

200720017A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ヒト多段階発がん過程におけるエピジェネティックな異常の  
網羅的解明と臨床応用に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 牛島 俊和

平成20年(2008)年 4月

## 目 次

### I 総括研究報告

- ヒト多段階発がん過程におけるエピジェネティックな異常の  
網羅的解明と臨床応用に関する研究 ..... 1  
牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部

### II 分担研究報告

1. DNAメチル化異常のゲノム網羅的な解析とリスク診断・性質  
診断への応用 ..... 8  
牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部
2. 諸臓器の前がん状態ならびにがんの臨床病理学的特性の基盤  
となるDNAメチル化異常の網羅的解析 .....12  
金井弥栄 国立がんセンター研究所病理部
3. DNAメチル化の分子機構の解析およびがんにおいて不活化さ  
れる新規遺伝子の同定 .....16  
豊田実 札幌医科大学医学部
4. *H. pylori*関連胃炎の経過における胃粘膜DNAメチル化と発がん  
リスクの検討 .....19  
柳岡公彦 和歌山県立医科大学第二内科
5. 胆膵領域のがん診断におけるepigenetic molecular marker  
の有用性 .....21  
松林宏行 静岡県立静岡がんセンター
6. DNA低メチル化の胃腫瘍発生への影響 .....22  
山田泰広 岐阜大学大学院

- III 研究成果の刊行に関する一覧表 .....24

総括研究報告書

ヒト多段階発がん過程におけるエピジェネティックな異常の網羅的  
解明と臨床応用に関する研究

主任研究者 牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部 部長

研究要旨 ゲノム網羅的な DNA メチル化異常の探索により、実験動物腫瘍での数少ない遺伝子サイレンシングの一つとして、ラット前立腺がんで *Tgfb2* 遺伝子のサイレンシングを見出した。ヒト神経芽細胞腫で新たな4個の遺伝子サイレンシングを、ヒト大腸がんで p53 の下流や RAS シグナル伝達経路の遺伝子のサイレンシングを明らかにした。肝細胞がんに関しては、正常肝組織と前がん状態にある肝組織を区別し得る DNA メチル化を示す BAC クローンを同定した。更に、肝細胞がんの分化度・門脈侵襲の有無・肝内転移の有無と有意に相関する DNA メチル化状態を示す BAC クローンを同定した。*H. pylori* 感染により胃粘膜の特定の遺伝子に DNA メチル化異常が誘発されること、その特異性には遺伝子の低転写が関与していることを明らかにした。更に、ゲノムの低メチル化は、胃発がんに関して抑制的に作用することを明らかにした。

分担研究者

|       |                         |
|-------|-------------------------|
| 金井 弥栄 | 国立がんセンター研究所<br>病理部・部長   |
| 豊田 実  | 札幌医科大学医学部<br>内科学第一講座・講師 |
| 柳岡 公彦 | 和歌山県立医科大学<br>第二内科・講師    |
| 松林 宏行 | 静岡県立静岡がんセンター<br>内視鏡科・医長 |
| 山田 泰広 | 岐阜大学大学院医学研究科<br>腫瘍病理・講師 |

または随伴現象としてサイレンシングされた遺伝子（パッセンジャーサイレンシング）とが存在する。従って、ゲノム網羅的な DNA メチル化異常の検索を通じて、新規のがん抑制遺伝子を同定することが出来る。

更に、パッセンジャーサイレンシングや、遺伝子サイレンシングの原因とはならない非プロモーター領域の DNA メチル化異常でも、診断的に有用な場合がある。まず、DNA メチル化異常は、突然変異と異なり、多くの正常型 DNA に埋没した異常 DNA を鋭敏に検出できるため、がんの存在診断に有用である。また、申請者・分担研究者及び他の研究者により、がん組織での DNA メチル化異常が、がんの悪性度・予後・治療感受性予測等の病態診断においても、既存の診断法を凌駕する場合があることが示されている。更に、非がん部に存在する DNA メチル化異常を定量することにより、発がんリスク診断が行えることも示してきた。

本研究では、(1) ゲノム網羅的な DNA メチル化変化の解析により、がん抑制遺伝子を同定すること、(2) がんの存在・病態・リスク診断のマーカーとして役立つ可能性が高い変化を分離すること、(3) それらの中から真に臨床的に有用なものを同定すること、(4) DNA メチル化変化の臨床応用の基盤として、高メチル化の誘発機構や低メチル化の発がんへの関与を明らかにすることを目的とする。

A. 研究目的

DNA メチル化に代表されるエピジェネティックな修飾は、体細胞分裂に際して忠実に複製される。その異常は、がん抑制遺伝子の不活化やゲノム不安定性の誘発を通じて発がんに関与することが明らかとなっている。主任及び分担研究者は、DNA メチル化状態の違いに関するゲノム網羅的解析法である methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA) 法や methylated CpG island amplification-RDA (MCA-RDA)法を開発、これらの方法は世界的に使用されてきた。

ゲノム網羅的な解析により見出された DNA メチル化異常が遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドに存在する場合、下流遺伝子のサイレンシングの原因となる。サイレンシングされる遺伝子には、がん化の原因として関与する遺伝子（ドライバーサイレンシング；主になん抑制遺伝子）と、がん化の結果

## B. 研究方法

### (1) マウス

グローバルな DNA 低メチル化のモデルマウスとして、DNA メチル化維持に必須である *Dnmt1* の hypomorphic allele を持つマウスを使用した。

### (2) ゲノム網羅的な DNA メチル化解析

脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理後、発現マイクロアレイにより、再発現した遺伝子を網羅的に解析した。

MS-RDA 法はメチル化感受性の制限酵素 *HpaII* を用いて、MCA 法は、メチル化感受性制限酵素 *SmaI* と非感受性酵素 *XmaI* を用いて、既に報告した方法により行った。BAC array-MCA (BAMCA)法は、国立がんセンターと東京医科歯科大学の稲沢譲治教授が共同で開発した Whole-Genome Array 4500 に、MCA 法により準備したプローブをハイブリダイゼーションさせた。同アレイは全染色体に分布する 4361 種の BAC クローンをプローブとして搭載しており、0.7Mb の解像度が期待される。

### (3) ゲノム領域特異的な DNA メチル化解析

非メチル化シトシンを特異的にウラシルに変換する bisulfite 処理の後、シーケンス法、Methylation-specific PCR (MSP)法、定量的 MSP 法、COBRA 法、及び、Pyrosequence 法により解析した。

### (4) 遺伝子発現定量

定量的 RT-PCR 法により行った。

### (5) クロマチン免疫沈降法

抗ヒストン H3K4me2 抗体、H3K9me3 抗体、H3K27me3 抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行った。

### (6) 細胞悪性度の評価

細胞増殖能をコロニーフォーメーションアッセイ、アポトーシス細胞の割合を flow cytometry 法により解析した。

### (7) 予後解析

Kaplan-Meier 解析、Cox 比例ハザードモデルに基づく多因子解析を行った。

### (倫理面への配慮)

臨床材料は同意を得て採取した材料を、文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い、各施設の倫理委員会に研究の承認を得て使用した。全ての動物実験は、各施設の動物実験委員会の承認を得て、動物愛護に配慮して実験施行した。

## C. 研究結果

### (1) がん抑制遺伝子の同定

ラット前立腺がん細胞株を用いて、脱メチル化剤処理後発現マイクロアレイによる解析を行い、8 個のサイレンシング遺伝子を同定した。それらの中に、がん抑制遺伝子 *Tgfb2* が存在した。従来、実験動物でのサイレンシング遺伝子はほとんど知られておら

ず、今後、*in vivo* での DNA メチル化異常の誘発機構の解析や、遺伝子サイレンシングに影響する発がん促進・抑制因子の探索が可能になる。

ヒト神経芽細胞腫において、CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) は予後不良と密接に関連する。CIMP 陽性の神経芽細胞腫においてサイレンシングされる遺伝子を新たに 4 個同定した。これら個々の遺伝子の予後への影響は、CIMP の影響よりも小さかった。また、NB-39nu 神経芽細胞腫細胞株では、脱メチル化剤と retinoic acid の併用により、相乗的な分化誘導効果が認められた。

ヒトがんでサイレンシングされる遺伝子が、ドライバーなのかパッセンジャーなのかの判別が難しい場合が多い。そこで、DNA メチル化の標的遺伝子の中から、*in silico* 解析により p53 の標的遺伝子の同定を試みた。その結果、*SFRP2*、*BNIP3*、*cl0orf58* が、p53 の標的遺伝子でかつ、DNA メチル化により不活化されることが明らかになった。

RAS シグナルの活性化は細胞増殖を亢進させ、がん化に重要である一方、正常細胞では、細胞老化やアポトーシスを誘導する。これまで、大腸がんにおいて RAS の負の制御遺伝子 *RASSF2* が異常メチル化により不活化されていることを明らかにした。今年度は、*RASSF2* が胃がんや口腔扁平上皮がんにおいても異常メチル化により不活化されること、*RASSF2* が細胞増殖抑制やアポトーシス誘導に関与するがん抑制機能を有すること、*RASSF2* が NF- $\kappa$ B の活性を抑制することを明らかにした。

最近、がんにおいて発現が低下し、がん抑制的に働く microRNA の中に、DNA メチル化によりサイレンシングされるものがあることが明らかとなりつつある。脱メチル化により発現が上昇する microRNA について解析したところ、157 種類の microRNA 中、37 種類において発現の上昇を認めた。そのうち、mir-34b/c は microRNA の初期転写産物の転写開始点近傍の異常メチル化により発現が抑制されていることを明らかにした。

### (2) 診断的に有用な DNA メチル化異常の同定

これまで、*H. pylori* 感染により胃粘膜で DNA メチル化異常が誘発されることを明らかにしてきた。しかし、限定的な遺伝子の解析に止まっていたために、今年度は、胃がん細胞株でメチル化されうる遺伝子 48 個について、*H. pylori* 感染により胃粘膜で DNA メチル化されるか否かを検討した。その結果、*H. pylori* 感染により全くメチル化されない遺伝子が存在する一方、感染者ではほぼ確実にメチル化される遺伝子も存在することが明らかになった。更に、この遺伝子特異性には遺伝子の低転写が関与していることも明らかになった。正常組織での DNA メチル化プロファイルの解析により、個人レベルで過去の発がん因子曝露を推定できる可能性が解明された。

肝発がんにおけるエピゲノムの変化を明らかにするため、大腸がん肝転移症例より得られた正常肝組織（正常）19 検体、肝細胞がん症例より得られた慢性肝炎ないし肝硬変症を呈する非がん肝組織 25 検体、肝細胞がん組織 29 検体について、BAMCA 法による解析を行った。DNA メチル化減弱あるいは亢進を示した BAC クローン数は、正常肝組織に比して、非がん肝組織で既に有意に増加、更に、肝細胞がん組織で増加していた。非がん肝組織の段階で DNA メチル化異常を示し、かつ、その変化が肝細胞がんにも受け継がれる BAC クローンを 64 個抽出した。

更に、肝細胞がん同士を比較することにより、肝細胞がんの分化度を区別できる BAC クローン 45 個、門脈侵襲の有無を区別できる BAC クローン 170 個、肝内転移の有無を区別できる BAC クローン 64 個、B 型肝炎ウイルス感染患者ならびに C 型肝炎ウイルス感染患者に生じた肝細胞がんを区別するのに有用な BAC クローン 140 個を同定した。何れの場合も、これらを用いることで、肝細胞がんの性質を誤りなく判別可能であった。

膵胆道系腫瘍の早期診断は、治癒率向上のために重要である。内視鏡的検査の負担が重い領域であることから、ハイリスク群の絞り込み、また、前がん病変の同定は有用性が高い。そこで、胆嚢がん細胞株 2 系統、胆管がん細胞株 2 系統を用いて、脱メチル化剤処理後発現マイクロアレイ解析を行った。現在、データ解析中である。

### (3) 臨床的有用性の検討

胃粘膜 DNA メチル化レベルを用いるリスク診断と、従来、臨床的に有用性が知られる血清ペプシノゲン (PG) I, II 及び血清 *H. pylori* IgG 抗体価によるリスク分類との関係を検討した。健常者 63 名について、既存のマーカーを測定し、A 群 *H. pylori* (-)PG(-)、B 群 *H. pylori* (+)PG(-)、C 群 *H. pylori* (+)PG(+)、D 群 *H. pylori* (-)PG(+) の 4 群に分類した。内視鏡生検により胃粘膜検体を採取し、定量的 MSP 法によりメチル化レベル測定した。予測通り、A 群 << B 群 < C 群の順に、DNA メチル化レベルは高く、*H. pylori* による強力な DNA メチル化異常誘発が確認された。今後、各群の中で、ハイリスク症例の絞り込みに DNA メチル化レベルが活用できるか否か、検討していく。

### (4) DNA メチル化異常の要因と意義

ゲノム全体の DNA 低メチル化は、ほぼ全てのヒト腫瘍で認められる。しかし、その発がんにおける意義は、ゲノムの不安定性を通じて発がん促進的に働くこと以外は、不明の点が多い。今年度は、DNA 低メチル化マウスを用いて、グローバルな DNA 低メチル化が胃腫瘍発生に及ぼす影響を検討した。

*N*-Methyl-*N*-nitrosourea による胃化学発がんモデルでの胃腫瘍発生数(mean ± s.d.)は、DNA 低メチル化

(*Dnmt1* chip/c)マウスで  $1.61 \pm 1.37$  (n=18)、コントロール(*Dnmt1* chip/+)マウスで  $3.54 \pm 1.61$  (n=24)であり、DNA 低メチル化は胃腫瘍発生を強く抑制した ( $P < 0.001$ )。家族性大腸腺腫症モデルマウスでの胃腫瘍発生数は、DNA 低メチル化(*Dnmt1* chip/c)マウスで  $0.15 \pm 0.37$  (n=13)、コントロール(*Dnmt1* chip/+)マウスで  $0.72 \pm 0.76$  (n=22)と胃腫瘍形成が抑制された ( $P < 0.03$ )。組織学的には、DNA 低メチル化マウス及び野生型マウスに発生した胃腫瘍に明らかな違いは確認されなかった。

### D. 考察

#### (1) がん抑制遺伝子の同定

がん抑制遺伝子の同定は、その波及効果が大きい。今回、ラット前立腺がんでは *Tgfb2* 遺伝子のサイレンシングが見出されたことにより、従来、随伴現象と思われてきたヒト前立腺がんでの TGFBR2 の発現低下にも、より積極的な意味がある可能性がでてきた。また、実験動物でのサイレンシング遺伝子が同定されたことで、今後、これまで困難であった *in vivo* で DNA メチル化異常の誘発機構の解析や、その促進・抑制因子の探索も可能になる。

神経芽細胞腫において、CIMP が個々の遺伝子のメチル化よりも強い予後への影響を示すこと、また、脱メチル化剤と retinoic acid が相乗効果を示すことから、CIMP が様々な分化等に重要な遺伝子のサイレンシングを誘発して予後不良を誘発している可能性を示唆した。今後、脱メチル化剤の臨床的有用性を検討すると共に、CIMP の原因遺伝子の探索が重要と考えられた。

#### (2) 診断的に有用な DNA メチル化異常の同定

特定の発がん因子により誘発される DNA メチル化異常に特定のプロファイルが存在することが明らかになった。その機構として、遺伝子の転写レベルが低いことが関与していることも示唆された。今後は、DNA メチル化プロファイルから過去の発がん因子曝露を推定できるようになる可能性がある。

肝細胞がんの臨床病理学的悪性度を規定する、DNA メチル化プロファイルが存在する可能性が示唆された。また、従来は困難であった、B 型肝炎ウイルス感染を背景とするのか、C 型なのかの判別が、DNA メチル化状態のゲノム網羅的解析により可能であった。発がん機構にそれぞれ関わる DNA メチル化プロファイルが存在する可能性が示された。

従来、*p53* 遺伝子にはプロモーター領域 CpG アイランドがなく、そのシグナルのエピジェネティックな不活化は難しいと考えられていた。今回、がん細胞において、*p53* 遺伝子変異がなくても、その標的遺伝子が異常メチル化により発現しなくなることで、*p53* の機能が阻害されることが示された。*p53* シグナル経路に関しても、エピジェネティック異常による

不活化が誘発されている可能性がある。

メチル化により発現が抑制される機能性 RNA に関しては、今後さらになん化における役割や診断・治療の標的としての有用性について検討が必要と考えられる。また、microRNA 以外にも、タンパク質をコードしない、機能性 RNA が DNA メチル化により不活化されている可能性があり、今後さらに解析が必要と考えられる。

### (3) 臨床的有用性の検討

胃粘膜での DNA メチル化レベルを用いた胃がん発生予測の前向き研究は、大規模な症例を必要とするため、他の研究事業で実施予定である。

胆道系腫瘍の DNA メチル化異常を用いた検出については、研究期間内に実施予定である。

### (4) DNA メチル化異常の要因と意義

グローバルな DNA 低メチル化状態は、大腸と同様に、胃においても腫瘍形成抑制的に作用することが明らかとなった。これらの結果は、DNA メチル化修飾が胃がん発生の予防および治療に応用可能であることを示唆するものと考えられる。現在のところ、DNA 低メチル化による胃腫瘍形成の抑制メカニズムは明らかでない。今後、その抑制メカニズムを明らかにしていく。

## E. 結論

ゲノム網羅的な DNA メチル化異常の探索により、実験動物腫瘍での数少ない遺伝子サイレンシングの一つを、また、各種のヒト腫瘍において様々ながん抑制遺伝子のサイレンシングを見出した。また、がん化の原因ではなくても、病態診断的に有用な DNA メチル化異常も多数見出した。更に、ゲノムの低メチル化は、胃発がんに関して抑制的に作用することが明らかになり、新たな胃がん予防の標的と期待される。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Yamashita S, Takahashi S, McDonell N, Watanabe N, Niwa T, Hosoya K, Tsujino Y, Shirai T and Ushijima T. Methylation-silencing of transforming growth factor- $\beta$  receptor type II in rat prostate cancers. *Cancer Res*, 68: 2112-2121, 2008.
2. Nobeyama Y, Okochi-Takada E, Furuta J, Miyagi Y, Kikuchi K, Yamamoto A, Nakanishi Y, Nakagawa H and Ushijima T. Silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in malignant melanomas. *Int J Cancer*, 121: 301-307, 2007.
3. Ushijima T. Epigenetic field for cancerization. *J*

4. Enomoto S, Maekita T, Tsukamoto T, Nakajima T, Nakazawa K, Tatematsu M, Ichinose M and Ushijima T. Lack of association between CpG island methylator phenotype in human gastric cancers and methylation in their background non-cancerous gastric mucosae. *Cancer Sci*, 98: 1853-1861, 2007.
5. Cai LY, Abe M, Izumi S, Imura M, Yasugi T and Ushijima T. Identification of *PRTFDC1* silencing and aberrant promoter methylation of *GPR150*, *ITGA8* and *HOXD11* in ovarian cancers. *Life Sci*, 80: 1458-1465, 2007.
6. Abe M, Westermann F, Nakagawara A, Takato T, Schwab M and Ushijima T. Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer Lett*, 247: 253-258, 2007.
7. Kanai Y and Hirohashi S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. *Carcinogenesis*, 28: 2434-2442, 2007.
8. Sawada M, Kanai Y, Arai E, Ushijima S, Ojima H and Hirohashi S. Increased expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein in uterine cervix squamous cell carcinoma and its precursor lesion. *Cancer Lett*, 251: 211-219, 2007.
9. Loukopoulos P, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Sakamoto M, Yamazaki K, Kosuge T, Kanai Y, Hosoda F, Imoto I, Ohki M, Inazawa J and Hirohashi S. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: identification of genetic indicators that predict patient outcome. *Cancer Sci*, 98: 392-400, 2007.
10. Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T, Nakajima A and Hirohashi S. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res*, 13: 902-911, 2007.
11. Takahashi Y, Akishima-Fukasawa Y, Kobayashi N, Sano T, Kosuge T, Nimura Y, Kanai Y and Hiraoka N. Prognostic value of tumor architecture, tumor-associated vascular characteristics, and expression of angiogenic molecules in pancreatic endocrine tumors. *Clin Cancer Res*, 13: 187-196, 2007.
12. Yoshida Y, Kokubu A, Suzuki K, Kuribayashi H, Tsuta K, Matsuno Y, Kusumoto M, Kanai Y, Asamura H, Hirohashi S and Shibata T. Molecular markers and changes of computed tomography appearance in lung adenocarcinoma with ground-glass opacity. *Jpn J Clin Oncol*, 37:

907-912, 2007.

13. Imai T, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Ogi K, Sogabe Y, Kashima L, Maruyama R, Nojima M, Mita H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Shinomura Y, Hiratsuka H and Tokino T. Epigenetic inactivation of *RASSF2* in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, in press.
  14. Nishikawa N, Toyota M, Suzuki H, Homma T, Fujikane T, Ohmura T, Nishidate T, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Sonoda T, Sasaki Y, Urano T, Imai K, Hirata K and Tokino T. Gene amplification and overexpression of *PRDM14* in breast cancer. *Cancer Res*, 67: 9649-9657, 2007.
  15. Watanabe Y, Toyota M, Kondo Y, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Sasaki Y, Sekido Y, Hiratsuka H, Shinomura Y, Imai K, Itoh F and Tokino T. *PRDM5* identified as a target of epigenetic silencing in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 13: 4786-4794, 2007.
  16. Tomita H, Yamada Y, Oyama T, Hata K, Hirose Y, Hara A, Kunisada T, Sugiyama Y, Adachi Y, Linhart H and Mori H. Development of gastric tumors in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice by the activation of the  $\beta$ -catenin/Tcf signaling pathway. *Cancer Res*, 67: 4079-4087, 2007.
  17. Oyama T, Yamada Y, Hata K, Tomita H, Hirata A, Sheng HQ, Hara A, Aoki H, Kunisada T, Yamashita S and Mori H. Further upregulation of  $\beta$ -catenin/Tcf transcription is involved in the development of macroscopic tumors in the colon of *Apc<sup>Min/+</sup>* mice. *Carcinogenesis*, 29:666-672, 2008.
  18. Yamada Y and Mori H. Multistep carcinogenesis of the colon in *Apc<sup>Min/+</sup>* mouse. *Cancer Sci*, 98: 6-10, 2007.
- 本研究費に密接に関係するもの
1. Moriguchi K, Yamashita S, Tsujino Y, Tatematsu M and Ushijima T. Larger numbers of silenced genes in cancer cell lines with increased *de novo* methylation of scattered CpG sites. *Cancer Lett*, 249: 178-187, 2007.
  2. Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J and Imoto I. Promoter hypermethylation contributes to frequent inactivation of a putative conditional tumor suppressor gene *Connective Tissue Growth Factor* in ovarian cancer. *Cancer Res*, 67: 7095-7105, 2007.
  3. Kanai Y. Overexpression of HDACs: a prognostic marker for gastric cancer identified by tissue microarray. *Lancet Oncol*, 9: 91-93, 2008.
  4. Ting A, Suzuki H, Cope L, Schuebel K, Lee B, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T and Baylin SB. A requirement for DICER to maintain full promoter CpG Island hypermethylation in human cancer cells. *Cancer Res*, in press.
  5. Maruyama R, Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Yamamoto E, Nojima M, Fujikane T, Sasaki Y, Yamashita T, Watanabe Y, Hiratsuka Y, Hirata K, Itoh F, Imai K, Shinomura Y and Tokino T. Cytoplasmic *RASSF2A* is a proapoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer. *Carcinogenesis*, in press.
  6. Suzuki H, Toyota M, Caraway H, Gabrielson E, Ohmura T, Fujikane T, Nishikawa N, Sogabe Y, Nojima M, Sonoda T, Mori M, Hirata K, Imai K, Shinomura Y, Baylin SB and Tokino T. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *British J Cancer*, 98: 1147-1156, 2008.
  7. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez N, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR and Issa JJP. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies colon cancer corresponding to three different subclasses of disease. *PNAS*, 104: 18654-18659, 2007.
  8. Schuebel KE, Chen E, Cope Lm, Glockner SC, Suzuki H, Yi JM, Chan TA, Van Neste L, Van Criekinge W, van den Bosch S, van Engeland M, Ting AH, Jair K, Yu W, Toyota M, Imai K, Ahuja N, Herman JG and Baylin SB. Comparing the DNA hypermethylation with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet*, 3: 1709-1723, 2007.
  9. Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, Tokino T, Mori M, Imai K and Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of *SFRP* genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene*, 26: 4699-4713, 2007.
  10. Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, Takagi H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M, Sonoda T, Mori M, Imai K, Tokino T and Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of *DICKKOPF* family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis*, 28: 2459-2466, 2007.
  11. Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Maruyama R, Kusano M, Nishikawa N, Watanabe Y, Sasaki Y, Abe T, Yamamoto E, Tarasawa I, Sonoda T, Mori M, Imai K, Shinomura Y and Tokino T. Identification of *DFNA5* as a target of epigenetic inactivation in gastric cancer. *Cancer Sci*, 98:

- 88-95, 2007.
12. Mukoubayashi C, Yanaoka K, Ohata H, Aii K, Tamai H, Oka M and Ichinose M. Serum pepsinogen and gastric cancer screening. *Intern Med*, 46: 261-266, 2007.
  13. Yanaoka K, Oka M, Yoshimura N, Mukoubayashi C, Enomoto S, Iguchi M, Magari H, Utsunomiya H, Tamai H, Aii K, Yamamichi N, Fujishiro M, Takeshita T, Mohara O and Ichinose M. Risk of gastric cancer in asymptomatic, middle-aged Japanese subjects based on serum pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody levels. *Int J Cancer*, in press.
  14. Yanaoka K, Oka M, Mukoubayashi C, Yoshimura N, Enomoto S, Iguchi M, Magari H, Utsunomiya H, Tamai H, Aii K, Ohata H, Fujishiro M, Takeshita T, Mohara O and Ichinose M. Cancer high-risk subjects identified by serum pepsinogen tests outcomes after 10-year follow-up in asymptomatic middle-aged males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, in press.
  15. Linhart HG, Lin H, Yamada Y, Moran E, Steine EJ, Gokhale S, Lo G, Cantu E, Ehrich M, He T, Meissner A and Jaenisch R. Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. *Genes Dev*, 21: 3110-3122, 2008.
2. 学会発表
1. Ushijima T. DNA methylation as a marker for the past and future. Aichi Cancer Center International Symposium, Nagoya, January, 2007.
  2. Ushijima T. DNA methylation as a marker for the past and future. The New Zealand Society for Oncology Conference, Dunedin, May, 2007.
  3. Ushijima T, Nakajima T and Enomoto S. Epigenetic field defect for gastric cancers. Gordon Research Conference, Il Ciocco, May, 2007.
  4. Ushijima T. DNA methylation induction by *Helicobacter pylori*, and use as a cancer risk marker. The 19th Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (FAOBMB) Conference, Seoul, May, 2007.
  5. Ushijima T. Environment - epigenome interaction. Symposium by Asian Network of Epigenomics, Osaka, June, 2007.
  6. Nakajima T, Maekita T, Enomoto S and Ushijima T. Epigenetic field for cancerization. 11th German-Japan Cancer Research Workshop, Kyoto, November, 2007.
  7. Ushijima T and Nakajima T. Epigenetic field defect for gastric cancers, and its use as a cancer risk marker. The 11th Annual Meeting of Taiwan Cooperative Oncology Group, Taipei, December, 2007.
  8. Ushijima T and Yamashita S. Silencing of *Tgfbr2* due to promoter methylation in rat prostate cancers. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Rat Genomics and Models", Cold Spring Harbor, December, 2007.
  9. 生島俊和, 大河内(高田)江里子 エピジェネティック発がん機構とエピジェネティック発がん物質の検出 日本毒性病理学会シンポジウム 2007年1月
  10. 生島俊和 エピジェネティクスによる発がん要因とリスクの評価 日本衛生学会シンポジウム 2007年3月
  11. 生島俊和 エピジェネティクスからみた多段階発がん 日本エピジェネティクス研究会 2007年6月
  12. 生島俊和 Epigenetics in Cancers and Polyclonal Disorders 日本薬物動態学会ビジョンシンポジウム 2007年7月
  13. 丹羽透, 塚本徹哉, 田中晴就, 一瀬雅夫, 杉村隆, 立松正衛, 生島俊和 *Helicobacter pylori* 感染は胃粘膜上皮に異常 DNA メチル化を誘発する 発癌病理研究会 2007年8月
  14. 生島俊和 エピジェネティックな発がんの場合 日本癌学会 66回総会シンポジウム 2007年10月
  15. 岡大嗣, 山下聡, 中西幸浩, 加藤抱一, 上西紀夫, 杉村隆, 生島俊和 Genome-wide screening for genes silenced in esophageal squamous cell carcinomas using a demethylating agent 第66回日本癌学会総会 2007年10月
  16. 岡大嗣, 山下聡, 中西幸浩, 加藤抱一, 上西紀夫, 杉村隆, 生島俊和 食道扁平上皮がんにおけるサイレンシング遺伝子のゲノム網羅的探索 第18回日本消化器癌発生学会総会 2007年11月
  17. 生島俊和, 阿部雅修 神経芽腫の強力予後因子としての DNA メチル化 小児癌学会・小児血液学会シンポジウム 2007年12月
  18. Arai E, Kanai Y, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Imoto I, Inazawa J and Hirohashi S. Genetic classification of renal cell carcinoma associated with DNA methylation alteration and prognosis of patients. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, October, 2007.
  19. Kikuchi R, Imoto I, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S and Inazawa J. CTGF is a tumor-suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in ovarian cancer. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer, Yokohama, October, 2007.
  20. Satow R, Shitashige M, Honda K, Kanai Y, Hirohashi S and Yamada T. Whole-genome exon-level transcriptome survey of human hepatocellular carcinoma. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, October, 2007.



21. 新井恵史、金井弥栄、牛島抄織、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井佐奈、井本逸勢、稲澤譲治、広橋説雄 腎がんの発生過程における DNA メチル化の変化のゲノム網羅的解析 第1回日本エピジェネティクス研究会年会 2007年6月
22. 金井弥栄 慢性肝炎・肝硬変症・肝細胞がんにおける DNA メチル化異常 第4回日本病理学会カンファレンス「肝疾患研究の最前線: 現状と課題」 2007年7月
23. 新井恵史、金井弥栄、牛島抄織、尾島英知、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井佐奈、井本逸勢、稲澤譲治、広橋説雄 肝多段階発がん過程における DNA メチル化の変化のゲノム網羅的解析 第4回日本病理学会カンファレンス 2007年7月
24. Toyota M. Epigenetic silencing of genes involved in signaling pathway. The 7th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Hawaii, January, 2007.
25. Toyota M. Epigenetic silencing of genes involved in signaling pathways in gastric cancer. 35th Congress of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Prague, Czech Republic, September, 2007.
26. Toyota M. Epigenetic alterations in gastrointestinal cancer: functional consequences and clinical application IARC workshop, “Epigenetics and Cancer.” Lyon, December, 2007.
27. 豊田実 The role of DNA methylation changes in signal transduction in gastric cancer. 日本癌学会 66回総会シンポジウム 2007年10月
28. 豊田実、山本英一郎、篠村恭久 慢性胃炎におけるエピジェネティックな異常-DNA メチル化のおこるプロセス- 第49回日本消化器病学会大会シンポジウム 2007年10月
29. 豊田実 エピジェネティックな異常の発がんにおける役割と診断・治療への応用 日本電気泳動学会 シンポジウム 2007年11月
30. Yanaoka K, Deguchi H, Mukoubayashi C, Magari H, Inoue I, Iguchi M, Ohata H, Tamai H, Arii K, Oka M, Mohara O and Ichinose M. Can Eradication of *Helicobacter pylori* inhibit the Development of Gastric Cancer? Observation based on a 10-year follow-up for the development of gastric cancer in subjects with *Helicobacter pylori* infection. Digestive Disease Week, Washington DC, May, 2007.
31. Yamada Y, Hara A, Jaenisch R and Mori H. Multistep carcinogenesis of the colon in *Apc<sup>Min/+</sup>* Mouse. The 38<sup>th</sup> International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, “Current Challenges in the Understanding and Management of Colon Cancer”, Tokyo, November, 2007.
32. 柳岡公彦、出口久暢、一瀬雅夫 シンポジウム (1) *Helicobacter pylori* 感染における胃癌発生の10年間の疫学的検討ー自然経過から胃癌発生と除菌後の胃癌発生との比較ー 第93回日本消化器病学会総会 2007年4月
33. 前北隆雄、中沢和之、柳岡公彦 萎縮性胃炎進展と DNA メチル化異常を用いた胃がんリスク診断の可能性 第15回JDDW 第74回日本消化器内視鏡学会総会 2007年10月
34. 松林宏行、他 家族性膵癌家系におけるEUS CTによる経過観察と膵液中メチル化マーカー検索の試み 第13回家族性腫瘍学会学術集会 2007年6月
35. 松林宏行、他 膵癌の早期診断を目的としたハイリスク群の経過観察と膵液中 DNA メチル化検索の試み 第52回日本人類遺伝学会大会 2007年9月
36. 山田泰広 消化器発がんの動物モデル 未分化性維持機構の大腸発がん過程解明への応用 日本癌学会 66回総会シンポジウム 2007年10月
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
    - DNA メチル化状態のゲノム網羅的解析に基づく腎細胞がんの予後予測システム (出願予定) (金井)
  2. 実用新案登録
    - 該当無し
  3. その他
    - 該当無し

分担研究報告書

DNA メチル化異常のゲノム網羅的な解析とリスク診断・性質診断への応用

分担研究者 牛島俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部 部長

研究要旨 (1) ラット前立腺がんで *Tgfbr2* 遺伝子がサイレンシングされることを見出した。今後、*in vivo* での DNA メチル化異常の誘発機構の解析や、遺伝子サイレンシングに影響する発がん促進・抑制因子の探索が可能になる。(2) *H. pylori* 感染により胃粘膜の特定の遺伝子に DNA メチル化異常が誘発されること、その特異性には遺伝子の低転写が関与していることを明らかにした。DNA メチル化プロファイルの解析により、個人レベルでも過去の発がん因子曝露を推定できる可能性がある。(3) CpG アイランドメチル化形質(CIMP)陽性の神経芽細胞腫は予後不良である。CIMP によりサイレンシングされる遺伝子を新たに 4 個同定した。これら個々の遺伝子の予後への影響は、CIMP の影響よりも小さく、CIMP により複数の遺伝子が不活化されることが予後不良に重要であると考えられた。

A. 研究目的

DNA メチル化に代表されるエピジェネティックな修飾は、体細胞分裂に際して忠実に複製される。その異常は、がん抑制遺伝子の不活化やゲノム不安定性の誘発を通じて発がんに関与することが明らかとなっている。申請者は、DNA メチル化状態の違いに関するゲノム網羅的解析法である methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA)法を開発、がんでの DNA メチル化異常に関する多くの知見を蓄積してきた。

DNA メチル化異常は、プロモーター領域 CpG アイランドにある場合、遺伝子サイレンシングの原因となる。従来、がん特異的にサイレンシングされた遺伝子はがん抑制遺伝子とされることが多かった。しかし、その他にもがん化の結果としてサイレンシングされた遺伝子が多数あることがわかってきた。従って、ゲノム網羅的な DNA メチル化異常の検索を通じて新規のがん抑制遺伝子を同定する際には、意義付けに十分な注意が必要である。

がん化の結果としての遺伝子サイレンシングや、遺伝子サイレンシングの原因とはならない DNA メチル化異常でも、がん特異的な DNA メチル化であれば、がん細胞の検出に用いることが出来る。DNA メチル化異常の場合、突然変異と異なり、多くの正常型 DNA に埋没した異常 DNA でも鋭敏に検出できる。また、がん組織での DNA メチル化異常が、がんの悪性度・予後・治療感受性予測等の病態診断においても、既存の診断法を凌駕する場合があることも示されている。更に、非がん部に存在する DNA メチル化異常を定量することにより、発がんリスク診断が行えることも解明してきた。

本研究では、ゲノム網羅的な DNA メチル化変化の解析により、がん抑制遺伝子を同定すること、及び、がんの存在・病態・リスク診断のマーカーとして役立つ可能性が高い変化を分離することを目的とする。

B. 研究方法

1) 材料

ラット前立腺がん細胞株 PLS10, 20, 30 は名市大白井教授から供与を受けた。ヒト前立腺がん細胞株、ヒト胃がん細胞株、ヒト神経芽細胞腫細胞株は ATCC から購入した。

ラット前立腺がんは、6 週齢雄 F344 ラットに 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) 及び testosterone を皮下注射し、56 週齢で屠殺した (名市大白井教授との共同研究)。

ヒト前立腺がん臨床材料は、前立腺がん摘出術を施行された 60 症例 (Gleason パターン 2-5) を用いた。胃粘膜生検標本は倫理審査委員会の承認に基づき、和歌山医大 (柳岡分担研究者) 及び国立がんセンター中央病院にて、同意を得た後、胃がん患者及び健康者ボランティアから採取した。神経芽細胞腫臨床材料は、組織学的に確認された症例について、千葉がんセンターから供与を受けた。

DNA は phenol/chloroform 法により、RNA は ISOGEN により抽出した。

(2) 脱メチル化剤処理と発現アレイ解析

脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理は、各細胞株に応じて、60%程度の増殖抑制を来す濃度を用いて行った。発現アレイ解析は、Affymetrix 社 Rat Genome 230 2.0 アレイを用いて、

28,000 個の遺伝子について行った。

### (3) MS-RDA 法

ゲノム DNA をメチル化感受性の制限酵素 *HpaII* で消化し、アダプターを接着後、PCR により amplicon を作成した。テスター及びドライバの amplicon を用いて、常法に従い、2 サイクルの competitive hybridization と selective amplification を行った。最終 PCR 産物全体をプラスミドにクローン化し、サイクルシーケンス法により、塩基配列を決定した。独立な配列については、データベース検索を行い、その DNA 断片が CpG アイランドに由来しているか否かを検討した。CpG アイランドは、Takai と Jones の基準により判定した。

### (4) Bisulfite シークエンス法、MSP 法、及び、定量的 MSP 法

断片化した DNA を NaOH により変性した後、3.1N, pH 5.0 の bisulfite 液中で、95°C 30 秒、50°C 15 分の反応を 15 サイクル行った。カラムで脱塩後、NaOH により脱スルホン化を行った。

Bisulfite シークエンス法では、メチル化 DNA 及び非メチル化 DNA に共通のプライマーで PCR を行った。PCR 産物をクローン化、サイクルシーケンスにより各 CpG 部位のメチル化状態を決定した。

Methylation-specific PCR (MSP)法では、bisulfite 処理した DNA を鋳型に、メチル化された DNA またはメチル化されていない DNA に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。

定量的 MSP では、メチル化 DNA 及び非メチル化 DNA それぞれに特異的なプライマーを用いて増幅、増幅速度を分子数既知の標準 DNA と比較することで検体中のそれぞれの分子数を測定した。得られた各分子数から、メチル化 DNA の比率を算出した。

### (5) 定量的 RT-PCR 法

全 RNA から Superscript II 逆転写酵素により cDNA を合成した。定量的 PCR を行い、被検遺伝子及び *GAPDH* の cDNA 分子数を測定した。*GAPDH* 分子数により補正した被検遺伝子の分子数を算出した。

### (6) クロマチン免疫沈降法

抗ヒストン H3K4me2 抗体、H3K9me3 抗体、H3K27me3 抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行った。

### (7) 予後解析

SPSS を用いて、Kaplan-Meier 解析、Cox 比例ハザードモデルに基づく多因子解析を行った。

(倫理面への配慮)

神経芽細胞腫臨床材料の解析は、国立がんセンター及び千葉がんセンターの倫理審査委員会の承認を得た。胃粘膜臨床材料の解析は、国立がんセンター及び和歌山県立医科大学の倫理審査委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

### (1) ラット前立腺がんにおける *Tgfb2* 遺伝子サイレンシングの同定

DNA メチル化異常はヒト発がんに関与するものの、実験動物モデルで明瞭な遺伝子サイレンシングはほとんど知られてこなかった。そのために、*in vivo* での DNA メチル化異常の誘発機構の解析や、遺伝子サイレンシングの誘発の促進・抑制により発がんを促進・抑制している因子の探索が困難であった。

そこで、DMAB と testosterone を用いて誘発したラット前立腺がん由来する細胞株 PLOS10, 20 及び 30 を脱メチル化剤処理後、再発現した遺伝子を発現アレイにより探索した。16 倍以上の発現上昇を示した遺伝子が 59 個見出され、そのうち 12 個がプロモーター領域に CpG アイランドを有した。細胞株での DNA メチル化解析により、これらのうち 8 個の遺伝子が、プロモーター領域 CpG アイランドの高密度なメチル化によりサイレンシングされていることを確認した。

8 個の中には、TGF- $\beta$  シグナル伝達に重要な役割を果たすがん抑制遺伝子 *Tgfb2* 遺伝子が含まれた。そこで、*Tgfb2* についてラット前立腺がん原発巣でのメチル化を検討したところ、背側葉前立腺がん 7 例中 3 例でメチル化が認められた。これまで、ラット前立腺がんでの *Tgfb2* サイレncing の報告はなく、ラット前立腺がんにおいては TGF- $\beta$  シグナル遮断が重要な役割を果たすことが示唆された。

更に、ヒト前立腺がんについて検討した。ヒト前立腺がんでは、TGFBR2 蛋白の低下は知られているものの、その機構は不明であった。まず、ヒト前立腺がん 60 例で免疫染色により発現を検討したところ、36/60 例で発現低下を認めた。次に、*TGFBR2* 遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドの DNA メチル化を検討したが、認められなかった。ヒト前立腺がん細胞株を用いてヒストン修飾を解析したところ、H3K9me3 の修飾増加はなく、H3K27me3 の増加を認め、DNA メチル化によるサイレンシングとは異なるヒストン修飾パターンを示した。

### (2) *H. pylori* 感染による DNA メチル化異常誘発の遺伝子特異性

これまで、胃がん誘発因子である *H. pylori* 感染は、ヒト胃粘膜で複数の遺伝子に DNA メチル化異常を誘発すること、誘発された DNA メチル化異常の量は発がんリスクと相関することを示してきた。しかし、DNA メチル化異常が誘発される遺伝子に特異性があるのか否かは明らかになっていなかった。

そこで、胃がん細胞株でメチル化される遺伝子プロモーター領域 CpG アイランド 48 個について、*H. pylori* 感染陰性及び陽性の、健常者及び胃がん患者 (合計 4 群、各群 11 例) の非がん部胃粘膜での DNA メチル化の有無を解析した。その結果、*H. pylori* 感染により容易に DNA メチル化される遺伝子 26 個、

逆に、DNA メチル化異常が全く誘発されない遺伝子 7 個を認めた。14 個は *H. pylori* 感染とは関係なくメチル化され、または、胃がんの発生と弱い相関を示してメチル化された。残り 1 個は、4 群全てでメチル化されていた。

遺伝子特異性の決定機構を検討するため、*H. pylori* 感染により容易に DNA メチル化される遺伝子 26 個のうち 15 個と、メチル化抵抗性の遺伝子 7 個について、胃粘膜での転写レベルを定量的に測定した。その結果、前者は後者に比べ、転写レベル低い遺伝子が多いことが認められた ( $P=0.001$ )。

### (3) 神経芽細胞腫でサイレンシングされる新規遺伝子の同定

小児腫瘍である神経芽細胞腫において、これまで、複数の CpG アイランドのメチル化 (CpG アイランドメチル化形質; CIMP) の存在は、強力な予後不良因子であることを示してきた。その機構として、CIMP が存在すると、症例毎に様々ながん抑制遺伝子や分化誘導遺伝子がサイレンシングされ、治療抵抗性を獲得する可能性が考えられる。

そこで、本年度は、CIMP 陽性の神経芽細胞腫株と陰性の症例を用いて MS-RDA 解析を行い、CIMP 陽性の神経芽細胞腫でサイレンシングされる遺伝子を探索した。その結果、8 個の遺伝子 [*FERD3L* (*N-TWIST*) (7p21), *CRYBA2* (2q34), *PCDHGC4* (5q31), *NPY* (7p15), *SPAG6* (10p12), *DDIT4L* (4q24), *CHR3SYT* (3q22), *C6orf141* (6p12)] が、CIMP 陽性の細胞株ではサイレンシングされていることを見出した。臨床材料 90 例の解析により、これらのうち *FERD3L*, *CRYBA2*, *PCDHGC4*、また、以前に見出した *CYP26C1* の合計 4 個のプロモーター領域 CpG アイランドは、CIMP 陽性の神経芽細胞腫で有意に高頻度にメチル化されることを認めた ( $P=0.001-0.01$ )。また、*CYP26C1* と *FERD3L* のメチル化の有無は、予後とも密接に関連 (ハザード比 12.3, 7.2) した。

個々の神経芽細胞腫では、今回までに同定した遺伝子の他、様々な遺伝子がサイレンシングされていることが、予後不良の原因と考えられる。そこで、NB-39nu 神経芽細胞腫細胞株を脱メチル化剤で処理、遺伝子サイレンシングを解除することで、retinoic acid (RA) による分化誘導療法への感受性が上がらないか否かを検討した。その結果、RA 単独では弱い分化誘導しか認められないものの、脱メチル化剤と RA の併用により、分化誘導作用の相乗的効果が認められた。

## D. 考察

### (1) ラット前立腺がんにおける *Tgfr2* 遺伝子サイレンシングの同定

今回、ラット前立腺がん *Tgfr2* 遺伝子のサイレンシングが見出されたことにより、これまで困難であった *in vivo* で DNA メチル化異常の誘発機構の

解析が可能になる。また、遺伝子サイレンシング誘発の促進・抑制により、発がんを促進・抑制している因子の探索も可能になる。

### (2) *H. pylori* 感染による DNA メチル化異常誘発の遺伝子特異性

特定の発がん因子により誘発される DNA メチル化異常に特定のプロファイルが存在することが明らかになった。その機構として、遺伝子の転写レベルが低いことが関与していることも示唆された。今後は、DNA メチル化プロファイルから過去の発がん因子曝露を推定できるようになる可能性がある。

### (3) 神経芽細胞腫でサイレンシングされる新規遺伝子の同定

神経芽細胞腫で新たに同定された個々の遺伝子の予後への影響は、CIMP の影響よりも小さかった。また、他の研究グループによる報告でも、個別の遺伝子のメチル化の予後への影響は限定的である。従って、CIMP は、様々な遺伝子のサイレンシング誘発を通じて、予後不良を誘発している可能性が高い。また、少なくとも特定の神経芽細胞腫細胞株では、脱メチル化剤と RA の併用は相乗的な効果を示し、CIMP が分化に重要な遺伝子を不活化している可能性が考えられた。

## E. 結論

ラット前立腺がんでは、*Tgfr2* 遺伝子はプロモーター領域 CpG アイランドのメチル化でサイレンシングされる。特定の環境因子は、転写レベルが低い遺伝子をメチル化することにより、特徴的な遺伝子群に DNA メチル化を誘発する。神経芽細胞腫では、CIMP の存在により複数の遺伝子が不活化されることが、予後不良に関与すると考えられた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Yamashita S, Takahashi S, McDonnell N, Watanabe N, Niwa T, Hosoya K, Tsujino Y, Shirai T and Ushijima T. Methylation-silencing of transforming growth factor- $\beta$  receptor type II in rat prostate cancers. *Cancer Res*, 68: 2112-2121, 2008.
2. Nobeyama Y, Okochi-Takada E, Furuta J, Miyagi Y, Kikuchi K, Yamamoto A, Nakanishi Y, Nakagawa H and Ushijima T. Silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in malignant melanomas. *Int J Cancer*, 121: 301-307, 2007.
3. Ushijima T. Epigenetic field for cancerization. *J Biochem Mol Biol*, 40: 142-150, 2007.
4. Enomoto S, Maekita T, Tsukamoto T, Nakajima T, Nakazawa K, Tatematsu M, Ichinose M and Ushijima T. Lack of association between CpG

- island methylator phenotype in human gastric cancers and methylation in their background non-cancerous gastric mucosae. *Cancer Sci*, 98: 1853-1861, 2007.
5. Cai LY, Abe M, Izumi S, Imura M, Yasugi T and Ushijima T. Identification of *PRTFDC1* silencing and aberrant promoter methylation of *GPR150*, *ITGA8* and *HOXD11* in ovarian cancers. *Life Sci*, 80: 1458-1465, 2007.
  6. Abe M, Westermann F, Nakagawara A, Takato T, Schwab M and Ushijima T. Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas. *Cancer Lett*, 247: 253-258, 2007.
- 本研究費に密接に関係するもの
1. Moriguchi K, Yamashita S, Tsujino Y, Tatematsu M and Ushijima T. Larger numbers of silenced genes in cancer cell lines with increased de novo methylation of scattered CpG sites. *Cancer Lett*, 249: 178-187, 2007.
- 学会発表
1. Ushijima T. DNA methylation as a marker for the past and future. Aichi Cancer Center International Symposium, Nagoya, January, 2007.
  2. Ushijima T. DNA methylation as a marker for the past and future. The New Zealand Society for Oncology Conference, Dunedin, May, 2007.
  3. Ushijima T, Nakajima T and Enomoto S. Epigenetic field defect for gastric cancers. Gordon Research Conference, Il Ciocco, May, 2007.
  4. Ushijima T. DNA methylation induction by *Helicobacter pylori*, and use as a cancer risk marker. The 19th Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (FAOBMB) Conference, Seoul, May, 2007.
  5. Ushijima T. Environment - epigenome interaction. Symposium by Asian Network of Epigenomics,
  6. Nakajima T, Maekita T, Enomoto S and Ushijima T. Epigenetic field for cancerization. 11th German-Japan Cancer Research Workshop, Kyoto, November, 2007.
  7. Ushijima T and Nakajima T. Epigenetic field defect for gastric cancers, and its use as a cancer risk marker. The 11th Annual Meeting of Taiwan Cooperative Oncology Group, Taipei, December, 2007.
  8. Ushijima T and Yamashita S. Silencing of *Tgfr2* due to promoter methylation in rat prostate cancers. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Rat Genomics and Models", Cold Spring Harbor, December, 2007.
  9. 牛島俊和、大河内(高田)江里子 エピジェネティク発がん機構とエピジェネティク発がん物質の検出 日本毒性病理学会シンポジウム 2007年1月
  10. 牛島俊和 エピジェネティクスによる発がん要因とリスクの評価 日本衛生学会シンポジウム 2007年3月
  11. 牛島俊和 エピジェネティクスからみた多段階発がん 日本エピジェネティクス研究会 2007年6月
  12. 牛島俊和 Epigenetics in Cancers and Polyclonal Disorders 日本薬物動態学会ビジョンシンポジウム 2007年7月
  13. 丹羽透、塚本徹哉、田中晴就、一瀬雅夫、杉村隆、立松正衛、牛島俊和 *Helicobacter pylori* 感染は胃粘膜上皮に異常 DNA メチル化を誘発する 発癌病理研究会 2007年8月
  14. 牛島俊和 エピジェネティクな発がんの場 日本癌学会 66回総会シンポジウム 2007年10月
  15. 岡大嗣、山下聡、中西幸浩、加藤抱一、上西紀夫、杉村隆、牛島俊和 Genome-wide screening for genes silenced in esophageal squamous cell carcinomas using a demethylating agent 第66回日本癌学会総会 2007年10月
  16. 岡大嗣、山下聡、中西幸浩、加藤抱一、上西紀夫、杉村隆、牛島俊和 食道扁平上皮がんにおけるサイレンシング遺伝子のゲノム網羅的探索 第18回日本消化器癌発生学会総会 2007年11月
  17. 牛島俊和、阿部雅修 神経芽腫の強力予後因子としての DNA メチル化 小児癌学会・小児血液学会シンポジウム 2007年12月
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)  
なし

分担研究報告書

諸臓器の前がん状態ならびにがんの臨床病理学的特性の基盤となる  
DNAメチル化異常の網羅的解析

分担研究者 金井 弥栄 国立がんセンター研究所病理部 部長

研究要旨

本年度は、肝多段階発がん過程における、ゲノム規模の DNA メチル化異常の意義の理解を進めることを目的とした。大腸がん肝転移症例より得られた正常肝組織 19 検体・肝細胞がん症例より得られた慢性肝炎ないし肝硬変症を呈する非がん肝組織 25 検体・肝細胞がん組織 29 検体において、4361BAC クローンをプローブとして搭載した Whole-Genome Array 4500 を用い、BAC アレイを基盤とするメチル化 CpG アイランド増幅法 (BAMCA 法) を施行して、DNA メチル化状態をゲノム網羅的に解析した。DNA メチル化減弱あるいは亢進を示した BAC クローン数は、対照である正常肝組織に比して、前がん状態にあると考えられる慢性肝炎ないし肝硬変症を呈する非がん肝組織で既に有意に増加しており、肝細胞がん組織でさらに有意に増加していた。正常肝組織と前がん状態にある肝組織を区別し得る DNA メチル化の減弱あるいは亢進を示し、かつその変化が肝細胞がんに進展するまで受け継がれる BAC クローンを抽出し得た。肝細胞がんの分化度・門脈侵襲の有無・肝内転移の有無と有意に相関する DNA メチル化の減弱あるいは亢進を示す、BAC クローンを抽出し得た。DNA メチル化の減弱あるいは亢進の双方向のゲノム規模の異常は、前がん状態から肝細胞がんの悪性進展に至るまで、肝多段階発がん過程に継続して寄与する可能性がある。抽出した BAC クローン等を搭載した DNA メチル化診断ミニチップ等を作製することにより、慢性肝障害による経過観察症例における発がんリスク評価を行い得ると期待される。

A. 研究目的

本年度は、組織検体におけるゲノム網羅的 DNA メチル化状態の解析に基づき、肝細胞がんの多段階発生過程における DNA メチル化異常の意義の理解を進め、肝細胞がん発生リスク評価指標を得ることを目的とする。

B. 研究方法

大腸がん肝転移症例より得られた肝炎ウイルス感染を伴わず慢性肝炎ないし肝硬変症の組織所見を呈さない正常肝組織 19 検体・肝細胞がん症例より得られた前がん状態にあると考えられる慢性肝炎ないし肝硬変症を呈する非がん肝組織 25 検体・同一症例より得られた肝細胞がん組織 29 検体において、BAC アレイを基盤とするメチル化 CpG アイランド増幅法 (BAMCA) 法により、DNA メチル化状態をゲノム網羅的に解析した。

BAMCA 法において、はじめに検体ならびに対照となるゲノム DNA を DNA メチル化感受性制限

酵素 SmaI で消化し、DNA メチル化を受けていない CpG 部位に平滑末端を得た。次に、DNA メチル化非感受性制限酵素 XmaI で消化し、DNA メチル化を受けていた CpG 部位にのみ突出末端を得た。突出末端にアダプターを付加し、アダプターにアニールするプライマーを用いて蛍光標識ならびに PCR 増幅を施行した。これを、国立がんセンターと東京医科歯科大学の稲沢譲治教授が共同で開発した Whole-Genome Array 4500 に、43 °C・72 時間の条件で共ハイブリダイゼーションした。同カスタムアレイは全染色体に分布する 4361BAC クローンをプローブとして搭載しており、0.7Mb の解像度が期待される。

DNA メチル化プロファイルには組織特異性・臓器特異的性が存在するので、対照として末梢血等ではなく、大腸がん肝転移症例より得られた、肝炎ウイルス感染を伴わず慢性肝炎ないし肝硬変症の組織所見を呈さない、正常肝組織を用いることが肝要である。さらに、DNA メチル化の状態は加

齢に伴って変化すると認識されているので、検体を採取した症例と性ならびに年齢の平均値を概ね一致させた大腸がん肝転移症例を複数選択し、これらの症例より得られた正常肝組織より抽出したゲノム DNA を混合して対照とした。

GenePix Personal 4100A (Axon Instruments, Foster City, CA) でスキャンし、結果を GenePix Pro 5.0 imaging software (Axon Instruments) ならびに Acue 2 software (Mitsui Knowledge Industry, Tokyo, Japan) により解析した。ゲノム網羅的 DNA メチル化状態に基づく階層的クラスタリングは、Impressionist software (Gene Data, Basel, Switzerland) を用いて施行した。

#### (倫理面への配慮)

平成 19 年 8 月 16 日改正文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い、国立がんセンター倫理委員会に研究の承認を得 (課題番号 16-33「ヒト多段階発がん過程における DNA メチル化の変化に関する研究」 研究代表者: 金井弥栄)、倫理面に充分配慮して研究を進めた。手術材料の残余の組織等の研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し、文書で同意を得ている。試料の採取に当たっては、患者の治療方針決定のための病理組織標本を迅速に作製して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせなかった。全ての分子病理学的解析は、連結可能匿名化し、患者の個人情報保護に充分配慮して進めた。すなわち、個人識別番号と匿名化番号の対応表は、研究所内におかれた匿名管理者によって終始厳重に管理され、診療情報と同時に閲覧されることはなかった。実験室においては、終始患者個人を特定することなく研究を進めた。

#### C. 研究結果

蛍光強度比の散布図において、大腸がん肝転移症例より得られた正常肝組織では、少数の BAC クローンにおいて個体差や加齢に基づくと見られる DNA メチル化状態のばらつきがあることが分かった。肝細胞がん症例より得られた慢性肝炎ないし肝硬変症を呈する非がん肝組織では既に、正常肝組織に見られた個体差や加齢の範囲を越えて、有意に多数の BAC クローンにおいて DNA メチル化の減弱あるいは亢進が認められた。肝細胞がん組織では、DNA メチル化の減弱あるいは亢進を認める BAC クローン数がさらに有意に増加し、DNA メチル化の減弱あるいは亢進の程度も更に亢進した。

多段階発がん過程に寄与する意義のある DNA メチル化の変化の起こる BAC 領域を同定するために、ウィルコクソン検定を行い、 $P < 0.01$  を有意として、正常肝組織から慢性肝炎ないし肝硬変症

を呈する非がん肝組織を区別するのに有用な 728 BAC クローンを抽出した。これらの BAC クローンにおける DNA メチル化の変化の一部は、炎症や線維化に伴うものである可能性がある。しかし、前がん状態において DNA メチル化が減弱あるいは亢進し、肝細胞がんに至るまで継続してさらに減弱あるいは亢進するか、肝細胞がんにおいて DNA メチル化の減弱あるいは亢進状態が維持される場合 (552BAC クローン)、当該 BAC クローンにおける DNA メチル化の変化は、多段階発がん過程に早期から寄与するものである可能性がある。当該 BAC クローンにおいてサポートベクターマシーンアルゴリズムによる選別を施行し、正常肝組織と前がん状態にある肝組織をよく区別しうる上位 64BAC クローン抽出した。この 64BAC クローンをを用いて階層的クラスタリングを施行したところ、正常肝組織と慢性肝炎ないし肝硬変症を呈する非がん肝組織を、誤りなく区別し得た

同様に、早期あるいは高分化な肝細胞がんと中ないし低分化な肝細胞がんを区別するのに有用な BAC クローンを抽出した。上位 45 クローンをを用いて階層的クラスタリングを行い、両群を誤りなく区別し得た。門脈侵襲を伴わない肝細胞がんと門脈侵襲を伴う肝細胞がんを区別するのに有用な BAC クローンを抽出した。上位 170 クローンをを用いて階層的クラスタリングを行い、両群を誤りなく区別し得た。肝内転移を伴わない肝細胞がんと肝内転移を伴う肝細胞がんを区別するのに有用な BAC クローンを抽出した。上位 64 クローンをを用いて階層クラスタリングを行い、両群を誤りなく区別し得た。B 型肝炎ウイルス感染患者ならびに C 型肝炎ウイルス感染患者に生じた肝細胞がんを区別するのに有用な BAC クローンを抽出した。上位 140 クローンをを用いて階層的クラスタリングを行い、両群を誤りなく区別し得た。

全 BAC クローンを全て用いて階層的クラスタリング (教師なし法) を施行すると、肝細胞がん検体は、A (17 症例)・B (12 症例) 2 群に大別された。

#### D. 考察

ゲノム規模の DNA メチル化の変化が前がん状態において既に起こり、多段階発がん過程の進展に伴い更に変化することが分かった。ヒトのがんにおける DNA メチル化異常は一般に、広汎な DNA メチル化減弱と局所的な DNA メチル化亢進よりなると考えられてきたが、多段階発がん過程に寄与する可能性のある BAC クローン数は DNA メチル化の減弱ならびに亢進の両方向において同等程度であることがわかった。

慢性肝炎ないし肝硬変症において既に変化し、単に炎症や線維化に伴うのではなく肝細胞がんに至るまで受け継がれる DNA メチル化異常を示す

BAC クローンを抽出し得た。本知見を基に DNA メチル化診断ミニチップ等を作製すれば、慢性肝障害の段階での肝生検標本における発がんリスク評価につながると期待される。今後、慢性肝炎ないし肝硬変症により長く経過観察を受ける途上で、肝生検検体の蒐集を予定している。経過観察の後に実際に肝細胞がんを発症した患者の慢性肝炎ないし肝硬変症の段階での肝生検標本には、正常肝組織から前がん状態にある肝組織を区別するのに有用で肝細胞がんに至るまで受け継がれるような DNA メチル化プロファイルが確かに検出され、経過観察の後に実際に肝細胞がんを発症しなかった患者の慢性肝炎ないし肝硬変症の段階での肝生検標本には検出されないことを確認する予定である。

肝細胞がんの臨床病理学的悪性を規定する、DNA メチル化プロファイルが存在する可能性が示唆された。同一検体において、マイクロアレイを用いた網羅的 mRNA 発現解析も行っており、分化度・門脈侵襲の有無・肝内転移の有無と相関する DNA メチル化異常を認める BAC 領域に存在して、肝細胞がんが発現が低下している遺伝子等に注目すれば、DNA メチル化によって不活化され肝細胞がんの悪性進展に寄与する遺伝子を同定できる可能性がある。

従来の、がん関連遺伝子のプロモータ領域を対象とした局所的 DNA メチル化亢進等に関する解析では、DNA メチル化異常の頻度等に関して、B 型ならびに C 型肝炎ウイルス感染を背景とする肝細胞がんの間での差違は必ずしも明確でなかった。DNA メチル化状態のゲノム網羅的解析により、B 型ならびに C 型肝炎ウイルスによる発がん機構にそれぞれ関わる DNA メチル化プロファイルが存在する可能性が示された。

教師なし階層的クラスタリングで大別された肝細胞がん A・B2 群は、DNA メチル化異常を来す異なる分子経路にそれぞれ対応する可能性がある。各群の症例に共通して認められる DNA メチルトランスフェラーゼ等の発現等の異常の検索を予定している。それぞれの DNA メチルトランスフェラーゼ等が、生検・手術標本において A・B 群の DNA メチル化プロファイルを示す患者をそれぞれ適応群とする、治療の標的候補分子となるとの展開が期待される。

## E. 結論

DNA メチル化の減弱あるいは亢進の双方向のゲノム規模の異常は、前がん状態から肝細胞がんの悪性進展に至るまで、肝多段階発がん過程に継続して寄与する可能性がある。抽出したプローブ等を搭載した DNA メチル化診断ミニチップ等を作製することにより、慢性肝障害による経過観察症

例における発がんリスク評価を行い得ると期待される。

## F. 研究発表

### 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Kanai Y, and Hirohashi S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. *Carcinogenesis*, 28: 2434-2442, 2007.
2. Sawada M, Kanai Y, Arai E, Ushijima S, Ojima H, and Hirohashi S. Increased expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein in uterine cervix squamous cell carcinoma and its precursor lesion. *Cancer Lett*, 251: 211-219, 2007.
3. Loukopoulos P, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Sakamoto M, Yamazaki K, Kosuge T, Kanai Y, Hosoda F, Imoto I, Ohki M, Inazawa J, and Hirohashi S. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: identification of genetic indicators that predict patient outcome. *Cancer Sci*, 98: 392-400, 2007.
4. Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T, Nakajima A, and Hirohashi S. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res*, 13: 902-911, 2007.
5. Takahashi Y, Akishima-Fukasawa Y, Kobayashi N, Sano T, Kosuge T, Nimura Y, Kanai Y, and Hiraoka N. Prognostic value of tumor architecture, tumor-associated vascular characteristics, and expression of angiogenic molecules in pancreatic endocrine tumors. *Clin Cancer Res*, 13: 187-196, 2007.
6. Yoshida Y, Kokubu A, Suzuki K, Kuribayashi H, Tsuta K, Matsuno Y, Kusumoto M, Kanai Y, Asamura H, Hirohashi S, and Shibata T. Molecular markers and changes of computed tomography appearance in lung adenocarcinoma with ground-glass opacity. *Jpn J Clin Oncol*, 37: 907-912, 2007.

本研究費に密接に関係するもの

1. Kikuchi R, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, and Imoto I. Connective Tissue Growth Factor is a putative conditional tumor-suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in ovarian cancer. *Cancer Res*, 67: 7095-7105, 2007.
2. Kanai Y. Overexpression of HDACs: a prognostic



marker for gastric cancer identified by tissue microarray. *Lancet Oncol*, 9: 91-93, 2008.

#### 学会発表

1. 新井恵吏, 金井弥栄, 牛島抄織, 藤元博行, 細田文恵, 柴田龍弘, 近藤格, 横井佐奈, 井本逸勢, 稲澤譲治, 広橋説雄. 腎がんの発生過程における DNA メチル化の変化のゲノム網羅的解析. 第 1 回日本エピジェネティクス研究会年会 2007 年 6 月
2. 金井弥栄. 慢性肝炎・肝硬変症・肝細胞がんにおける DNA メチル化異常. 第 4 回日本病理学会カンファレンス「肝疾患研究の最前線: 現状と課題」 2007 年 7 月
3. 新井恵吏, 金井弥栄, 牛島抄織, 尾島英知, 細田文恵, 柴田龍弘, 近藤格, 横井佐奈, 井本逸勢, 稲澤譲治, 広橋説雄. 肝多段階発がん過程における DNA メチル化の変化のゲノム網羅的解析. 第 4 回日本病理学会カンファレンス 2007 年 7 月
4. Arai E, Kanai Y, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, and Hirohashi S. Genetic classification of renal cell carcinoma associated with DNA methylation alteration and prognosis of patients. 66<sup>th</sup> Annual

Meeting of the Japanese Cancer Association (第 66 回日本癌学会学術総会) 2007 年 10 月

5. Kikuchi R, Imoto I, Tsuda H, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, and Inazawa J. CTGF is a tumor-suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in ovarian cancer. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第66回日本癌学会学術総会) 2007 年10月
6. Satow R, Shitashige M, Honda K, Kanai Y, Hirohashi S, and Yamada T. Whole-genome exon-level transcriptome survey of human hepatocellular carcinoma. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第66回日本癌学会学術総会) 2007年10月

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

DNA メチル化状態のゲノム網羅的解析に基づく腎細胞がんの予後予測システム (出願予定)

##### 2. 実用新案登録

該当無し

##### 3. その他

該当無し

分担研究報告書

DNA メチル化の分子機構の解析およびがんにおいて不活化される新規遺伝子の同定

分担研究者 豊田 実 札幌医科大学内科学第一講座 講師

研究要旨

DNA メチル化により不活化される遺伝子の網羅的解析により、p53 や RAS などのシグナル伝達や糖鎖異常における役割について明らかにした。DNA メチル化はタンパクをコードする遺伝子だけでなく、microRNA をはじめとする機能性 RNA のサイレンシングに関与することを明らかにした。DNA メチル化は前がん病変においても認められ、がんの早期診断や高リスク群予測のためのマーカーとして重要と考えられる。

A. 研究目的

DNA メチル化は遺伝子サイレンシングの分子機構として重要であるが、がんの発生と進展における役割については、未知の点が多い。異常メチル化により、数百の遺伝子が不活化されていると推定され、新規メチル化標的遺伝子の同定しその意義を明らかにすることにより、がんの診断および治療法の開発へ向けて重要な知見が得られると考えられる。最近、microRNA をはじめとする機能性 RNA の遺伝子異常が発がん過程に関与することが示唆される。本研究では、がんにおける microRNA のエピジェネティックな異常についても解析する。また、前がん病変における異常メチル化の解明により、がんの予防やハイリスクグループの同定に有用な情報が得られると考えられる。

B. 研究方法

DNA メチル化に関しては、COBRA 法および Bisulfite sequencing 法、Pyrosequence 法により、遺伝子発現に関しては、RT-PCR 法および real-time PCR 法により解析した。細胞増殖に関しては、コロニーフォーメーションアッセイにて、アポトーシスに関しては、Flow cytometry 法により解析した。レポーターアッセイにより、NF- $\kappa$ B(p65/p50)の転写活性化能について検討した。

（倫理面への配慮）

平成 17 年厚生労働省告示第 255 号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、倫理面に充分配慮して研究を進める。手術材料の残余の組織などの研究利用につき、患者に説明し文書で同意を得、連結可能匿名化して解析を行い、患者のプライバシーを遵守し、札幌医科大学の倫理委員会の承認を得て使用する。

C. 研究結果

DNA メチル化により不活化されている遺伝子は多数存在するが、DNA メチル化解析のみでは、がん化に重要な役割を果たす遺伝子と、非特異的にメチル化されている遺伝子を区別することが難しい。より効率的にがん化に関与する遺伝子を同定するため、メチル化の標的遺伝子の中から、インシリコ解析により p53 の標的遺伝子の同定を試みた。その結果、SFRP2、BNIP3、c10orf58 が、p53 の標的遺伝子でかつ、DNA メチル化により不活化されることを明らかにした。

RAS シグナルの活性化は細胞増殖を亢進させ、がん化に重要である一方、正常細胞において RAS シグナルが異常活性化すると、細胞老化やアポトーシスが誘導される。これらの現象には RAS を負に制御する因子の関与が示唆される。我々はこれまで、大腸癌において RAS の負の制御遺伝子 RASSF ファミリー遺伝子のエピジェネティックな異常の解析により、大腸癌において、RASSF2 が異常メチル化により不活化されていることを明らかにした。本年度は、RASSF2 が胃がんや口腔扁平上皮がんにおいても異常メチル化により不活化されること、RASSF2 が細胞増殖抑制やアポトーシス誘導に関与するがん抑制機能を有すること、RASSF2 が NF- $\kappa$ B の活性を抑制することを明らかにした。

ヒストンメチル化酵素に特徴的な SET ドメインと相同性を有する PR ドメインを有する遺伝子ファミリー、PRDM1-16 について各種腫瘍における遺伝子発現を検討したところ、PRDM14 遺伝子が乳癌において遺伝子増幅により発現が増加していることを明らかにした。PRDM14 を過剰発現させた細胞において、siRNA により PRDM14 遺伝子の発現を抑制することにより、腫瘍細胞の増殖を抑

制可能であり、PRDM14 が治療の分子標的である可能性が示唆された。また、大腸癌および胃癌において、PRDM5 遺伝子が DNA メチルによりサイレンシングされていることを見いだした。PRDM5 遺伝子を胃癌細胞株に導入することにより、コロニー形成能の抑制を認め、PRDM5 ががん抑制遺伝子としての機能を有することが示唆された。

最近、癌において発現が低下し、癌抑制的に働く microRNA の中に、DNA メチル化によりサイレンシングされるものがあることが明らかとなりつつある。脱メチル化により発現が上昇する microRNA について解析したところ、157 種類の microRNA 中、37 種類において発現の上昇を認めた。そのうち、mir-34b/c は microRNA の初期転写産物の転写開始点近傍の異常メチル化により発現が抑制されていることを明らかにした。

がん組織においてしばしば糖鎖の発現亢進や低下を認める。われわれは、大腸がんおよび胃がんにおける、Sda 抗原の発現低下と SLX 抗原の発現上昇に、N-アセチルガラクトサミン転移酵素である B4GALNT2 遺伝子の DNA メチル化による不活化が関与することを明らかにした。大腸がん細胞株において DNA メチル化阻害剤処理により、B4GALNT2 の発現が回復し、Sda 抗原の発現も回復した。Sda 抗原の減弱はがんの転移に関与することが報告されており、B4GALNT2 のエピジェネティックな不活化と転移の関連が示唆された。

*H.pylori* 感染胃炎において、胃体部に及ぶ活動性胃炎（皺襞肥大型胃炎）は未分化型胃癌のハイリスク群として報告されている。われわれは、皺襞肥大型胃炎における CDH1 遺伝子の DNA メチル化について解析し、皺襞肥大型胃炎陽性例では、HP 感染陽性・皺襞肥大型胃炎陰性例に比べ、CDH1 遺伝子のメチル化密度が有意に高いこと、ほぼ全ての CpG 配列にメチル化を有する細胞の頻度が高いことが明らかになった。皺襞肥大型胃炎患者に未分化型癌が多いことから、炎症による CDH1 遺伝子メチル化の進展が発癌に重要な役割を担っていることが示唆された。

#### D. 考察

がん細胞において、p53 の遺伝子変異がなくても、その標的遺伝子が異常メチル化により発現しなくなることで、p53 の機能が阻害されることを示した。メチル化により発現が抑制される機能性 RNA に関しては、今後さらにがん化における役割や診断・治療の標的としての有用性について検討が必要と考えられる。

従来、がんの発生には K-ras、BRAF などの遺伝子変異により、Ras 経路が活性化されることが、重要とされてきた。本研究では、遺伝子変異だけでなく、これらのシグナル経路を負に制御する遺伝子群、

RASSF 遺伝子ファミリー、特に RASSF2 の DNA メチル化による不活化が、がん化に重要な役割を果たす可能性を示した。

最近、microRNA の DNA メチル化による不活化が報告されつつある。しかし、いずれの場合も、microRNA の発現は、DNA メチル化阻害剤で誘導され、メチル化の関与が示唆されるが、microRNA の初期転写産物の転写開始点が明らかになっていない場合が多い。今後、microRNA 初期転写産物の転写開始点を同定し、DNA メチル化を解析することで、microRNA 発現抑制における DNA メチル化の役割については、直接的な関与か、間接的な関与か明らかにすることが必要と思われる。また、microRNA 以外にも、タンパクをコードしない、機能性 RNA が DNA メチル化により不活化されている可能性があり、今後さらに解析が必要と考えられる。

がんにおける糖鎖の異常は転移や浸潤に関与し、多くの解析がなされているが、糖鎖異常の分子機構は不明な点が多い。われわれは、大腸癌および胃癌において、N-アセチルガラクトサミン転移酵素の一つ、B4GALNT2 が DNA メチル化により不活化されていることを明らかにした。脱メチル化により B4GALNT2 で制御される Sda 抗原の発現が回復し、DNA メチル化の制御によりがんにおける糖鎖異常を制御しうる可能性が示された。

*H.pylori* 陽性胃炎特に、萎縮性胃炎と発がんのリスクが報告されている。また、萎縮性胃炎では、DNA メチル化が亢進しており、分化型胃がんの発生母地として重要であることが示唆される。一方、未分化型胃がんにおいても *H.pylori* の関与が示唆されるが、DNA メチル化との関連については未知の点が多い。われわれは、皺襞肥大型胃炎陽性例において CDH1 遺伝子のメチル化レベルが亢進していることを明らかにした。CDH1 のメチル化解析は、胃癌発生のリスク予測に有用と考えられた。

#### E. 結論

DNA メチル化の網羅的解析により、がんのシグナル伝達や糖鎖異常における役割について明らかにした。DNA メチル化はタンパクをコードする遺伝子だけでなく、microRNA をはじめとする機能性 RNA のサイレンシングに関与することを明らかにした。また、DNA メチル化はがんの早期診断や高リスク群予測のためのマーカーとして重要と考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Imai T, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Ogi K, Sogabe Y, Kashima L, Maruyama R, Nojima M, Mita H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Shinomura Y,

- Hiratsuka H and Tokino T. Epigenetic inactivation of *RASSF2* in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, in press.
- Nishikawa N, Toyota M, Suzuki H, Homma T, Fujikane T, Ohmura T, Nishidate T, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Sonoda T, Sasaki Y, Urano T, Imai K, Hirata K, Tokino T. Gene amplification and overexpression of PRDM14 in breast cancer. *Cancer Res*, 67: 9649-9657, 2007.
  - Watanabe Y, Toyota M, Kondo Y, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Sasaki Y, Sekido Y, Hiratsuka H, Shinomura Y, Imai K, Itoh F, Tokino T. PRDM5 identified as a target of epigenetic silencing in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 13: 4786-4794, 2007.
- 本研究費に密接に係るもの
- Ting A, Suzuki H, Cope L, Schuebel K, Lee B, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Baylin SB. A requirement for DICER to maintain full promoter CpG Island hypermethylation in human cancer cells. *Cancer Res*, in press.
  - Maruyama R, Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Yamamoto E, Nojima M, Fujikane T, Sasaki Y, Yamashita T, Watanabe Y, Hiratsuka Y, Hirata K, Itoh F, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Cytoplasmic RASSF2A is a proapoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer. *Carcinogenesis*, in press.
  - Suzuki H, Toyota M, Caraway H, Gabrielson E, Ohmura T, Fujikane T, Nishikawa N, Sogabe Y, Nojima M, Sonoda T, Mori M, Hirata K, Imai K, Shinomura Y, Baylin SB, Tokino T. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *British J Cancer*, 98: 1147-1156, 2008.
  - Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez N, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR, Issa JPI. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies colon cancer corresponding to three different subclasses of disease. *PNAS*, 104: 18654-18659, 2007.
  - Schuebel KE, Chen E, Cope Lm, Glockner SC, Suzuki H, Yi JM, Chan TA, Van Neste L, Van Criekinge W, van den Bosch S, van Engeland M, Ting AH, Jair K, Yu W, Toyota M, Imai K, Ahuja N, Herman JG, Baylin SB. Comparing the DNA hypermethylation with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet*, 3: 1709-1723, 2007.
  - Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, Tokino T, Mori M, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of *SFRP* genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene*, 26: 4699-4713, 2007.
  - Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, Takagi H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M, Sonoda T, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis*, 28: 2459-2466, 2007.
  - Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Maruyama R, Kusano M, Nishikawa N, Watanabe Y, Sasaki Y, Abe T, Yamamoto E, Tarasawa I, Sonoda T, Mori M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Identification of *DFNA5* as a target of epigenetic inactivation in gastric cancer. *Cancer Sci*, 98: 88-95, 2007.
- 2.学会発表
- Toyota M, Epigenetic silencing of genes involved in signaling pathway. Symposium, The 7th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, January, Hawaii, USA, 2007.
  - Toyota M, Epigenetic silencing of genes involved in signaling pathways in gastric cancer. Symposium, 35th Congress of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, September, Plaque, Czech Republic, 2007.
  - Toyota M. Epigenetic alterations in gastrointestinal cancer: functional consequences and clinical application IARC workshop, "Epigenetics and Cancer." Lyon, December, 2007.
  - 豊田 実 The role of DNA methylation changes in signal transduction in gastric cancer. 日本癌学会 66回総会シンポジウム 2007年10月.
  - 豊田 実、山本英一郎、篠村恭久. 慢性胃炎におけるエピジェネティックな異常-DNAメチル化のおこるプロセス-. 第49回日本消化器病学会大会シンポジウム、2007年10月.
  - 豊田 実、エピジェネティックな異常の発がんにおける役割と診断・治療への応用、日本電気泳動学会、シンポジウム、2007年11月.
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）  
該当無し