	9	4 (44.4)	5 (55.6)	
組織病理学的分類				
高分化癌	38	20 (52.6)	18 (47.3)	0.004
中程度の分化癌	60	18 (30.0)	42 (70.0)	
低分化癌	15	1 (6.7)	14 (93.3)	
D-T分類				
D-T1	19	2 (10.5)	17 (89.5)	0.017
D-T2/3	94	37 (39.4)	57 (60.6)	
D-N分類				
D-N0	31	12 (38.7)	19 (61.3)	0.564
D-N1	82	27 (32.9)	55 (67.1)	
D-M分類				
D-M0	95	37 (38.9)	58 (61.1)	0.029
D-M1/1a/1b	18	2 (11.1)	16 (88.9)	
病期 (ステージ)				
I	9	1 (11.1)	8 (88.9)	0.032
IIA/IIIB	36	16 (44.4)	20 (55.6)	
III	50	20 (40.0)	30 (60.0)	
IV/IVA/IVB	18	2 (11.1)	16 (88.9)	

注: 統計的に有意な値には、下線が引かれている。
* P値は、カイニ乗 (χ²) またはフィッシャーの正確確率検定による値であり、0.05未満の時に統計的に有意であるとす。