

200823016A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牛島 俊和

平成21年(2009)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 ..... 9  
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 ..... 13  
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 ..... 18  
豊田実 札幌医科大学内科学第一講座
4. 胃癌におけるエピジェネティック異常に基づいた高精度がん  
化予測診断 ..... 21  
伊東文生 聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科
5. 膵胆道領域の癌診断におけるepigenetic molecular marker  
の有用性 ..... 23  
松林宏行 静岡県立静岡がんセンター
6. DNA低メチル化の消化管腫瘍発生への影響 ..... 24  
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 ..... 26

## 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

研究代表者 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 DNAメチル化異常は、ヒト発がんに関与するが、その誘発要因や誘発の分子機構に関しては不明の点が多い。本研究では、DNAメチル化異常の誘発機構を明らかにし、がん及び非がん部でのDNAメチル化異常を利用してがん抑制遺伝子の同定と臨床的に有用な診断方法の開発を行う。今年度は、がんでDNAメチル化されるCpGアイランドを大規模にスクリーニングし、がんでメチル化されやすい遺伝子は正常細胞で転写が低いことを示した。マウスモデルでグローバルな低メチル化は、舌発がんを抑制することを示した。ヒト胃がんで*MiR-124a*及び*MiR-34b/c*、大腸がんで*MiR-34b/c*のサイレンシングを見出した。*IGFBP7*がCpGアイランドメチル化形質陽性の胃がんではメチル化され、p53シグナルが遮断されることを示した。肝細胞がんの発がんリスク及び再発リスクの診断に活用可能なBACクローンを同定した。胃洗浄液での*MINT25*のメチル化を用いて、優れた感度と特異度で胃がんの存在を診断できる可能性を示した。*RASD1*のメチル化により、骨髄腫のデキサメサゾン感受性が低下することを示した。

研究分担者  
金井 弥栄 国立がんセンター研究所  
病理部・部長  
豊田 実 札幌医科大学  
生化学講座・教授  
伊東 文生 聖マリアンナ医科大学  
消化器肝臓内科・教授  
松林 宏行 静岡県立静岡がんセンター  
内視鏡科・医長  
山田 泰広 岐阜大学大学院医学系研究科  
腫瘍制御学講座・准教授

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；主にがん抑制遺伝子）と、がん化の結果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）とが存在する。ドライバーの同定が重要なことは明らかであるが、パッセンジャー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。

DNAメチル化異常の診断応用は、発がんリスク診断、存在診断、病態診断に大別できる。まず、研究代表者らにより、DNAメチル化異常はがん患者の非がん部にも存在し、その量は発がんリスクと相関することが示されている。従って、非がん組織に蓄積したDNAメチル化異常の測定により、発がんリスク診断が行える可能性がある。次に、DNAメチル化異常は、突然変異とは異なり、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。さらに、DNAメチル化状態は遺伝子発現と比べて短期的変動が極めて少ないことを活用して、がんの悪性度・予後・治療感受性予測等の病態診断に用いることが出来る。研究代表者による神経芽細胞腫の予後診断など、既存の診断法を上回る有用性を示す場合がある。

一方、DNAメチル化異常が深くヒト発がんに関与し、診断的にも有用であるにも関わらず、どのような要因により、また、どのような分子機構により

## 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。研究代表及び分担者は、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

誘発されるのかについては、不明の点が多い。研究代表者らは、ヒト胃癌の強力な誘発因子である *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染者の胃粘膜では、高度の DNA メチル化異常が蓄積していることを見出してきた。また、研究分担者は DNA 低メチル化マウスを用いて、グローバルな DNA 低メチル化は大腸の微小腺腫や肝がんは促進、大腸肉眼的腫瘍や胃がんは抑制することを示してきた。

本研究では、(1) DNA メチル化異常の誘発機構や低メチル化の発がんにおける役割を明らかにすること、(2)特にゲノム網羅的な DNA メチル化変化の解析により、がん抑制遺伝子のサイレンシングを含めて、がんでのエピジェネティック異常の全体像を明らかにすること、(3) がんの診断マーカーとして役立つ DNA メチル化変化を同定すること、を目的とする。

## B. 研究方法

### (1) マウス、スナネズミ、細胞株

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 と null allele を持つマウス (*Dnmt1* chip/c) を使用した。対照には、hypomorphic allele と野生型 allele をもつマウス (*Dnmt1* chip/+) を用いた。舌・食道がんは、4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) の飲水投与により誘発した。

スナネズミは、日本クレアから購入した。ヒト細胞株は、ATCC から購入または JCRB から分与を受けた。

### (2) ゲノム網羅的な DNA メチル化解析

ゲノム網羅的な DNA メチル化解析には、1) 脱メチル化剤処理後、発現マイクロアレイによりスクリーニングする方法、2) BAC array-methylated CpG island amplification (BAMCA)法、3) methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)-CpG アイランドマイクロアレイ法の、3通りの方法を使い分けた。

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。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研究分担者と共同で開発した 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。MeDIP-CpG アイランドマイクロアレイ法は、ゲノム DNA を抗 5-メチルシチジン抗体で免疫沈降したものを、ゲノム上の 34,697カ所の CpG アイランドを搭載するアレイにハイブリダイズさせ、独自のアルゴリズムによりメチル化の程度を判定した。

### (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、シークエンス法、Methylation-specific PCR (MSP)法、定量的 MSP 法、COBRA 法、及び、Pyrosequence 法により解析した。LINE1 の低メチル化は Pyrosequence 法により解析した。BAC クローンの前メチル化レベルは、蛍光強度比の実測値を用いた。

### (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 H3Ac 抗体、H3K4me3 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施行した。

## C. 研究結果

### (1) DNA メチル化異常の誘発機構と低 DNA メチル化の発がんにおける意義

昨年度までに、*H. pylori* 感染者の胃粘膜では特定の遺伝子に DNA メチル化異常が誘発されていることを見出してきた。本年度は、特定の遺伝子に DNA メチル化異常が誘発される機構を明らかにするために、ヒトがん細胞株で高頻度にメチル化される遺伝子を、MeDIP-CpG アイランドマイクロアレイ法により大規模に分離した。前立腺がん細胞株 4 系統のうちどれかでメチル化される DNA メチル化高感受性プロモーター領域 CpG アイランド 521 個と、全くメチル化されない抵抗性 CpG アイランド 5,510 個を分離した。同様に、乳がん細胞株 3 系統で高感受性を示す 733 個と抵抗性を示す 5,430 個を分離した。前立腺がん・乳がんとも、高感受性遺伝子には正常細胞で転写レベルが低い遺伝子が有意に多く含まれ、低転写が DNA メチル化感受性に重要であることが示された。

昨年度までに、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、胃腫瘍発生を強く抑制することを明らかにした。今年度は、DNA 低

メチル化が口腔腫瘍に及ぼす影響を検討した。4NQOによる舌腫瘍の発生数/マウス(mean ± SD)は、DNA低メチル化(Dnmt1 chip/c)マウスで1.90 ± 0.81 (n=22)、コントロール(Dnmt1 chip/+)マウスで4.91 ± 1.02 (n=23)であり、DNA低メチル化は舌腫瘍発生を強く抑制した(P<0.05)。また腫瘍最大径は、DNA低メチル化(Dnmt1 chip/c)マウスで1.30 ± 0.67mm (n=22)、コントロール(Dnmt1 chip/+)マウスで2.07 ± 0.57 mm (n=23)であり、DNA低メチル化は舌腫瘍の発育を強く抑制した(P<0.005)。さらに、組織学的検索において扁平上皮癌の発生率が、DNA低メチル化マウスで19.0%、コントロールマウスで60.9%と浸潤性腫瘍の発生が抑制された(P<0.005)。また、Ki67免疫染色による細胞増殖活性の検討では、舌尖部と舌背部において低メチル化マウスで細胞増殖活性の低下が認められた。

## (2) がんでのエピジェネティック異常の全体像の解明とがん抑制遺伝子の同定

これまで、ヒト胃がんでのmicroRNA(miRNA)遺伝子のメチル化サイレンシングは知られていなかった。そこで、他のがんではがん抑制作用が報告されており、プロモーター領域 CpG アイランドをもつmiRNA遺伝子6個について、胃がんでのメチル化サイレンシングを検討した。その結果、1つのmiRNAをコードする3個の遺伝子*MiR-124a-1*、*-2*、及び*-3*が、胃がんではメチル化によりサイレンシングされていることが明らかになった。*MiR-124a-1*、*-2*、及び*-3*は、28個の胃がんのうち、それぞれ11、23、及び26個でサイレンシングされており、分化型胃がんと未分化型胃がんとの頻度に差はなかった。また、大腸がんでの検索により見出された*MiR-34b/c*が、胃がんでもサイレンシングされていることを確認した。

胃がんにおける高メチル化とグローバルな低メチル化の関係を解析する目的で、CpGアイランドメチル化形質(CIMP)-high、CIMP-low、CIMP-negative胃がん症例におけるLINE1のメチル化レベルを解析した。その結果、CIMP-lowで有意に低メチル化(P<0.01)、また*p53*変異を認める症例において有意に低メチル化(P<0.01)を示した。胃がんにおいてはグローバルな低メチル化はCIMP-low、*p53*変異との関連を認め、グローバルな低メチル化により染色体不安定性や突然変異が誘導されるパスウェイが存在することが示唆された。

CIMP陽性大腸がんにおいて、*BRAF*の変異を高率に認めるが、その原因は不明である。最近、*BRAF*-ERK-MEK経路の活性化に伴って、*IGFBP7*がネガティブフィードバックとして働き、*BRAF*変異を有する細胞に細胞老化とアポトーシスを誘導することが報告された。大腸がんにおける*IGFBP7*のメチル化を検討したところ、CIMP陽性群において高頻度に認められた。従って、CIMPをもつ細胞は、*BRAF*

変異を起こしてもsenescenceを免れ、がん化する可能性が考えられた。さらに、*IGFBP7*は*p53*標的遺伝子であることも明らかにした。CIMP陽性大腸がんでは*p53*変異が少ないことが知られており、*p53*標的遺伝子がDNAメチル化により不活化されることがその機構である可能性が示唆された。

昨年度まで、大腸がんにおいてDNAメチル化によりサイレンシングされているmiRNAをTaqMan PCR法で解析し、*MiR-34b/c*が大腸がん症例の90%において異常メチル化されていること、*CDK6*、*MET*が*MiR-34b/c*の標的であることを明らかにしてきた。本年度は、miRNAマイクロアレイを用いて、DNMT1およびDNMT3をノックアウトした大腸がん細胞株において、発現が誘導されるmiRNA470個を網羅的に同定した。うち10個のmiRNAがDNAメチル化により不活化されていることを確認した。現在、臨床例におけるメチル化の頻度や標的遺伝子に関して解析中である。

## (3) 診断的に有用なDNAメチル化異常の同定

発がんリスク診断としては、昨年度までに、*H. pylori*感染陰性者では、胃粘膜DNAメチル化レベルが胃がんリスクと相関することを示してきた。近年、内視鏡的胃粘膜剥離術後の異時性多発が多く、リスク診断の早期実用化が望まれている。そこで、胃粘膜DNAメチル化異常を用いたリスク診断については、他の研究費により、大規模な臨床試験を開始した。

慢性肝炎・肝硬変組織からの肝細胞がん発生のリスクを診断するために、正常肝組織と肝細胞がん症例の非がん肝組織でメチル化レベルが異なる25BACクローンを選択した。これらの25BACクローンにおける蛍光強度比の実測値を用いて階層的クラスタリングを行うと、学習セットの正常肝組織と肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を、誤りなく区別することができた。そこで、最適なカットオフ値を設定、14BACクローン以上において満たした場合、その検体は発がんリスクが高いとみなすことにした。この判定基準によっても、肝細胞がん症例の非がん肝組織を感度・特異度とも100%で、正常肝組織から区別できた。最後に、検証セットで確認したところ、この判定基準により、感度・特異度とも100%で、発がんリスクが高いと診断することができた。

がんの存在診断としては、DNAメチル化異常を用いた胃がんの存在診断を開発した。胃がん細胞株を用いて38個の候補遺伝子を選択、胃がんと健常者の胃粘膜とでメチル化レベルが最も異なる5遺伝子(*MINT25*、*GDNF*、*PRDM5*、*ADAM23*、*MLF7*)を同定した。次に、胃がん腫瘍部生検20検体、胃がん患者非がん部生検20検体、胃がん患者胃洗浄液20検体、健常者胃粘膜48検体、健常者胃洗浄液48検体を用

いて、これらの遺伝子のメチル化レベルを測定した。*MINT25*は最も優れたマーカー候補であり感度90%、特異度96%で胃がんを診断した。また、生検組織と胃洗浄液とのメチル化解析の結果はすべての5候補遺伝子において強く相関していた。

がんの病態診断として、昨年度まで、CIMPが神経芽細胞腫の予後診断に有用であることを示し、さらに別の症例群で検証してきた。今年度は、肝細胞がんの予後診断、多発性骨髄腫の薬剤反応性に取り組んだ。

肝切除後6ヶ月以内に再発を来し、1年以内に死亡した予後不良群と、肝切除後4年以上生存した予後良好群の間で、そのDNAメチル化状態が有意に異なる41BACクローンを同定した。多変量解析により、これらのBACクローンにおけるDNAメチル化状態は、肝切除標本で評価できる既に予後予測能力が知られている他の臨床病理学的な因子(組織学的分化度・門脈侵襲の有無・肝内転移の有無・多発性)とは独立した予後予測因子であることが示された。

多発性骨髄腫においてDNAメチル化により不活化されている遺伝子を網羅的に解析し、DNAメチル化の標的遺伝子を22個同定した。DNAメチル化される遺伝子の一つ、*RAS1*遺伝子は異常メチル化によりサイレンシングされていることが明らかになった。*RAS1*が異常メチル化されている多発性骨髄腫細胞株はデキサメサゾンに対する抵抗性を有し、DNAメチル化阻害剤によりデキサメサゾン感受性を増強することが出来た。

#### D. 考察

##### (1) DNAメチル化異常の誘発機構と低DNAメチル化の発がんにおける意義

DNAメチル化異常の発がんへの深い関与を考えると、その誘発機構の解明は急務である。DNAメチル化異常誘発の標的遺伝子の決定機構については、遺伝子低転写が重要であることが、ゲノムレベルで初めて明らかになった。低転写以外に、ヒストン修飾も重要であることを示唆する結果も得られており、来年度には、さらに詳細が解明されることが期待できる。DNAメチル化異常の誘発機構は、がん化に重要な遺伝子が不活化される機構として重要であるのみならず、メチル化プロファイル生成機構としても重要である。特定の発がん因子曝露によるメチル化プロファイル生成機構が解明されれば、分子疫学等への応用が期待できる。一方、*H. pylori*感染などDNAメチル化異常誘発には慢性炎症が深く関与する。しかし、DNAメチル化異常誘発に関与する具体的な炎症成分は不明であり、その同定のための動物モデルの開発を進めている。

グローバルなDNA低メチル化状態は、大腸、胃

と同様に、口腔においても腫瘍形成抑制的に作用すること、特に浸潤がんを抑制することが明らかとなった。この結果は、大腸、胃がんと同様であり、DNAメチル化は特に腫瘍の進展に関与していることを示す知見である。グローバルなDNA低メチル化が、個別の遺伝子サイレンシングの発生を抑制している可能性に加えて、細胞増殖活性を抑制している可能性、未分化細胞に対して分化促進作用を有する可能性を考えている。DNAメチル化修飾が消化管腫瘍発生の予防に応用可能であることを示唆する知見と考えられる。

##### (2) がんでのエピジェネティック異常の全体像の解明とがん抑制遺伝子の同定

*MiR-124a*及び*MiR-34b/c*がヒト胃がんでサイレンシングされることが明らかになった。*MiR-124a*はがん遺伝子*CDK6*を抑制することが知られており、さらに、今回、*MiR-34b/c*は*CDK6*及び*MET*を抑制することを示した。従って、これらのmiRNA遺伝子のサイレンシングは、胃がんのドライバーである可能性が高い。大腸がんではサイレンシングされるmiRNAについては、miRNAマイクロアレイを用いてその全貌の解析を進めており、来年度には詳細像が明らかになる予定である。さらに、miRNA以外の機能性RNAがDNAメチル化により不活化されている可能性もあり、今後さらに解析が必要と考えられる。

グローバルな低メチル化とCIMPの関連については、関連を認めないという報告と、今回のような関連を認めるという報告とがある。グローバルな低メチル化と繰返し配列の低メチル化とは相関するものの、完全に一致するわけではない。また、複数の種類がある繰返し配列の低メチル化が、全て同じように誘発されるのかも不明である。一方で、CIMPも、そのマーカーとするCpGアイランドの選択により、異なる像を呈することが知られる。今後は、グローバルな低メチル化とCIMPとを、より厳密に定義して解析する必要がある。

*p53*遺伝子は発がんにも最も重要な遺伝子とされる。しかし、*p53*遺伝子にはプロモーター領域CpGアイランドがなく、そのシグナルがエピジェネティックに不活化される可能性は低いと考えられていた。今回、*p53*の標的遺伝子の一つが*IGFBP7*であり、DNAメチル化異常によりサイレンシングされることを示した。このことは、*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不活化されることで、*p53*の機能が阻害されるという考え方を支持するものである。

##### (3) 診断的に有用なDNAメチル化異常の同定

DNAメチル化異常の診断的応用は、実用化段階を迎えている。従来開発を進めてきた胃粘膜のDNA

メチル化レベルを用いた発がんリスク診断は、前向き臨床試験（他の研究事業）へと移行した。また、肝細胞がんのリスク診断についても有用な BAC が得られてきており、今後、大規模な臨床試験へと移行するか否かの判断が必要である。

がんの存在診断に関しては、胃洗浄液を用いて胃がんの存在診断が行える可能性を示した。我が国の内視鏡医の診断能力の高さには定評があるが、判別困難な病変があることも事実である。また、胃がんはアジアで多いがんであるが、アジアの内視鏡医の診断能力が我が国のレベルに達していないことも事実である。通常は廃棄される胃洗浄液を用いた胃がんの存在診断が実用化されれば、価値は大きいと考えられる。胆道系腫瘍の DNA メチル化異常を用いた存在診断に関しては、標的となる DNA メチル化異常を探索中である。

神経芽細胞腫の予後診断は臨床応用に十分な精度があることがわかっており、臨床試験に伴う診断を実施している。肝細胞がん患者における予後予測も、これまでのところ既知の予後因子と独立であるなど、臨床的に高い有用性が得られている。肝細胞がん患者では局所治療に伴う肝機能低下があり、再発リスクに応じて治療計画を立てる必要がある。今後、日常臨床に応用可能か否かを、症例数を増やして検討する必要がある。また、臨床検査への移行を考え、BAC 内のどの配列のメチル化状態が変化したのかを解析している。

骨髄腫の治療経過中のデキサメサゾンへの反応性の低下は、臨床上問題となっている。今回、*RASD1* 遺伝子のメチル化が関与している可能性が示され、臨床検体での解析を精力的に進めているところである。臨床検体でもメチル化が認められ、デキサメサゾンへの反応性と関連していれば、5-aza-dC 等の脱メチル化剤との併用により治療効果が得られようになる可能性があり、臨床的意義は大きい。

## E. 結論

発がん因子曝露は遺伝子の発現抑制を通じて、特有のメチル化異常プロファイルを生成することが示唆された。非がん組織に蓄積した DNA メチル化異常は、胃がんのみならず、肝がんでも発がんリスクマーカーとして有望である。がんでの各種遺伝子の DNA メチル化異常は、がんの検出、及び、予後や薬剤反応性の診断に有用である。

## 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. Oka, D., Yamashita, S., Tomioka, T., Nakanishi, Y., Kato, H., Kaminishi, M., and Ushijima, T. The presence of aberrant DNA methylation in non-cancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers. *Cancer*, in press.
2. Ando, T., Yoshida, T., Enomoto, S., Asada, K., Tatematsu, M., Ichinose, M., Sugiyama, T., and Ushijima, T. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer*, 124: 2367-2374, 2009.
3. Nakajima, T., Yamashita, S., Maekita, T., Niwa, T., Nakazawa, K., and Ushijima, T. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae. *Int J Cancer*, 124: 905-910, 2009.
4. Terada, K., Okochi-Takada, E., Akashi-Tanaka, S., Miyamoto, K., Taniyama, K., Tsuda, H., Asada, K., Kaminishi, M., and Ushijima, T. Association between frequent CpG island methylation and HER2 amplification in human breast cancers. *Carcinogenesis*, 30: 466-471, 2009.
5. Ushijima, T. and Yamashita, S. Methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA). *Methods Mol Biol*, 507: 117-130, 2009.
6. Abe, M., Watanabe, N., McDonnell, N., Takato, T., Ohira, M., Nakagawara, A., and Ushijima, T. Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis. *Oncology*, 74: 50-60, 2008.
7. 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.
8. Sekine, S., Ogawa, R., Ito, R., Hiraoka, N., McManus, M.T., Kanai, Y., and Hebrok, M. Disruption of *Dicer1* induces dysregulated fetal gene expression and promotes hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, in press.
9. Sekine, S., Nakanishi, Y., Ogawa, R., Kouda, S., and Kanai, Y. Esophageal melanomas harbor frequent *NRAS* mutations unlike melanomas of other mucosal sites. *Virchows Archiv*, in press.

10. Arai, E., Ushijima, S., Fujimoto, H., Hosoda, F., Shibata, T., Kondo, T., Yokoi, S., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S., and Kanai, Y. Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome. *Carcinogenesis*, 30: 214-221, 2009.
  11. Ojima, H., Kanai, Y., Iwasaki, M., Hiraoka, N., Shimada, K., Sano, T., Sakamoto, Y., Esaki, M., Kosuge, T., Sakamoto, M., and Hirohashi, S. Intraductal carcinoma component as a favorable prognostic factor in biliary tract carcinoma. *Cancer Sci*, 100: 62-70, 2009.
  12. Kanai, Y. Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers. *Pathol Int*, 58: 544-558, 2008.
  13. Arai, E., Ushijima, S., Tsuda, H., Fujimoto, H., Hosoda, F., Shibata, T., Kondo, T., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S., and Kanai, Y. Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-comparative genomic hybridization: its association with DNA methylation alteration and patient outcome. *Clin Cancer Res*, 14: 5531-5539, 2008.
  14. Nara, S., Shimada, K., Kosuge, T., Kanai, Y., and Hiraoka, N. Minimally invasive intraductal papillary-mucinous carcinoma of the pancreas: clinicopathologic study of 104 intraductal papillary-mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 32: 243-255, 2008.
  15. Toyota, M., Suzuki, H., Yamashita, T., Hirata, K., Shinomura, Y., Tokino, T., and Imai, K. Cancer Epigenomics : Implications of DNA methylation in personalized therapy. *Cancer Sci*, in press.
  16. Yamamoto, E., Toyota, M., Suzuki, H., Kondo, Y., Sanomura, T., Murayama, Y., Ohe-Toyota, M., Maruyama, R., Nojima, M., Ashida, M., Fujii, K., Sasaki, Y., Hayashi, N., Mori, M., Imai, K., Tokino, T., and Shinomura, Y. LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in *Helicobacter pylori*-related enlarged fold gastritis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17: 2555-2564, 2008.
  17. 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, E., Imai, K., Shinomura, Y., and Tokino, T. Cytoplasmic RASSF2A is a proapoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 29: 1312-1318, 2008.
  18. Imai, T., Toyota, M., Suzuki, H., Akino, K., Ogi, K., Sogabe, Y., Kashima, L., Maruyama, R., Nojima, M., Mita, H., Sasaki, Y., Itoh, E., Imai, K., Shinomura, Y., Hiratsuka, H., and Tokino, T. Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 99: 958-966, 2008.
  19. Maehata, T., Taniguchi, H., Yamamoto, H., Noshio, K., Adachi, Y., Miyamoto, N., Miyamoto, C., Akutsu, N., Yamaoka, S., and Itoh, E. Transcriptional silencing of Dickkopf gene family by CpG island hypermethylation in human gastrointestinal cancer. *W J Gastroenterol*, 14: 2702-2714, 2008.
  20. 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.
- 本研究費に密接に関係するもの
21. Jones, PA., Baylin, SB., Bernsten, BE., Feinberg, AP., Greally, JM., Jenuwein, T., Jirtle, R., Ushijima, T., Pierotta, V., Allis, CD., Elgin, SC., Rine, J., and Wu, C. Moving AHEAD with an international human epigenome project. *Nature*, 454: 711-715, 2008.
  22. Kanai, Y. Overexpression of HDACs: a prognostic marker for gastric cancer identified by tissue microarray. *Lancet Oncol*, 9: 91-93, 2008.
  23. Kikuchi, R., Tsuda, H., Kozaki, K., Kanai, Y., Kasamatsu, T., Sengoku, K., Hirohashi, S., Inazawa, J., and Imoto, I. Frequent inactivation of a putative tumor suppressor, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer. *Cancer Res*, 68:5067-5075, 2008.
  24. Ochiai, H., Nakanishi, Y., Fukasawa, Y., Sato, Y., Yoshimura, K., Moriya, Y., Kanai, Y., Watanabe, M., Hasegawa, H., Kitagawa, Y., Kitajima, M., and Hirohashi, S. A new formula for predicting liver metastasis in patients with colorectal cancer: immunohistochemical analysis of a large series of 439 surgically resected cases. *Oncology*, 75: 32-41, 2008.
  25. Watanabe, Y., Kim, HS., Castoro, RJ., Chyng, W., Estecio, MR., Kondo, K., Guo, Y., Ahmed, SS., Toyota, M., Itoh, E., Suk, KT., Cho, MY., Shen, L., Jelinek, J., and Issa, JP. Sensitive and specific detection of early gastric cancer using DNA methylation analysis of gastric washing. *Gastroenterol*, in press.
  26. Toyota, M., Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., and Tokino, T. Epigenetic silencing of *microRNA-34b/c* and *BTG4* is

- associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res*, 68: 4123-4132, 2008.
27. Kawamura, Y.I., Toyota, M., Kawashima, R., Hagiwara, T., Suzuki, H., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., Kannagi, R., and Dohi, T. DNA hypermethylation contributes incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer. *Gastroenterol*, 135: 142-151, 2008.
  28. 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*, 68: 2670-2575, 2008.
  29. 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.
  30. Toyota, M., Kashima, L., and Tokino, T. CHFR as a potential anticancer target. *Cancer Drug Discovery and Development Checkpoint Response in Cancer Therapy*. pp163-176, Edited by Dai W, Humana Press, NJ, USA, 2008.
  31. Takagi, H., Sasaki, S., Suzuki, H., Toyota, M., Maruyama, R., Nojima, M., Yamamoto, H., Omata, M., Tokino, T., Imai, K., and Shinomura, Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol*, 43: 378-389, 2008.
  32. Sogabe, Y., Suzuki, H., Toyota, M., Ogi, K., Imai, T., Nojima, M., Sasaki, Y., Hiratsuka, H., and Tokino, T. Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 32: 1253-1261, 2008.
  33. 松林宏行. 臨床検体を用いた DNA メチル化検出とがん診断への応用. *最新医学*, 63: 802-810, 2008.
  34. 松林宏行, 小野裕之, 福富晃, Michael Goggins. 家族性腺癌. *Journal of Familial Tumors*, 8: 24-28, 2008.
2. 学会発表
1. Ushijima, T., Furuta, J., and Nobeyama, Y. Epigenetics of melanoma. International Pigment Cell Conference/International Melanoma Research Conference. Sapporo, May 2008.
  2. Ushijima, T. Epigenetics in neuroblastoma. *Advances in Neuroblastoma Research*, 2008.
  3. Ushijima, T. Epigenetic field defect, and cancer risk diagnosis. AACR Special Conference "Cancer Epigenetics". Boston, May 2008.
  4. Ushijima, T., Terada, K., Okochi-Takada, E., Asada, K., Watanabe, N., Hattori, N., and Miyamoto, K. Strong association between frequent DNA methylation and HER2 amplification in human breast cancers. 2nd AACR-JCA special joint conference, "The Latest Advances in Breast Cancer Research". Awaji, July 2008.
  5. Ushijima, T. Formation of epigenetic field for cancerization by environmental factors. The 2nd Shanghai Symposium of Epigenetics in Development and Diseases. Shanghai, July 2008.
  6. Ushijima, T., Nakajima, T., Ando, T., and Niwa, T. Epigenetic carcinogenic factors in the environment. 38th Annual Meeting of European Environmental Mutagen Society. Dubrovnik, September 2008.
  7. Ushijima, T., Niwa, T., and Ando, T. Epigenetic field for gastric cancerization, and its induction by Helicobacter pylori infection. ISOBM 2008, Tokyo, October 2008.
  8. Ushijima, T. Epigenetic field for gastric cancerization, and its induction by Helicobacter pylori infection. Peter MacCallum Cancer Centre Symposium "Cancer Epigenetics". Melbourne, October 2008.
  9. Ushijima, T. Epigenetic field for gastric cancerization, and its induction by Helicobacter pylori infection. Northeastern Asian Symposium on Cancer Epigenetics. Jeju, November 2008.
  10. Kanai, Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. Japan-Denmark Joint Workshop on "Molecular Cancer Research". Tokyo, January 2009.
  11. Kanai, Y. Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on genome-wide analysis of DNA methylation status. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Nagoya, October 2008.
  12. Kanai, Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions are inherited by cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. Northeast Asian Symposium 2008 "Cancer Epigenetics". Jeju, November 2008.
  13. Arai, E., Ushijima, S., Tsuda, H., Fujimoto, H., Hosoda, F., Shibata, T., Kondo, T., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S., and Kanai, Y. Regional

- DNA hypermethylation and copy number alterations during renal carcinogenesis. American Association for Cancer Research Special Conference "Cancer Epigenetics". Boston, May 2008.
14. 新井恵吏、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、金井弥栄 前がん状態におけるDNAメチル化プロファイルは通常型腎細胞がん継承されてその悪性度ならびに予後と相関する 第2回日本エピジェネティクス研究会年会 2008年5月
  15. Toyota, M. The role of DNA methylation changes in signaling pathway. AACR Special Conference on Cancer Research: Cancer Epigenetics. Boston, May 2008.
  16. Toyota, M. Epigenetic gene silencing and microRNA in human colon cancer. Symposium, 36th Congress of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. Tokyo, October 2008.
  17. 豊田実 大腸癌のシグナル経路異常におけるDNAメチル化の役割 第67回日本癌学会総会シンポジウム 2008年10月
  18. 豊田実 癌におけるエピジェネティックな異常の網羅的解析 第31回日本分子生物学会第81回日本生化学会合同年会 シンポジウム 2008年12月
  19. 豊田実 新規エピゲノム法の開発と消化器癌発生の分子機構 第5回日本消化管学会総会シンポジウム 2009年2月
  20. Watanabe, Y., Kim, HS., Castoro, RJ., Chung, W., Estecio, MR., Kondo, K., Guo, Y., Ahmed, SS., Toyota, M., Itoh, E., Suk, KT., Cho, MY., Shen, L., Jelinek, J., and Issa, JP. Discovering sensitive and specific methylation markers using gastric washes as a new diagnostic tool for early gastric cancer. AACR Cancer Epigenetics. Boston, May 2008.
  21. Watanabe, Y., Toyota, M., Itoh, E., and Issa, JP. DNA methylation analysis of gastric washes as a new molecular diagnostic tool for gastric cancer. 36<sup>th</sup> congress of the International Society of Oncology and Biomarkers (ISOBM)". Tokyo, October 2008.
  22. 渡邊嘉行、豊田実、伊東文生 胃洗浄液を用いたメチル化解析の胃癌診断への応用 第16回日本消化器病関連学会週間 2008年10月
  23. 渡邊嘉行、豊田実、伊東文生 遺伝子メチル化異常を用いた様々な消化管癌診断への応用 第5回日本消化管学会総会学術大会ワークショップ 2009年2月
  24. 渡邊嘉行、前畑忠輝、豊田実、伊東文生 胃洗浄液を用いた新たなメチル化解析の胃癌診断への応用 第5回日本消化管学会総会学術大会コアシンポジウム 2009年2月
  25. Yamada, Y. Role of DNA methylation in multistage colon carcinogenesis. Northeastern Asian Symposium on "Cancer Epigenetics". Jeju, November 2008.
  26. 山田泰広、原明、平田暁大、廣瀬善信、ルドルフ イーニッシュ、森秀樹 未分化性の維持と発がん 日本病理学会 97 回総会シンポジウム 2008年4月
  27. 山田泰広 The role of DNA methylation in carcinogenesis in digestive tract. 日本癌学会 67 回総会シンポジウム 2008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
    1. 金井弥栄、新井恵吏、廣橋説雄、稲澤譲治「BACクローンを用いる腎細胞癌の予後予測方法」(特願 2008-233491)
    2. 金井弥栄、新井恵吏、稲澤譲治「BACクローンを用いる肝細胞癌の発生リスク評価方法及び予後予測方法」(特願 2008-329872)
    3. 金井弥栄、新井恵吏、西山直隆、稲澤譲治「BACクローンを用いる尿路上皮癌の細胞癌の発生リスク評価方法及び予後予測方法」(2009年3月出願予定)
    4. 鈴木拓、豊田実、今井浩三、篠村恭久、時野隆至. 癌の検出方法および検出用キット、ならびに癌治療剤. 特願 2008-121671、平成 20 年 5 月 7 日出願
    5. Date of Filing: 15.05.07 Priority: JP/15.05.06/ JPA 2006134878. Title: Method for Detecting Disease-related Marker Using Gastric Mucosal Lavage Fluid. Designated States: AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL PL PT RO SE SK TR
  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

研究代表者 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 DNAメチル化異常は、ヒト発がんに関与するが、その誘発要因や誘発の分子機構に関しては不明の点が多い。本研究では、DNAメチル化異常の誘発機構を明らかにし、がん及び非がん部でのDNAメチル化異常を利用してがん抑制遺伝子の同定と臨床的に有用な診断方法の開発を行う。今年度は、がんでDNAメチル化されるCpGアイランドを大規模にスクリーニングし、がんでメチル化されやすい遺伝子は正常細胞で転写が低いことを示した。また、*H. pylori*による胃粘膜でのDNAメチル化異常誘発には、*H. pylori*自体よりも炎症が重要である可能性が高いことを示した。ヒト胃がんで*Mir-124a*のサイレンシングを見出した。神経芽細胞腫の予後診断は、前向き試験を継続した。

## 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。研究代表者は、DNAメチル化状態の違いに関するゲノム網羅的な解析法であるmethylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA)法を開発、本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；主にがん抑制遺伝子）と、がん化の結果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）とが存在する。ドライバーの同定が重要なことは明らかであるが、パッセンジャーや、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。

研究代表者は、ヒト胃がんの強力な誘発因子である*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)感染者の胃粘膜では、高度のDNAメチル化異常が蓄積していること、その量は発がんリスクと相関することを示してきた。最近、様々ながんで、非がん組織に蓄積したDNAメチル化異常が注目され、発がんリスク診断への応用が試みられている。また、DNAメチル化状態は遺伝子発現と比べて短期的変動が極めて少ないことを活用して、がんの悪性度・予後・治療感受性予測等の病態診断に用いることが出来る。研究代

表者は、複数のCpGアイランドがメチル化される性質（CpGアイランドメチル化形質；CIMP）をもつ神経芽細胞腫は予後不良であることも示した。CIMPは、既知の予後マーカーを上回る信頼性を示す。

本研究では、(1)DNAメチル化異常の誘発機構を明らかにすること、(2)特にゲノム網羅的なDNAメチル化変化の解析により、がん抑制遺伝子のサイレンシングを含めて、がんでのエピジェネティック異常の全体像を明らかにすること、(3)がんの診断マーカーとして役立つDNAメチル化変化を同定すること、を目的とする。

## B. 研究方法

## (1) スナネズミ、細胞株

スナネズミは、日本クレアから購入した。ヒト細胞株は、ATCCから購入またはJCRBから分与を受けた。

## (2) ゲノム網羅的なDNAメチル化解析

ゲノム網羅的なDNAメチル化解析には、脱メチル化剤処理後、発現マイクロアレイによりスクリーニングする方法、または、methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)-CpGアイランドマイクロアレイ法を使用した。MeDIP-CpGアイランドマイクロアレイ法は、ゲノムDNAを抗5-メチルシチジン抗体で免疫沈降したものを、ゲノム上の34,697カ所のCpGアイランドを搭載するアレイにハイブリダイズさせ、独自のアルゴリズムによりメチル化の程度を判定した。

## (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 H3Ac 抗体、H3K4me3 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) 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、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得て使用した。全ての動物実験は、国立がんセンターの動物実験倫理審査委員会の承認を得て、動物愛護に配慮して施行した。

C. 研究結果

(1) DNA メチル化異常の誘発機構

昨年度までに、*H. pylori* 感染者の胃粘膜では特定の遺伝子に DNA メチル化異常が誘発されていることを見出ししてきた。本年度は、特定の遺伝子に DNA メチル化異常が誘発される機構を明らかにするために、ヒトがん細胞株で高頻度にメチル化される遺伝子を、MeDIP-CpG アイランドマイクロアレイ法により大規模に分離した。前立腺がん細胞株 4 系統のうち何れかでメチル化される DNA メチル化高感受性プロモーター領域 CpG アイランド 521 個と、全くメチル化されない抵抗性 CpG アイランド 5,510 個を分離した。同様に、乳がん細胞株 3 系統で高感受性を示す 733 個と抵抗性を示す 5,430 個を分離した。前立腺がん・乳がんとも、高感受性遺伝子には正常細胞で転写レベルが低い遺伝子が有意に多く含まれ、低転写が DNA メチル化感受性に重要であることが示された。

*H. pylori* による DNA メチル化異常誘発の分子機構を解明するために、スナネズミに *H. pylori* を感染させ、感染後 50 週で除菌した。除菌後 1 週で、*H. pylori* は全く検出されなくなったにも関わらず、胃粘膜での DNA メチル化異常の誘発は持続していた。従って、*H. pylori* による DNA メチル化異常誘発には、菌自身ではなく、感染の結果誘発された炎症等が必要であると考えられた。

(2) がんでのエピジェネティック異常の全体像の解明とがん抑制遺伝子の同定

ヒト胃がんでの microRNA (miRNA) 遺伝子のメ

チル化サイレンシングは知られていなかった。そこで、他のがんでがん抑制作用が報告されており、プロモーター領域 CpG アイランドをもつ miRNA 遺伝子 6 個について、胃がんでのメチル化サイレンシングを検討した。その結果、1 つの miRNA をコードする 3 個の遺伝子 *MiR-124a-1*、*-2*、及び *-3* が、胃がん各遺伝子のプロモーター領域 CpG アイランドのメチル化によりサイレンシングされていることが明らかになった。*MiR-124a-1*、*-2*、及び *-3* は、28 個の胃がんのうち 11、23、及び 26 個でサイレンシングされており、分化型胃がんと未分化型胃がんとの頻度に差はなかった。

(3) 診断的に有用な DNA メチル化異常の同定

昨年度までに、*H. pylori* 感染陰性者では、胃粘膜 DNA メチル化レベルが、胃がんリスクと相関することを示してきた。本知見は、独立した研究グループにより、高い再現性が確認され、多くの発表がなされている。一方で、近年、内視鏡的胃粘膜剥離術後の異時性多発が多く、リスク診断の早期実用化が望まれている。そこで、胃粘膜 DNA メチル化異常を用いたリスク診断については、他の研究費により、大規模な臨床試験を開始した。

がんの病態診断として、CIMP が *MYCN* 遺伝子増幅よりも神経芽細胞腫の予後と強く関連することを示し、ドイツ人症例でも検証してきた。昨年度は、治療的応用の可能性を考え、DNA 脱メチル化剤と分化誘導剤の併用が、神経芽細胞腫細胞株の増殖抑制と分化誘導に相乗的な効果をもつことを示した。本年度は、臨床試験に際して得られる検体累積 95 例について CIMP の診断を行い、前向き試験を継続した。

D. 考察

DNA メチル化異常の発がんへの深い関与を考えると、その誘発機構の解明は急務である。DNA メチル化異常誘発の標的遺伝子の決定機構については、遺伝子低転写が重要であることが、ゲノムレベルで初めて明らかになった。低転写以外に、ヒストン修飾も重要であることを示唆する結果も得られており、来年度には、さらに詳細が解明されることが期待できる。がん化に重要な遺伝子が不活化される機構として重要であるのみならず、メチル化プロファイル生成機構としても重要である。特定の発がん因子曝露によるメチル化プロファイル生成機構が解明されれば、分子疫学等への応用が期待できる。また、DNA メチル化異常誘発に関与する炎症成分の同定も重要と考えており、そのための動物モデルの開発も進めている。

*MiR-124a* がヒト胃がんではサイレンシングされることが明らかになった。*MiR-124a* はがん遺伝子 *CDK6* を抑制することが知られる。従って、*MiR-124a*

のサイレンシングは、胃発がんのドライバーである可能性が高い。

DNA メチル化異常の診断的応用は、実用化段階を迎えている。従来開発を進めてきた胃粘膜の DNA メチル化レベルを用いた発がんリスク診断は、前向き臨床試験（他の研究事業）へと移行した。神経芽細胞腫の予後診断は臨床応用に十分な精度があることがわかっており、前向き試験を継続する予定である。

#### E. 結論

発がん因子曝露は遺伝子の発現抑制を通じて、特有のメチル化異常プロファイルを生成することが示唆された。非がん組織に蓄積した DNA メチル化異常はリスクマーカーとして、がんでの DNA メチル化異常は、がんの病態マーカーとして、有用である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Oka, D., Yamashita, S., Tomioka, T., Nakanishi, Y., Kato, H., Kaminishi, M., and Ushijima, T. The presence of aberrant DNA methylation in non-cancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers. *Cancer*, in press.
2. Ando, T., Yoshida, T., Enomoto, S., Asada, K., Tatematsu, M., Ichinose, M., Sugiyama, T., and Ushijima, T. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer*, 124: 2367-2374, 2009.
3. Nakajima, T., Yamashita, S., Maekita, T., Niwa, T., Nakazawa, K., and Ushijima, T. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae. *Int J Cancer*, 124: 905-910, 2009.
4. Terada, K., Okochi-Takada, E., Akashi-Tanaka, S., Miyamoto, K., Taniyama, K., Tsuda, H., Asada, K., Kaminishi, M., and Ushijima, T. Association between frequent CpG island methylation and HER2 amplification in human breast cancers. *Carcinogenesis*, 30: 466-471, 2009.
5. Ushijima, T. and Yamashita, S. Methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA). *Methods Mol Biol*, 507: 117-130, 2009.
6. Abe, M., Watanabe, N., McDonnell, N., Takato, T., Ohira, M., Nakagawara, A., and Ushijima, T. Identification of genes targeted by CpG island

methylation phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis. *Oncology*, 74: 50-60, 2008.

7. 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.

本研究費に密接に関係するもの

8. Jones, PA., Baylin, SB., Bernstein, BE., Feinberg, AP., Grealia, JM., Jenuwein, T., Jirtle, R., Ushijima, T., Pierotta, V., Allis, CD., Elgin, SC., Rine, J., and Wu, C. Moving AHEAD with an international human epigenome project. *Nature*, 454: 711-715, 2008.

##### 2. 学会発表

1. Ushijima, T., Furuta, J., and Nobeyama, Y. Epigenetics of melanoma. International Pigment Cell Conference/International Melanoma Research Conference. Sapporo, May 2008.
2. Ushijima, T. Epigenetics in neuroblastoma. *Advances in Neuroblastoma Research*, 2008. Chiba, May 2008.
3. Ushijima, T. Epigenetic field defect, and cancer risk diagnosis. AACR Special Conference "Cancer Epigenetics". Boston, May 2008.
4. Ushijima, T., Terada, K., Okochi-Takada, E., Asada, K., Watanabe, N., Hattori, N., and Miyamoto, K. Strong association between frequent DNA methylation and HER2 amplification in human breast cancers. 2nd AACR-JCA special joint conference, "The Latest Advances in Breast Cancer Research". Awaji, July 2008.
5. Ushijima, T. Formation of epigenetic field for cancerization by environmental factors. The 2nd Shanghai Symposium of Epigenetics in Development and Diseases. Shanghai, July 2008.
6. Ushijima, T., Nakajima, T., Ando, T., and Niwa, T. Epigenetic carcinogenic factors in the environment. 38th Annual Meeting of European Environmental Mutagen Society. Dubrovnik, September 2008.
7. Ushijima, T., Niwa, T., and Ando, T. Epigenetic field for gastric cancerization, and its induction by *Helicobacter pylori* infection. ISOBM 2008, Tokyo, October 2008.
8. Ushijima, T. Epigenetic field for gastric cancerization, and its induction by *Helicobacter pylori* infection. Peter MacCallum Cancer Centre Symposium "Cancer Epigenetics". Melbourne,

October 2008.

9. Ushijima, T. Epigenetic field for gastric cancerization, and its induction by Helicobacter pylori infection. Northeastern Asian Symposium on Cancer Epigenetics. Jeju, November 2008.
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
該当無し
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得  
該当無し

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

研究分担者 金井弥栄 国立がんセンター研究所病理部 部長

研究要旨

本研究事業では、BACアレイを基盤とするメチル化CpGアイランド増幅 (BAMCA)法で、ゲノム規模のDNAメチル化異常が、多段階発がん過程に前がん段階から寄与することを明らかにしてきた。本年度は、慢性肝炎・肝硬変症によって経過観察中の患者における発がんリスク評価、ならびに肝細胞がん患者における病態診断の、具体的な指標の確立を目指した。ウイルコクソン検定とパイオインフォマティクス処理により、そのDNAメチル化状態が慢性肝炎・肝硬変症を呈する肝組織から肝細胞がん組織へ継承され、かつ慢性肝炎・肝硬変症を呈する肝組織を正常肝組織から十分な感度と特異度を持って区別し得る、25BACクローンを同定した。25BACクローンを組み合わせ、学習セットの慢性肝炎・肝硬変症を呈する肝組織を、感度・特異度とも100%で前がん状態にあると判断し得る発がんリスク評価指標を設定した。同発がんリスク評価指標により、検証セットの慢性肝炎・肝硬変症を呈する肝組織を、感度・特異度とも100%で前がん状態にあると判断し得た。ウイルコクソン検定により、肝切除後6ヶ月以内に再発を来たし1年以内に死亡した予後不良群と、肝切除後4年以上生存した予後良好群の間で、そのDNAメチル化状態が有意に異なる41BACクローンを同定した。全肝細胞がん症例において、41BACクローンにおけるDNAメチル化状態は、無病生存率ならびに全生存率と有意に相関した。多変量解析により、41BACクローンにおけるDNAメチル化状態は、肝切除標本で評価できる既に予後予測能力が知られている他の臨床病理学的な因子（組織学的分化度・門脈侵襲の有無・肝内転移の有無・多発性）とは独立した、予後予測因子であることが分かった。上記指標を用いれば、慢性肝炎・肝硬変症によって経過観察中の患者における発がんリスク評価、ならびに肝細胞がん患者における予後予測が、実用化に近づくこと期待される。既に特許申請しており、速やかに前向き試験に着手することを目指したい。

A. 研究目的

本研究は、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、多段階発がん過程における DNAメチル化異常の意義の理解を進めることを目的としている。肝細胞がんについての解析には昨年度までに既に着手していたところであったが、本年度は特に、慢性肝炎・肝硬変症によって経過観察中の患者における発がんリスク評価、ならびに肝細胞がん患者における病態診断の、具体的な指標の確立を目指した。

B. 研究方法

非肝細胞がん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・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・同一症例より得られた肝細胞がん組織において、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

肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織では既に、非肝細胞がん症例より得られた慢性肝炎ないし肝硬変を伴わない正常肝組織に見られた個

体差や加齢の範囲を越えて、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。肝細胞がんにおいては、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増加し、DNA メチル化の減弱あるいは亢進の程度もさらに亢進した。この結果は昨年度にも既に確認していたが、本年度は、有用な診断指標を得るためにバイオインフォマティクス手法を付加した。

多段階発がん過程における DNA メチル化の変化には、種々のパターンが想定される。慢性肝炎ないし肝硬変の段階で正常肝組織に比し変化し、肝細胞がんにおいて旧に復する場合、その DNA メチル化の変化は、炎症や線維化を反映し、発がん過程そのものには寄与しない可能性がある。前がん状態では変化せず肝細胞がんにおいて変化する場合、その DNA メチル化異常は、がんの悪性進展に寄与する可能性がある。ここではまず、発がんリスク評価の指標を得るために、前がん状態において変化しその変化ががんにおいて維持される場合、ならびに前がん状態において変化し多段階発がん過程の進展に伴ってその変化がさらに亢進する場合に着目した。

すなわち、正常肝組織と肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織との間でウイルコクソン検定を行い、DNA メチル化状態に有意な差のある 512BAC クローンを抽出した。このうち肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織で DNA メチル化が亢進する BAC クローンは 265、DNA メチル化が減弱する BAC クローンは 247 あった。次に、DNA メチル化が亢進する 265BAC クローンについて、肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織と肝細胞がん組織の間でウイルコクソン検定を行ったところ、再度有意差のあった BAC クローンは 119、有意差のなかった BAC クローンは 146 であった。119BAC クローンのうち、正常肝組織から前がん状態にある肝組織を経て肝細胞がんへと段階的に DNA メチル化が亢進するのは、41BAC クローンであった。DNA メチル化が減弱する 247BAC クローンについて、肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織と肝細胞がん組織の間でウイルコクソン検定を行ったところ、再度有意差のあった BAC クローンは 116、有意差のなかった BAC クローンは 131 であった。116BAC クローンのうち、正常肝組織から前がん状態にある肝組織を経て肝細胞がんへと段階的に DNA メチル化が減弱するのは、40BAC クローンであった。以上より、前がん状態において DNA メチル化が変化しその変化が肝細胞がんにおいて維持される BAC クローン数は 277、前がん状態において DNA メチル化が変化し多段階発がん過程の進展に伴ってさらに変化する BAC クローン数は 81 とみなせる。合

計 358BAC クロウンを、発がんリスク評価指標の候補と考えた。

358BAC クロウンについて、サポートベクターマシンアルゴリズムによるスポットランキングを行い、正常肝組織と肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を十分な感度と特異度を持って区別することができる、上位 25BAC クロウンを選択した。これらの 25BAC クロウンにおける蛍光強度比の実測値を用いて階層的クラスタリングを行うと、学習セットの正常肝組織と肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を、誤りなく区別することができた。

25BAC クロウンそれぞれについて、学習セットの肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を正常肝組織から区別するための、感度と特異度が最大となるように、カットオフ値を設定した。このカットオフ値を用いた基準を 14BAC クロウン以上において満たした場合、その検体は発がんリスクが高いとみなすことにした。この判定基準により、学習セットにおける肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を感度・特異度とも 100% で発がんリスクの高いと診断することができる。

この判定基準の妥当性を検証するため、検証セットの非がん肝組織を評価した。14BAC クロウン以上で基準を満たし発がんリスクが高いとみなされた検体は、いずれも、肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織であった。14BAC クロウン未満で基準を満たし発がんリスクが低いとみなされた検体は、いずれも、正常肝組織であった。すなわちこの判定基準に基づく、検証セットの肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織も、感度・特異度とも 100% で、発がんリスクが高いと診断することができた。

次に肝細胞がん症例の予後予測指標を獲得するため、肝切除術後 4 年以上生存している症例を特に予後良好な群、肝切除術後半年以内に再発し 1 年以内に死亡した症例を特に予後不良な群と定義した。この 2 群間でウイルコクソン検定を施行し、DNA メチル化状態に有意な差のある 41BAC クロウンを抽出した。これらの 41BAC クロウンの蛍光強度比の実測値を用いて階層的クラスタリングを行うと、予後良好群と予後不良群を誤りなく区別することができた。

41BAC クロウンそれぞれについて、予後不良群を予後良好群から区別するための感度と特異度が最大となるように、カットオフ値を設定した。このカットオフ値を用いた基準を 32BAC クロウン以上において満たした症例は、32BAC クロウン未満において満たした症例より、無再発生存率が有意に低く、死亡例は全て 32BAC クロウン以上で判定基準を満たしていた。この判定基準は、肝細胞がん症例の予後予測指標になり得ると考えられた。

多変量解析により、この判定基準は、肝切除標本で評価できる、既に予後予測能力が知られている他の臨床病理学的な因子（組織学的分化度・門脈侵襲の有無・肝内転移の有無・多発性）とは独立した、予後予測因子であることが分かった。

#### D. 考察

我が国においては、B 型ならびに C 型肝炎ウイルス感染に基づく慢肝炎・肝硬変症・肝細胞がんの罹患率が、概して高い。アジアにおいては B 型肝炎ウイルスに対するワクチンが普及しているが、同ウイルスの持続感染期間は 50 年以上に及ぶので、肝細胞がんの罹患率低下を見るまでにはかなりの年月を要する。他方、我が国より遅れて C 型肝炎ウイルス感染の蔓延した米国等においては、間もなく訪れると予測される肝細胞がん罹患率上昇に備えることが、急務となっている。すなわち、肝炎ウイルス感染に基づく肝細胞がんの予防・治療に有益な知見を、我が国から発信する意義は大きい。

無症候の内に肝細胞がんを診断し、治癒切除等を目指すため、前がん段階でのサーベイランスは重要である。さらに近年は、肝炎の段階で、インターフェロン適応を決定するための肝生検が施行される。この生検標本を用いて将来の肝細胞がん発症リスクを予測できれば、慢性肝傷害の効果的な経過観察計画を策定し、肝細胞がんの予防・治療に結びつけ得ると期待される。前駆細胞の微小環境の影響を受け容易に変化すると理解される、mRNA 発現や蛋白発現と異なり、DNA メチル化プロファイルは共有結合により安定的に DNA 鎖上に保存されている。DNA メチル化プロファイルを指標とすれば、前がん段階における（確立したがんには比しては軽微な）変化をも、再現性をもって検出しようと期待される。本研究により、慢性肝炎・肝硬変症の段階における、発がんリスク指標を獲得し得たと期待される。未だ肝細胞がんを発症していない慢性肝炎・肝硬変症患者より得られた肝生検標本の供与を含め、多施設に前向き試験を提唱する基盤が整ったと考えられる。

さらに本研究では、肝切除標本で評価できる、既に予後予測能力が知られている他の臨床病理学的な因子（組織学的分化度・門脈侵襲の有無・肝内転移の有無・多発性）とは独立した、予後予測指標を獲得し得た。他方で肝細胞がん症例には、近年、肝動脈塞栓術等が多用され、肝切除術の機会はやや減少している。しかし、肝動脈塞栓術の前に採取される肝生検標本においても、今回獲得した指標を用い、同様に予後予測を行い得ると期待される。周知の如く肝細胞がんは再発を繰り返すが、慢性肝傷害患者においては肝予備能が乏しく、肝動脈塞栓術等でも反復すれば過大な負担となり得

るので、治療計画は厳密に策定する必要があり、予後予測の需要は大きい。「BAC クローンを用いる肝細胞癌の発生リスク評価方法及び予後予測方法」は特許申請済みであり(特願 2008-329872)、早期に前向き試験に着手したい。

現在、臨床病理学的に意義のあるゲノム領域の DNA メチル化異常が、前がん状態からがんになるまでに進展・拡大する状態を詳細に明らかにすることを旨とし、優れた診断指標となることが判明した BAC 領域等の広汎なパイサルファイトシーケンスを進めている。この過程で、BAC 単位ではなく、診断指標として特に優れている個々の CpG 部位が特定できれば、ミニアレイ等を適用しにくい微量検体において有益な発がんリスク評価指標をも確立できると見込まれる。B 型ならびに C 型肝炎ウイルス感染と、それぞれ有意に相関する DNA メチル化プロファイルを既に同定しており、B 型・C 型肝炎ウイルスが DNA メチル化異常を惹起する分子経路の理解の端緒としたい。さらに現在、門脈侵襲の有無などの肝細胞がんの悪性度とよく相関する DNA メチル化異常を示す BAC 領域に存在する候補遺伝子の、DNA メチル化と発現の状態を、組織検体ならびに脱メチル化剤処理した肝細胞がん細胞株において解析している。DNA メチル化で発現制御され、治療標的候補となる遺伝子を同定し得ると期待される。

## E. 結論

ゲノム規模の DNA メチル化異常が、肝多段階発がんの早期、すなわち前がん段階から寄与すると考えられる。ゲノム網羅的 DNA メチル化プロファイリングにより、発がんリスク評価指標・予後予測指標を確立しようと期待された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S and Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome. *Carcinogenesis*, 30: 214-221, 2009.
2. Ojima H, Kanai Y, Iwasaki M, Hiraoka N, Shimada K, Sano T, Sakamoto Y, Esaki M, Kosuge T, Sakamoto M and Hirohashi S. Intraductal carcinoma component as a favorable prognostic factor in biliary tract carcinoma. *Cancer Sci*, 100: 62-70, 2009.
3. Sekine S, Ogawa R, Ito R, Hiraoka N, McManus MT, Kanai Y and Hebrok M. Disruption of

Dicer1 induces dysregulated fetal gene expression and promotes hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, in press, 2009.

4. Sekine S, Nakanishi Y, Ogawa R, Kouda S and Kanai Y. Esophageal melanomas harbor frequent NRAS mutations unlike melanomas of other mucosal sites. *Virchows Archiv*, in press, 2009.
5. Kanai Y. Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers. *Pathol Int*, 58: 544-558, 2008.
6. Arai E, Ushijima S, Tsuda H, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S and Kanai Y. Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-comparative genomic hybridization: its association with DNA methylation alteration and patient outcome. *Clin Cancer Res*, 14: 5531-5539, 2008.
7. Nara S, Shimada K, Kosuge T, Kanai Y and Hiraoka N. Minimally invasive intraductal papillary-mucinous carcinoma of the pancreas: clinicopathologic study of 104 intraductal papillary-mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 32: 243-255, 2008.

本研究費に密接に関係するもの

1. Kanai Y. Overexpression of HDACs: a prognostic marker for gastric cancer identified by tissue microarray. *Lancet Oncol*, 9: 91-93, 2008.
2. Kikuchi R, Tsuda H, Kozaki K, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J and Imoto I. Frequent inactivation of a putative tumor suppressor, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer. *Cancer Res*, 68:5067-5075, 2008.
3. Ochiai H, Nakanishi Y, Fukasawa Y, Sato Y, Yoshimura K, Moriya Y, Kanai Y, Watanabe M, Hasegawa H, Kitagawa Y, Kitajima M and Hirohashi S. A new formula for predicting liver metastasis in patients with colorectal cancer: immunohistochemical analysis of a large series of 439 surgically resected cases. *Oncology*, 75: 32-41, 2008.

### 2. 学会発表

1. Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. Japan-Denmark Joint Workshop on "Molecular Cancer Research". Tokyo, January 2009.
2. Kanai Y. Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on genome-wide analysis of

- DNA methylation status. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Nagoya, October 2008.
3. Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions are inherited by cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. Northeast Asian Symposium 2008 "Cancer Epigenetics". Jeju, November 2008.
  4. Arai E, Ushijima S, Tsuda H, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S and Kanai Y. Regional DNA hypermethylation and copy number alterations during renal carcinogenesis. American Association for Cancer Research Special Conference "Cancer Epigenetics". Boston, May 2008.
  5. 新井恵吏、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、金井弥栄 前がん状態におけるDNAメチル化プロファイルは通常型腎細胞がん継承されてその悪性度ならびに予後と相関する 第2回日本エピジェネティクス研究会年会 2008年5月
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得  
金井弥栄、新井恵吏、広橋説雄、稲澤譲治「BACクローンを用いる腎細胞癌の予後予測方法」(特願2008-233491)  
金井弥栄、新井恵吏、稲澤譲治「BACクローンを用いる肝細胞癌の発生リスク評価方法及び予後予測方法」(特願2008-329872)  
金井弥栄、新井恵吏、西山直隆、稲澤譲治「BACクローンを用いる尿路上皮癌の細胞癌の発生リスク評価方法及び予後予測方法」(2009年3月出願予定)
  2. 実用新案登録  
該当なし。
  3. その他  
該当なし。

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

研究分担者 豊田 実 札幌医科大学内科学第一講座 教授

研究要旨

癌における DNA メチル化の役割を明らかにする目的で、ゲノムワイドなメチル化解析を行った。CIMP 陽性胃癌および大腸癌のジェネティック、エピジェネティック異常の関連を明らかにした。また、DNA メチル化は抗がん剤感受性を予測する分子マーカーとして重要であることが示唆された。microRNA の DNA メチル化は消化管癌の発生に重要な役割を果たすことが示唆された。

A. 研究目的

本研究では、がんにおける DNA メチル化の網羅的解析により、発がんに関与する新規遺伝子を同定し、がん化における役割を明らかにすることを目的とする。H19 年度までの研究で、WNT や Ras シグナル経路の負の制御遺伝子の不活化が発がんに重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。本年度は消化管癌における CIMP とジェネティック・エピジェネティックな異常の関連、DNA メチル化を指標とした抗がん剤感受性予測への応用、microRNA のエピジェネティックな異常に関して解析する。

B. 研究方法

DNA メチル化に関しては、Bisulfite sequencing 法および Bisulfite-pyrosequence 法により、遺伝子発現に関しては、Microarray 法、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、MTT アッセイにより解析した。

(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

胃がんにおける高メチル化とゲノムワイドな低メチル化の関係を解析する目的で、CIMP-high、CIMP-low、CIMP-negative 胃がん症例における LINE1 のメチル化レベルを解析した。その結果、

CIMP-low で有意に低メチル化 ( $P < 0.01$ )、また p53 変異を認める症例において有意に低メチル化 ( $P < 0.01$ ) を示した。胃がんにおいてはゲノムワイドな低メチル化は CIMP-low、p53 変異との関連を認め、ゲノムワイドな低メチル化により染色体不安定性、ジェネティックな異常が誘導されるパスイグウェイが存在することが示唆された。

CIMP 陽性大腸癌において、BRAF の変異を高率に認めるが、その原因は不明である。最近、BRAF-ERK-MEK 経路の活性化に伴って、IGFBP7 がネガティブフィードバックとして働き、BRAF 変異を有する細胞に細胞老化とアポトーシス誘導に関与することが報告された。われわれは、大腸癌における IGFBP7 のメチル化を検討したところ、CIMP-high 群に高頻度に見られたことから、BRAF 変異を起こした細胞が CIMP を獲得することで senescence を免れて癌化している可能性が考えられた。また、IGFBP7 は p53 の標的遺伝子であることを明らかにした。CIMP 陽性腫瘍において、p53 の変異が少ない原因の一つに、p53 標的遺伝子が DNA メチル化により不活化されることが原因である可能性が示唆された。

多発性骨髄腫において DNA メチル化により不活化されている遺伝子を網羅的に解析し、DNA メチル化の標的遺伝子を 22 個同定した。DNA メチル化される遺伝子の一つ、RASD1 遺伝子が異常メチル化によりサイレンシングされていることを明らかにした。RASD1 の異常メチル化が異常メチル化されている多発性骨髄腫細胞株はデキサメサゾンに対する抵抗性を有し、DNA メチル化阻害剤によりデキサメサゾン感受性を増強出来た。

これまで、大腸がんにおいて DNA メチル化によりサイレンシングされている microRNA を TaqMan PCR 法で解析し、mir-34b/c が大腸がん症例の 90%において異常メチル化されていること、