

201019019A( $\frac{1}{2}$ )

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

ヒトがんにおけるエピジェネティックな異常の  
解明と応用に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牛島 俊和

平成23年(2011)年 4月

1 / 2冊

## 目 次

### I 総括研究報告

- ヒトがんにおけるエピジェネティックな異常の  
解明と応用に関する研究 ..... 1  
牛島俊和 国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野

### 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 .....11  
牛島俊和 国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野
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 .....16  
金井弥栄 国立がん研究センター研究所分子病理分野
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 .....20  
豊田 実 札幌医科大学学生化学講座
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 .....23  
伊東文生 聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科
5. がん細胞DNAメチル化異常の起源解明 .....25  
山田泰広 京都大学iPS細胞研究所

### III 研究成果の刊行に関する一覧表 .....27

### IV 研究成果の刊行物・別刷り

総括研究報告書

ヒトがんにおけるエピジェネティックな異常の解明と応用に関する研究

研究代表者 牛島俊和 国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野 分野長

研究要旨

DNA メチル化異常は、ヒト発がんに関与する。本研究では、DNA メチル化異常誘発の要因や分子機構を明らかにすること、ゲノム網羅的な解析により DNA メチル化異常を解明、がんの本態を明らかにすること、臨床的に有用な診断方法の開発を行うことを目的としている。本年度は、遺伝子のメチル化異常誘発の感受性に、ゲノムの構造である SINE および LINE との距離が関与していること、そしてエピジェネティックな機構と独立して感受性に関与していることを明らかにした。また、胃粘膜での DNA メチル化異常誘発には、特定の慢性炎症が重要であることを明らかにし、DNA メチル化異常と発現が相関する炎症関連遺伝子を同定した。マウス大腸炎モデルにおいても、DNA メチル化異常と発現が相関する炎症関連遺伝子を同定した。マウス大腸腫瘍細胞に初期化因子を強制発現させることで、部分的にリプログラミングされた腫瘍細胞である T-iPSC 様細胞を樹立した。エピジェネティックにサイレンシングされる non-coding RNA の網羅的な同定法を開発した。腎細胞がんの悪性度を反映するような臨床病理学的因子と相関して DNA メチル化異常を示す CpG 部位を網羅的に同定した。胃洗浄廃液での DNA メチル化解析により、優れた感度・特異度で胃がんの存在を診断できる可能性を示し、前向き多施設臨床試験を進めた。神経芽細胞腫の予後診断を継続して実施している。

研究分担者

金井 弥栄 国立がん研究センター研究所  
分子病理分野・分野長  
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  
山田 泰広 京都大学 iPS 細胞研究所  
特定拠点教授

ル化異常が遺伝子プロモーター領域 CpG アイランド (CGI) 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。

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。

ゲノム網羅的な解析により見出された DNA メチ

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を見出してきた。

本研究では、(1) DNA メチル化異常誘発の要因や分子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解明してがんの本態を明らかにすること、(3) がんの診断マーカーとして臨床的に役立つ 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

Balb/c マウスは、日本チャールス・リバーから購入した。ヌードマウス、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 から分与をうけた。Balb/c マウス、あるいは家族性大腸腺腫症のモデルマウスである *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスに、強力な大腸発がんプロモーターである dextran sodium sulfate (DSS)を飲水投与して、大腸炎あるいは大腸腫瘍を誘発した。

### (2) iPSC に類似した腫瘍由来細胞 (T-iPSC 様細胞) の樹立、維持、分化誘導

7 週齢 *Apc<sup>Min/+</sup>* マウスに DSS (2%) を 1 週間飲水投与し、投与終了後 4 週後に屠殺、摘出した大腸腫瘍を初代培養し、レトロウイルスにより山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, Myc) を導入した。樹立した iPSC 様細胞から抽出した DNA における *Apc* 遺伝子の LOH を PCR-RFLP 法にて検索し、*Apc* LOH を有する T-iPSC 様細胞を同定した。T-iPSC 様細胞の維持は、多能性幹細胞の培養条件下で行った。T-iPSC 様細胞の分化誘導は、Leukemia Inhibitory Factor (LIF) および feeder 細胞の非存在下で行った。

### (3) 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) methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)-CGI マイクロアレイ法、2) ゲノムキャプチャーにより回収した CGI 由来 DNA を次世代シーケンサーを用いてバイサルファイトシーケンシングする方法、3) HumanMethylation27 BeadChip の、3 通りの方法を使い分けた。

MeDIP-CGI 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、34,697 カ所の CGI を搭載するアレイにハイブリダイズさせ、本研究内で独自に開発したアルゴリズム (Me value) によりメチル化の程度を判定した。

ゲノムキャプチャーは、ゲノム DNA を重亜硫酸処理し、2,076 個の CGI の標的配列由来の DNA を、完全メチル化された配列とメチル化されていない配列に対して作製したベイトを用いて回収することによって行った。回収した DNA はゲノムキャプチャーして得た DNA を次世代シーケンサー SOLiD (Life technologies 社) を用いてシーケンスした。

HumanMethylation27 BeadChip (Illumina 社) を用いた解析では、重亜硫酸処理したゲノム DNA を増幅後 27,578 CpG 部位が解析可能な BeadChip にハイブリダイズして、プライマー伸長反応後、BeadStation 500 スキャナ (Illumina) を用いてデータを取得した。

### (4) ゲノム領域特異的な DNA メチル化解析

重亜硫酸処理の後、シーケンシング法、methylation-specific PCR (MSP) 法、定量的 MSP 法、及び、pyrosequencing 法により解析した。

### (5) 遺伝子発現定量

定量的 RT-PCR 法により行った。

### (6) 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、Pol II 抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行った。網羅的解析では CGI マイクロアレイ (ChIP-chip) と次世代シーケンサー (ChIP-seq) を用いた。

### (7) 胃洗浄液の回収

通常内視鏡検査時の洗浄に使用する洗浄液量に合わせて特注した 250mL 採取管を用いて胃洗浄液を回収した。採取管の素材には洗浄廃液採取量の視認性を考慮して polyethylene terephthalate を用い、形状は DNA 回収時の遠心分離に対応できるものとした。採取管には 2 つの専用連結管を連結させ、すべての内視鏡装置の吸引口に適合するように新たに設計したコネクタを用いた。

### (8) 腫瘍形成能の解析

免疫不全マウス皮下での腫瘍形成能を検討するために、未分化培養条件、および分化誘導条件における T-iPSC 様細胞  $5 \times 10^6$  個をヌードマウスの皮下に移植した。皮下腫瘍は摘出後、腫瘍体積計測あるいは病理解析に供した。

### (9) 病理解析

組織は 24 時間緩衝ホルマリンにて固定し、パラフィンに包埋後、組織切片を作製、病理組織学的に検討した。組織切片は HE 染色および免疫染色にて検索した。

### (10) 統計解析

Kaplan-Meier 解析による予後解析、多変量ロジスティック回帰分析法による多変量解析を行った。網羅的に解析した腎組織におけるメチル化レベルと各

種臨床病理学的所見との関係の解析においては、主成分分析、Cumulative logit model 解析、Wilcoxon matched-pairs 解析、Jonckheere-Terpstra 傾向検定、Random forest 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要因や分子機構

##### 1-1 DNA メチル化異常誘発の標的遺伝子決定機構

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、メチル化異常誘発に抵抗性を示す遺伝子は有意に高レベルの転写活性型のヒストン修飾および Pol II 結合レベルを示すことを世界で初めて明らかにした。本年度は DNA メチル化異常誘発の遺伝子特異性におけるゲノム構造の影響について検討した。乳腺および前立腺のそれぞれ正常細胞およびがん細胞株について DNA メチル化感受性のプロモーターCGI 及び抵抗性のプロモーターCGI をゲノム網羅的に同定した。ゲノム上の散在する繰り返し配列である SINE 及び LINE 近傍の CGI は有意にメチル化抵抗性であることを確認した。組織非特異的な DNA メチル化異常誘発感受性について多変量解析を行い、SINE 及び LINE からの距離は、Pol II 結合や H3K27me3 修飾と同様に、他の因子と独立して DNA メチル化異常誘発の感受性に関与していることを明らかにした。

##### 1-2 各種炎症の DNA メチル化異常誘発能

昨年度までに、スナネズミモデルを用いて、ピロリ菌感染が DNA メチル化異常誘発の原因であること、DNA メチル化異常の誘発には菌自身ではなく、感染の結果誘発された炎症が重要であることを明らかにしてきた。本年度は、ピロリ菌感染以外の要因による炎症でも長期間持続すれば DNA メチル化異常が誘発されるのかを検討した。その結果、高濃度アルコールや高張食塩水の持続投与では、急性炎症が繰り返し誘発され、高度の細胞増殖が誘発されるにもかかわらず、解析した 8 個の CGI の DNA メチル化異常は誘発されなかった。従って、特定の慢性炎症が DNA メチル化異常の誘発に重要であることが示された。また、DNA メチル化異常誘発の程度と発現量が相関する炎症関連遺伝子として、*Il1b*, *Nos2*, *Tnf* の 3 遺伝子を見出した。

##### 1-3 マウス大腸炎モデルにおける DNA メチル化異

#### 常誘発に重要な遺伝子の同定

昨年度までにマウスに DSS を飲水投与した大腸炎モデルにおいて、誘発された腫瘍での DNA メチル化異常を同定、その異常は発がん先だつて大腸粘膜に誘発されていることを明らかにしてきた。本年度は、このモデルにおける DNA メチル化異常誘発に関連する炎症関連因子について検討した。DSS 投与及び非投与マウス大腸において 8 個の炎症関連遺伝子の発現量を比較したところ、DNA メチル化異常誘発の程度と発現量が相関した遺伝子として、*Ifng*, *Il1b*, *Nos2* を見出した。

#### 1-4 がん細胞エピジェネティック異常の起源解明のための腫瘍細胞のリプログラミング/再分化

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、胃腫瘍および口腔腫瘍発生を強く抑制すること、また、DNA メチル化が大腸腫瘍細胞の未分化状態および増殖状態の維持に関与することを明らかにしてきた。本年度は、iPS 細胞作製技術を用いることにより、腫瘍細胞のリプログラミング/再分化を行い、がん細胞におけるエピゲノム異常の起源および意義を明らかにすることを目的として研究を進めた。*Apc<sup>Min</sup>* マウス大腸腫瘍に山中 4 因子を強制発現させることで、形態的に iPSC に類似した細胞(T-iPSC 様細胞)を樹立した。

T-iPSC 様細胞では多能性幹細胞で発現が高い *Nanog* 発現は確認されなかったが、初代 iPSC のマーカーの一つである *Fbxo15* の発現が高いことが明らかとなった。また、T-iPSC 様細胞は、高いアルカリフォスファターゼ活性を持ち、多能性幹細胞に類似した性質を有していた。T-iPSC 様細胞を分化誘導培地にて培養すると、一部は *Cdx2* 陽性細胞へと分化した。また、分化した T-iPSC 様細胞の継代を繰り返すことにより細胞増殖能が徐々に亢進し、免疫不全マウス皮下での造腫瘍能を獲得した。T-iPSC 様細胞の持続培養過程において新たな遺伝子変異を獲得していないと仮定すると、T-iPSC 様細胞の持続培養における変化は造腫瘍能獲得に関わるエピジェネティック修飾変化に相当すると考えられる。

#### (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

##### 2-1 エピジェネティックにサイレンシングされる non-coding RNA の網羅的同定法の開発

昨年度までに、がんでは異常 DNA メチル化によりサイレンシングされる microRNA のスクリーニングを行い、大腸がん、胃がん、乳がんにおいて microRNA-34b/c の異常 DNA メチル化が認められることを報告してきた。microRNA の前駆体は、しばしば成熟型 microRNA の数 10kB 上流から転写され、エピジェネティックな異常の解析においては、転写開始点を正確に把握して、DNA メチル化解析を行う

ことが重要である。昨年度までの研究で、ゲノムワイドな転写開始点のマッピングを行うため、H3K4me3を認識する抗体で免疫沈降後、次世代シーケンサーを用いて転写開始点の網羅的解析を行った。その結果、DNMT1およびDNMT3Bをノックアウトした細胞(DKO)において、約25,000個のH3K4me3の新規のピークを認めた。

本年度は、独自にビューアの作成を行い、ヒストン修飾と遺伝子の関連を可視化することを可能にし、特にmicroRNAに関してより詳細な解析を行った。その結果、ゲノムの174カ所の領域における233個のmicroRNA前駆体に、HCT116細胞では認められず、DKO細胞特異的なH3K4me3のピークを認めた。これらのピークの中には、従来のプロモーターアレイでは同定出来なかった、新たなDNAメチル化の標的microRNAが存在した。そのうち、47個のmicroRNAがDKO細胞で発現上昇していた。さらにその中で22個がmicroRNA前駆体の第一エクソン5kb以内にCGIを有し、全てがDNAメチル化によりサイレンシングされていた。これらのCGIにおけるDNAメチル化によりmicroRNAの発現がコントロールしていると考えられる。

同定されたDNAメチル化によりサイレンシングされるマイクロRNAの一つである、miR-1-1は76%の大腸がん組織でメチル化を認めた。一方、正常大腸組織ではメチル化レベルは非常に低く、便や血清からの大腸がんのスクリーニングに有用である可能性が示唆された。MiR1-1を、大腸がん細胞株に強制的に発現させ、Gene Ontology解析を行うと、特に有意に発現が低下した遺伝子は、細胞の接着や細胞運動に関与する遺伝子であった。実際、miR1-1を過剰発現させた細胞では、細胞運動が遅く、遊走も阻害されていた。miR1-1が抑制されることが、がん細胞の転移や浸潤を引き起こしている可能性が示唆された。

## 2-2 数千個レベルのCGIのバイサルファイトシーケンシング法の開発

1塩基レベルでのDNAメチル化解析には、バイサルファイトシーケンシング解析が必要であるが、ゲノム網羅的な解析は容易ではなかった。最近、特定のゲノムの領域をRNAオリゴヌクレオチドでキャプチャーする方法が開発された。そこで、この方法と次世代シーケンサーを組み合わせた方法で、遺伝子発現に重要なCGIの解析を試みた。重亜硫酸処理の後、無作為に選んだCGI 1,976個と、メチル化されていることが知られるCGI 100個の標的配列についてゲノムキャプチャーを行い、回収したDNAを次世代シーケンサーを用いてシーケンシングした。この解析で、選択した2,076遺伝子中1,849個(89%)の遺伝子について50回以上カバーレージで解析可能であった。

## (3) 診断的に有用なDNAメチル化異常の同定 3-1 腎細胞癌の各種診断マーカー同定のための網羅的DNAメチル化解析

発がんリスク診断としては、これまでに、*H. pylori*感染陰性者では、胃粘膜DNAメチル化レベルが胃発がんリスクと相関することを示してきた。早期実用化のため、胃粘膜DNAメチル化異常を用いたリスク診断については、平成20年度から他の研究費により、大規模な臨床試験を開始した。また、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マーカーの評価を進めてきた。

本年度は、網羅性の高い解析であるHumanMethylation27を施行して、DNAメチル化異常を介して腎細胞がんの発生に関与する遺伝子の同定を目指した。正常腎組織と前がん状態にある腎組織の間で、DNAメチル化率に有意な差のある4,830個のCpG部位を同定した。また、正常腎組織・前がん状態にある腎組織・腎細胞がん組織の3群間に、一定の順序性・傾向性をもって変化を認める11,093個のCpG部位を同定した。これらにおけるDNAメチル化状態は、前がん状態において正常腎組織に比し既に変化しており、腎細胞がんへの進展に伴ってさらに同じ方向に変化すると考えられた。同一症例から得られた非がん腎組織と腎細胞がん組織の間では、10,874個のCpG部位におけるDNAメチル化状態が両者の間で有意に異なっていた。これら全ての検定で有意となった801個のCpG部位においては、前がん状態において正常腎組織に比してDNAメチル化状態が変化し、その変化がさらに亢進して腎細胞がんの発生に関与する可能性があると考えられた。

さらに、腫瘍径・肉眼型・組織学的異型度・腎静脈本幹腫瘍栓の有無・静脈侵襲の有無・発育様式・壊死の有無・診断時の病期とそのDNAメチル化状態が有意に相関した246個のCpG部位を同定した。これらの中に、DNAメチル化異常を介して腎細胞がんの臨床病理学的悪性度を規定するCpG部位の候補が存在すると考えられた。

## 3-2 胃洗浄廃液由来DNAを用いた胃がんの存在診断

がんの存在診断としては、通常内視鏡検査・治療時に発生する胃洗浄廃液由来DNAを用いた、DNAメチル化異常検出による胃がんの存在診断の開発を継続した。本年度までに、40症例による予備試験登録を終了した。4候補遺伝子(MINT25, SOX17, miR-34b/c, ACMGI)を用いたDNAメチル化定量解析の結果、症例の約8割が治療前において高メチル化を示し、治療後にそのメチル化レベルに有意な低下を示した。また、北海道大学光学診療部を中心とした多施設共同試験グループ(SGIST: Sapporo GI Study Team)による採択を受け、早期胃がんに対する内視鏡治療症例300症例を対象に治療前後および、

1年おきの胃洗浄廃液を5年後まで回収し、再発予測診断プログラムの構築をエンドポイントにおいた前向き試験を進めた。

### 3-3 CIMPによる神経芽細胞腫の予後診断

がんの病態診断として、昨年度までに、CIMPが神経芽細胞腫の予後診断に有用であることを示してきた。本年度は、CIMPによる神経芽細胞腫の予後診断の前向き試験を継続し、検体累積184例についてCIMPの診断を行った。

## D. 考察

### (1) DNAメチル化異常の誘発要因や分子機構

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。異常の標的となる遺伝子は、前年度までに証明したエピジェネティックな機構に加えて、ゲノムの構造であるSINEおよびLINEとの距離により決定されていることを解明し、両者は独立して関与していることも明らかにした。この機構はメチル化プロファイル生成機構の重要な一部と考えられる。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できれば、分子疫学等への応用が期待できる。

DNAメチル化異常誘発に特定の慢性炎症が重要であることが明らかになった。今後は関与する炎症成分の特定が重要な課題である。DSS投与マウス大腸の系を活用し、各種炎症性サイトカイン等のノックアウトマウスを用いて同様の実験を行うことにより、DNAメチル化異常に重要な炎症成分が特定できると考えられる。DNAメチル化異常誘発に関与する成分が明らかになれば、その抑制による新たな疾患予防戦略が立てられる。

マウス大腸腫瘍細胞に初期化因子を強制発現させることで樹立されたT-iPSC様細胞は、形態的な類似性のみならず、多能性幹細胞関連遺伝子の発現などにも類似性が確認され、部分的にリプログラミングされた細胞であることが示唆された。腫瘍細胞のエピジェネティック修飾状態に変化を誘導できたと考えられる。また、T-iPSC様細胞は分化状態で継代を繰り返すことで、細胞増殖能の亢進、造腫瘍能の獲得が認められた。今後、得られたそれぞれの細胞のDNAメチル化を主にエピジェネティック修飾変化を解析する。これにより、造腫瘍能獲得に関わるエピジェネティック修飾変化を同定できる可能性があると考えられる。

### (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

転写開始点の指標となるH3K4me3についてゲノム網羅的にマッピングを行い、エピジェネティックにサイレンシングされるmicroRNAを従来より効率よく同定することが出来た。エピジェネティックに

サイレンシングされるnon-coding RNAの網羅的な同定法として有用と考えられる。また、本法で同定したmiR-1はがん抑制的に働くmicroRNAの候補と考えられる。さらに、ゲノムキャプチャーを用いたバイサルファイトシーケンス法は、数千個のCGIを同時に1塩基レベルで解析可能であり、有用な方法と考えられた。

### (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。既の前向き臨床試験(他の研究事業)へと移行した胃がんのリスク診断に加え、肝細胞がんのリスク診断についても有用なDNAメチル化マーカーセットが得られている。本年度は、腎細胞がんについて、従来法に比して定量性ならびに網羅性に優れたDNAメチル化解析法を導入して解析した。従来の解析によって示唆されていたように、腎細胞がん症例より得られた非がん腎組織においては、組織学的に特記すべき所見を示さなくても、DNAメチル化異常が蓄積していることが確認された。前がん状態において既に起こり、腎細胞がんへと継承されるような、即ちリスクを反映するようなDNAメチル化異常が、エピジェネティックな異常をさらに誘導し、腎細胞がんの悪性度を規定する可能性が示された。また、腎細胞がんの悪性度を反映するような臨床病理学的因子とよく相関するDNAメチル化異常を示す、CpG部位が多数同定された。DNAメチル化異常と、このCpG部位近傍の遺伝子発現との相関を確認し、機能解析等を付加することによって、DNAメチル化異常を介して腎発がんに寄与し創薬標的候補となる遺伝子を絞り込む予定である。

がんの存在診断に関しては、通常の内視鏡検査時には破棄している胃洗浄廃液を用いてエピジェネティック異常を検出することが有用であることが強く示唆された。開始した前向き多施設臨床試験を継続することで、臨床応用へ向けた大きな一歩となる可能性が考えられた。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。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、侵襲度の非常に低い新たな検査法として価値は大きい。

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継続して実施している。

## E. 結論

公衆衛生上重要なDNAメチル化異常の誘発機構の解明を進めた。がんでの各種遺伝子のDNAメチル化異常の解明は、本態解明に加えて、がんの検出、病態、及び、予後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. Hur K, Niwa T, Toyoda T, Tsukamoto T, Tatematsu M, Yang HK and Ushijima T. Insufficient role of cell proliferation in aberrant DNA methylation induction, and involvement of specific types of inflammation. **Carcinogenesis**, 32: 35-41, 2011.
2. Gyobu K, Yamashita S, Matsuda Y, Igaki H, Niwa T, Oka D, Kushima R, Osugi H, Lee S, Suehiro S and Ushijima T. Identification and validation of DNA methylation markers to predict lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinomas. **Ann Surg Oncol**, 18: 1185-1194, 2011.
3. Yoshida T, Yamashita S, Takamura-Enya T, Niwa T, Ando T, Enomoto S, Maekita T, Nakazawa K, Tatematsu M, Ichinose M and Ushijima T. *Alu* and *Sata* hypomethylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae. **Int J Cancer**, 128: 33-39, 2011.
4. Ushijima T and Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Sci**, 101: 300-305, 2010.
5. Takeshima H and Ushijima T. Methylation destiny: Moira takes account of histones and RNA polymerase II. **Epigenetics**, 5: 89-95, 2010.
6. Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M and Ushijima T. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. **Cancer Res**, 70: 1430-1440, 2010.
7. Tomita H, Hirata A, Yamada Y, Hata K, Oyama T, Mori H, Yamashita S, Ushijima T and Hara A. Suppressing effect of global DNA hypomethylation on gastric carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 31: 1627-1633, 2010.
8. Ishii G, Hashimoto H, Asada K, Ito T, Hoshino A, Fujii S, Kojima M, Kuwata T, Harigaya K, Nagai K, Ushijima T and Ochiai A. Fibroblasts associated with cancer cells keep enhanced migration activity after separation from cancer cells: a novel character of tumor educated fibroblasts. **Int J Oncol**, 37: 317-325, 2010.
9. Nakajima T, Enomoto S, Yamashita S, Ando T, Nakanishi Y, Nakazawa K, Oda I, Gotoda T and Ushijima T. Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. **J Gastroenterol**, 45: 37-44, 2010.
10. Nagashio R, Arai E, Ojima H, Kosuge T, Kondo Y and Kanai Y. Carcinogenetic risk estimation based on quantification of DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage. **Int J Cancer**, in press.
11. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J and Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. **Carcinogenesis**, 32: 462-469, 2011
12. Arai E and Kanai Y. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. **Int J Clin Exp Pathol**, 4: 58-73, 2011.
13. Arai E, Wakai-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 renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. **Pathobiology**, 78: 1-9, 2011.
14. Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J and Kanai Y. Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. **J Biomed Biotechnol**, 2011: 780836, 2011.
15. Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers. **Cancer Sci**, 101: 36-45, 2010.
16. Arai E and Kanai Y. DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. **Epigenomics**, 2: 467-481, 2010.
17. Nishiyama N, Arai E, Chihara Y, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S and Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage. **Cancer Sci**, 101: 231-240, 2010.
18. Kamimae S, Yamamoto E, Yamano H, Nojima M, Suzuki H, Ashida M, Hatahira T, Sato A, Kimura T, Yoshikawa K, Harada T, Hayashi S, Takamaru H, Maruyama R, Kai M, Nishikawa M, Sugai T, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K and Toyota M. Epigenetic alteration of DNA in



- mucosal wash fluid predicts invasiveness of colorectal tumors. **Cancer Prev Res**, 4: 674-683, 2011.
19. Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, Akashi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Sugai T, Shen L, Issa J, Shinomura Y, Tokino T and Toyota M. IGFBP7 is p53 responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. **Carcinogenesis**, 31: 342-349, 2010.
  20. Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano H, Yoshikawa K, Kimura T, Kudo T, Harada E, Sugai T, Takamaru H, Niinuma T, Maruyama R, Yamamoto H, Tokino T, Imai K, Toyota M and Shinomura Y. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. **Carcinogenesis**, 31: 2066-2073, 2010.
  21. Yamashita M, Toyota M, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto E, Kamimae S, Watanabe Y, Kai M, Akashi H, Maruyama R, Sasaki Y, Yamano H, Sugai T, Shinomura Y, Imai K, Tokino T and Itoh F. DNA methylation of interferon regulatory factors in gastric cancer and noncancerous gastric mucosae. **Cancer Sci**, 101: 1708-1716, 2010.
  22. Fujikane T, Nishikawa N, Toyota M, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Ashida M, Ohe-Toyota M, Kai M, Nishidate T, Sasaki Y, Ohmura T, Hirata K and Tokino T. Genomic Screening for genes upregulated by demethylation identified novel targets of epigenetic silencing in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, 122: 699-710, 2010.
  23. Igarashi S, Suzuki H, Niinuma T, Shimizu H, Nojima M, Iwaki H, Nobuoka T, Nishida T, Miyazaki Y, Takamaru H, Yamamoto E, Yamamoto H, Tokino T, Hasegawa T, Hirata K, Imai K, Toyota M and Shinomura Y. A novel correlation between genome-wide hypomethylation and malignancy of gastrointestinal stromal tumor. **Clin Cancer Res**, 16: 5114-5123, 2010.
  24. Sakai H, Yamada Y, Shimizu M, Saito K, Moriwaki H and Hara A. Genetic ablation of Tnf alpha demonstrates no detectable suppressive effect on inflammation-related mouse colon tumorigenesis. **Chem Biol Interact**, 184: 423-430, 2010.
  25. Yamada Y, Aoki H, Kunisada T and Hara A. Rest promotes the early differentiation of mouse ESCs but is not required for their maintenance. **Cell Stem Cell**, 6: 10-15, 2010.
- 本研究費に密接に関係するもの
1. Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Hareyama N, Imai S, Narita M, Torigoe K, Niikura K, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Ushijima T and Suzuki T. Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. **Hippocampus**, 21: 127-132, 2011.
  2. Ushijima T, Okochi-Takada E and Takeshima H. Epigenomic analysis in toxicology. In: Handbook of Systems Toxicology. ed. Casciano DA and Sahu SC. John Wiley & Sons, West Sussex, 489-507, 2011.
  3. Herceg Z and Ushijima T. Introduction: Epigenetics and cancer. **Adv Genet**, 70: 1-23, 2010.
  4. Niwa T and Ushijima T. Induction of epigenetic alterations by chronic inflammation and its significance on carcinogenesis. **Adv Genet**, 71: 41-56, 2010.
  5. Ikegami D, Narita M, Imai S, Miyashita K, Tamura R, Takagi S, Yokomizo A, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Kuzumaki N, Ushijima T and Suzuki T. Epigenetic modulation at the CCR2 gene correlates with the maintenance of behavioral sensitization to methamphetamine. **Addict Biol**, 15: 358-361, 2010.
  6. Kuzumaki N, Ikegami D, Imai S, Narita M, Tamura R, Yajima M, Suzuki A, Miyashita K, Niikura K, Takeshima H, Ando T, Ushijima T and Suzuki T. Enhanced IL-1 $\beta$  production in response to the activation of hippocampal glial cells impairs neurogenesis in aged mice. **Synapse**, 64: 721-728, 2010.
  7. Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Sasaki T, Niikura K, Narita M, Miyashita K, Imai S, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Ushijima T and Suzuki T. Hippocampal epigenetic modification at the doublecortin gene is involved in the impairment of neurogenesis with aging. **Synapse**, 64: 611-616, 2010.
  8. Hattori N and Ushijima T. Analysis of gene-specific DNA methylation. In: Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. ed. Tollefsbol T. Academic Press, England, pp125-134, 2010.
  9. Kanai Y and Arai E. DNA methylation status in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. In: Molecular Genetics of Liver Neoplasia. ed. Grisham JW and Thorgeirsson S. Springer, New York, pp147-159, 2010.
  10. Sugai T, Habano W, Jiao YF, Toyota M, Suzuki H,

- Tsukahara M, Koizuka H, Akasaka R, Koeda K, Wakabayashi G and Suzuki K. Molecular analysis of single isolated glands in gastric cancers and their surrounding gastric intestinal metaplastic mucosa. **Oncol Rep**, 23: 25-33, 2010.
11. Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A and Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. **Oncogene**, 29: 3723-3731, 2010.
  12. Sugai T, Habano W, Endoh M, Konishi Y, Akasaka R, Toyota M, Yamano H, Koeda K, Wakabayashi G and Suzuki K. Molecular analysis of gastric differentiated-type intramucosal and submucosal cancers. **Int J Cancer**, 127: 2500-2509, 2010.
2. 学会発表
1. Ushijima T. Induction of epigenetic alterations by *H. pylori*-induced inflammation. AACR Annual Meeting. Washington, D.C., April, 2010. (chair, invited)
  2. Ushijima T and Takeshima H. Methylation destiny: aberrant DNA methylation targets genes defined by stalled RNA polymerase II, histone modifications, and distance to repetitive sequences. Korean Society of Biochemistry and Molecular Biology. Seoul, May, 2010. (invited)
  3. Ushijima T. Cancer epigenome: Translation into preventiv, diagnostic, and therapeutic targets. Korean National Cancer Center Symposium. Seoul, May, 2010. (invited)
  4. Ushijima T. Critical role of *H. pylori*-triggered inflammation in the formation of an epigenetic field for gastric cancers. Seoul International Gastric Cancer Symposium. Seoul, June, 2010. (invited)
  5. Ushijima T. Induction of aberrant DNA methylation by *H. pylori* infection-triggered inflammation. 5th Asian Epigenome Meeting. Jeju, June, 2010. (invited)
  6. Ushijima T. Epigenetic field defect in the stomach: formation by inflammation due to *Helicobacter pylori* infection and use as a cancer risk marker. 3rd Annual Scientific Meeting of Singapore Gastric Cancer Consortium. Singapore, July, 2010. (invited)
  7. Hattori N, Okochi-Takada E, Takeshima H, Wakabayashi M, Yamashita S and Ushijima T. Screening of promoter CpG islands methylated in human mammary epithelial cells. NSFC A3 foresight program 2010 seminar. Beijing, September, 2010.
  8. Ushijima T. Epimutation induction by environmental factors, such as *H. pylori* infection and smoking. Symposium at Annual Meeting of Environmental Mutagen Society. Fortworth, October, 2010. (invited)
  9. Shigematsu Y, Niwa T, Ichinose M and Ushijima T. Current status of our research to identify CpG islands whose DNA methylation status is associated with the presence of lymph node metastases of gastric cancers. NSFC A3 Foresight Program 2010 Seminar. Beijing, October, 2010.
  10. Ushijima T. Critical role of inflammation triggered by *H. pylori* infection in methylation induction. 41st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Tokyo, November, 2010. (organizer, invited)
  11. Ushijima T. Epigenome damage by the environment. Howard Hughes Medical Institute "Unraveling epigenomes in health and disease" Workshop. Washington, D.C., December, 2010. (invited)
  12. Hattori N, Okochi-Takada E, Kikuyama M, Wakabayashi M, Yamashita S, Watanabe N and Ushijima T. Identification of five genes with promoter methylation in rat mammary carcinomas by a combination of DNA methylation microarray and expression microarray. XVIIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat. Kyoto, December, 2010.
  13. 牛島俊和 International Human Epigenome Consortiumの現況 文科省政策研究所シンポジウム 2010年4月
  14. 牛島俊和 国際ヒトエピゲノムコンソーシアムの状況と環境エピゲノミクス 環境エピゲノミクス研究会 2010年7月
  15. 丹羽 透、豊田武士、塚本徹哉、森 明子、許根、立松正衛、牛島俊和 DNA 脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine による *Helicobacter pylori* 感染 N-methyl-N-nitrosourea 誘発スナネズミ胃がんの予防 第 25 回発癌病理研究会 2010 年 8 月
  16. Ushijima T Cancer risk diagnosis based upon accumulation of epigenomic damage 第 69 回日本癌学会学術総会 international session 2010 年 9 月
  17. Niwa T, Toyoda T, Tsukamoto T, Mori A, Hur K, Tatematsu M and Ushijima T Prevention of gastric cancers associated with *Helicobacter pylori* infection by a DNA demethylating reagent 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月
  18. 山下 聡、形部 憲、高橋 智、松田恭典、牛

- 島俊和 過剰なテストステロンは前立腺に異常DNAメチル化を誘発する 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月
19. 大河内(高田)江里子、塚本徹哉、若林美香、山村義孝、立松正衛、牛島俊和 *ANGPTL4* はヒト胃がんにおいてプロモーターCpGアイランドのメチル化により不活化を受けるがん抑制遺伝子である 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月
  20. Ushijima T Aberrant DNA methylation in solid tumors: implications to epigenetic therapy 日本血液学会シンポジウム 2010年9月
  21. 牛島俊和 がんにおけるDNAメチル化異常とその診断応用 日本癌治療学会-癌学会合同シンポジウム 2010年10月
  22. 牛島俊和 Induction mechanisms of aberrant DNA methylation. 日本色素細胞学会 2010年11月
  23. 牛島俊和 Gene-specific induction of aberrant DNA methylation by *Helicobacter pylori* infection. 東大分生研シンポジウム 2010年11月
  24. 大河内(高田)江里子、若林美香、牛島俊和 *ANGPTL4* は血管新生抑制を介してヒト胃がんの進展抑制遺伝子として機能する 第33回日本分子生物学会 2010年12月
  25. Kanai Y. Carcinogenetic risk estimation and prognostication of patients with cancers based on DNA methylation profiles. 2010 Annual Meeting of the Korean Association for Laboratory Animal Sciences (KALAS). Busan, August, 2010.
  26. Arai E, Nakagawa T, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H and Kanai Y. Focal DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage 1 testicular seminoma. Epigenetics and Stem Cells Conference. Copenhagen, August, 2010.
  27. Kanai Y. DNA methylation alterations and clinicopathological diversity of human cancers. The 41st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Found. Tokyo, November, 2010.
  28. Kanai Y. DNA methylation alterations during multistage hepatocarcinogenesis. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference "The latest advances in liver cancer research: from basic science to therapeutics". Chiba, March, 2011.
  29. Nagashio R, Arai E, Ojima H, Kosuge T, Kondo Y and Kanai Y. Carcinogenetic risk estimation based on DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference "The latest advances in liver cancer research: from basic science to therapeutics". Chiba, March, 2011.
  30. 金井弥栄 がんの臨床病理像の基盤となるDNAメチル化異常の網羅的解析とその臨床応用 第99回日本病理学会総会 シンポジウム7 「がん: 病理学の逆襲」 2010年4月東京
  31. 新井恵吏、中川徹、若井-牛島抄織、藤元博行、金井弥栄 精巣 Stage I セミノーマにおけるDNMT3B 巣状発現は腫瘍再発予測指標となる日本エピジェネティクス研究会第4回年会 2010年5月鳥取
  32. 後藤政広、新井恵吏、若井-牛島抄織、平岡伸介、小菅智男、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、金井弥栄 DNAメチル化プロファイルに基づいた膵がんの存在診断・病態診断指標の確立 日本エピジェネティクス研究会第4回年会 2010年5月鳥取
  33. 長塩亮、新井恵吏、尾島英知、小菅智男、近藤豊、金井弥栄 DNAメチル化状態を指標とする慢性肝障害患者における発がんリスク評価法の開発 日本エピジェネティクス研究会第4回年会 2010年5月鳥取
  34. 金井弥栄 Genome-wide DNA methylation analysis using human tissue specimens 第69回日本癌学会学術総会 シンポジウム9 2010年9月大阪
  35. 新井恵吏、中川徹、若井-牛島抄織、藤元博行、金井弥栄 Stage I 精巣セミノーマにおけるDNMT3B 巣状発現は再発予測指標となる 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月大阪
  36. 後藤政広、新井恵吏、若井-牛島抄織、平岡伸介、小菅智男、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、金井弥栄 DNAメチル化プロファイルに基づいた膵がんの存在診断・病理診断指標の確立 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月大阪
  37. 長塩亮、新井恵吏、尾島英知、小菅智男、近藤豊、金井弥栄 DNAメチル化状態を指標とする慢性肝障害患者における発がんリスク評価法の開発 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月大阪
  38. 金井弥栄 筋層非浸潤性膀胱がんの悪性進展に関わるエピジェネティック異常 第48回日本癌治療学会学術集会 パネルディスカッション 21 「(高リスク)筋層非浸潤性膀胱がんの治療戦略」 2010年10月京都
  39. Toyota M, Yamamoto E, Suzuki H, Kamimae S, Yamano H, Shinomura Y and Imai K. The origin of colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. 101st Annual Meeting of American Association for Cancer Research. Washington D.C., April, 2010.
  40. Watanabe Y and Itoh F. Usefulness of DNA methylation analysis using gastric washes as an

- ESD treatment marker for early gastric cancer. The 9th Japan-Korea Joint Symposium on Gastrointestinal Endoscopy. Tokyo, May, 2010.
41. Toyota M. Cancer epigenome analysis by massive parallel sequencing. Fifth Asian Epigenomics Meeting. Jeju, June, 2010.
  42. Toyota M. Epigenetics as cancer biomarkers. 38th Congress of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. Munchen, September, 2010.
  43. Toyota M. The origin of colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. The 41st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Tokyo, November, 2010.
  44. Watanabe Y, Oishi Y, Hiraishi T, Oikawa R, Maehata T, Suzuki H, Toyota M and Itoh F. Usefulness of DNA methylation analysis using gastric washes as a treatment marker for early gastric cancer. 6th International Society of Gastroenterological Carcinogenesis (ISGC). Houston, January, 2011.
  45. Watanabe Y, Maehata T, Oishi Y, Hiraishi T and Itoh F. Usefulness of DNA methylation analysis using gastric washes as an ESD treatment marker for early gastric cancer 第30回日本分子腫瘍マーカー研究会 2010年9月大阪
  46. Itoh F. Clinical application of epigenomics research in gastric cancer 第30回日本分子腫瘍マーカー研究会 2010年9月大阪
  47. 前畑忠輝、渡邊嘉行、伊東文生 新たな胃がん ESD 治療計画にむけた予測診断マーカーへの応用 JDDW2010 2010年10月横浜
  48. 渡邊嘉行、平石哲也、前畑忠輝、鈴木 拓、豊田 実、伊東文生 胃洗浄廃液を用いた早期胃がん内視鏡治療後補助診断の開発 第21回日本消化器癌発生学会 2010年11月長野
  49. Yamada Y, Aoki H, Kunisada T and Hara A. REST PROMOTES THE EARLY DIFFERENTIATION OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS. ISSCR 8th Annual Meeting. San Francisco, June, 2010.
  50. Yamada Y. Role of DNA methylation in colon tumorigenesis. The 41st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Tokyo, November, 2010.
  51. 山田泰広 Role of DNA methylation in the maintenance of undifferentiated states of colon tumor cells 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月大阪
- 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、長塩亮 「肝細胞癌のリスク評価方法」特願 2011-06695（2011年1月出願）
    2. 豊田 実、山本英一郎、神前正幸、鈴木 拓、山野泰穂. Method for detection of diseases using colonic mucosa. 出願先: PCT/JP2010/064715、平成22年8月30日出願。
  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 国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野 分野長

研究要旨

DNAメチル化異常は、ヒト発がんに関与する。本研究では、メチル化異常誘発の要因や分子機構を明らかにすること、がんでのDNAメチル化異常の全体像を明らかにすること、診断の標的として有用なDNAメチル化異常を同定することを目的としている。本年度は、遺伝子のメチル化異常誘発の感受性に、ゲノムの構造であるSINEおよびLINEとの距離が関与していること、そしてエピジェネティックな機構であるPol II結合やH3K27me3修飾と独立して感受性に関与していることを明らかにした。また、胃粘膜でのDNAメチル化異常誘発には、特定の慢性炎症が重要であることを明らかにし、DNAメチル化異常と発現が相関する炎症関連遺伝子を同定した。マウス大腸炎モデルにおいても、DNAメチル化異常と発現が相関する炎症関連遺伝子を同定した。以前に見出したヒト乳がんではCIMPとHER2増幅が関連することを別の症例群でも確認した。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(CGI)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）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。最近では、様々ながん、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CGIがメチル化される性質（CGIメチル化性質；CIMP）をもつ神経芽細胞腫は予後不良であることも示してきた。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) 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、マウス、細胞株

スナネズミは日本クレアから購入した。Balb/cマウスは、日本チャールス・リバーから購入した。ヒト細胞株は、ATCCから購入またはJCRBから分与をうけた。

(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、methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)-CGIマイクロアレイ法を使用した。独自に開発したアルゴリズム (Me value)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重亜硫酸処理の後、methylation-specific PCR (MSP)法、定量的 MSP 法、シーケンス法により解析した。

### (4) 遺伝子発現定量

定量的 RT-PCR 法により行った。

### (5) 蛋白質発現解析

Western blot 法により行った。

### (6) 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、Pol II 抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行った。ゲノム網羅的解析は CGI マイクロアレイを用いて行った。

### (7) 統計解析

Kaplan-Meier 解析による予後解析、多変量ロジスティック回帰分析法による多変量解析を行った。

#### (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、国立がん研究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、国立がん研究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 メチル化異常誘発の標的遺伝子決定機構

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、その機構として、低転写が DNA メチル化感受性に重要であることを明らかにしてきた。さらに、DNA メチル化異常誘発に抵抗性を示す遺伝子は有意に高レベルの転写活性型のヒストン修飾および Pol II 結合レベルを示すことを世界で初めて明らかにした。

本年度は DNA メチル化異常誘発の遺伝子特異性におけるゲノム構造の影響について検討した。乳腺および前立腺について DNA メチル化感受性のプロモーターCGI 及び抵抗性のプロモーターCGI をそれぞれ 262 個及び 5,194 個（前立腺）、280 及び 5,352 個（乳腺）同定した。ゲノム上の散在する繰り返り配列である SINE 及び LINE 近傍の CGI は有意にメチル化抵抗性であることを確認した。組織非特異的な DNA メチル化異常誘発感受性について多変量解析を行い、SINE (OR=5.98; 95% CI=2.33-15.34)及び LINE (OR=2.08; 95% CI=1.03-4.21)からの距離は、Pol II 結合(OR=0.09; 95% CI=0.02-0.48)や H3K27me3 修飾 (OR=3.28; 95% CI=1.17-9.21)と同様に、他の因子と独立して DNA メチル化異常誘発の感受性に関与していることを明らかにした。

### (2) 各種炎症の DNA メチル化異常誘発能

昨年度までに、スナネズミモデルを用いて、ピロリ菌感染が DNA メチル化異常誘発の原因であることを証明した。そして DNA メチル化異常の誘発には菌自身ではなく、感染の結果誘発された炎症が重要であることを明らかにしてきた。本年度は、ピロリ菌感染による炎症が重要であるのか、その他の要因による炎症でも長期間持続すれば DNA メチル化異常が誘発されるのかを検討した。その結果、高濃度アルコールや高張食塩水の持続投与では、急性炎症が繰り返し誘発され、高度の細胞増殖が誘発されるにもかかわらず、解析した 8 個の CGI の DNA メチル化異常は誘発されなかった。従って、特定の慢性炎症が DNA メチル化異常の誘発に重要であることが示された。また、DNA メチル化異常誘発の程度と発現量が相関する炎症関連遺伝子として、*Il1b*, *Nos2*, *Tnf* の 3 遺伝子を見出した。

### (3) マウス大腸炎モデルにおける DNA メチル化異常誘発に重要な遺伝子の同定

昨年度までにマウスに dextran sulfate sodium (DSS)を飲水投与した大腸炎モデルにおいて、誘発された腫瘍での DNA メチル化異常を同定、その異常は発がんに遙か先だって大腸粘膜に誘発されている（発がんの素地が形成されている）ことを明らかにしてきた。本年度は、このモデルにおける DNA メチル化異常誘発に関連する炎症関連因子について検討した。DSS 投与及び非投与マウス大腸において 8 個の炎症関連遺伝子の発現量を比較したところ、DNA メチル化異常誘発の程度と発現量が相関した遺伝子として、*Ifng*, *Il1b*, *Nos2* を見出した。

### (4) DNA メチル化異常誘発因子のスクリーニング

新規の DNA メチル化異常の誘発因子、さらにはエピジェネティック薬のスクリーニングを目的として、DNA メチル化されたプロモーターの下流にマーカー遺伝子を導入した細胞株の樹立を進めた。

### (5) 診断的に有用な DNA メチル化異常の同定

これまでに、CIMP が *MYCN* 遺伝子増幅よりも神経芽細胞腫の予後と強く相関することを示してきた。昨年度までに、臨床試験に際して得られた累積 173 検体について CIMP の解析を行った。本年度も前向き試験を継続し、累積 184 検体について CIMP の解析を行った。

### (6) ヒト乳がんにおける *HER2* 増幅と CIMP の関連の確認

*HER2* 増幅はヒト乳がんの重要な診断・治療標的であるが、DNA メチル化異常との関連は知られていない。昨年度までに、ヒト乳がんメチル化異常を示す 11 個の遺伝子におけるメチル化レベルを乳が

ん 63 症例について定量的に解析し、CIMP が *HER2* 増幅と強く関連していることを明らかにした。本年度は78症例を追加して解析し、やはりCIMPが*HER2*増幅と強く関連していることを確認した。

#### 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、エピジェネティックな機構である Pol II 結合や H3K27me3 修飾と独立して、ゲノムの構造である SINE および LINE との距離が関与していることを明らかにした。この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。より多くの因子について、発がん因子曝露応じたメチル化プロファイルが解明されれば、分子疫学等への応用が期待できる。

DNA メチル化異常誘発に特定の慢性炎症が重要であることが明らかになった。DNA メチル化異常を誘発するタイプの炎症が発がんに関与するタイプの炎症であるのか、今後の重要な課題である。また、DNA メチル化異常誘発に関与する炎症成分の特定も重要な課題である。マウス大腸炎モデルを活用し、各種炎症性サイトカイン等のノックアウトマウスを用いて同様の実験を行うことにより、DNA メチル化異常に重要な炎症成分が特定できると考え、研究を進めている。DNA メチル化異常誘発に関与する成分が明らかになれば、その抑制による新たな疾患予防戦略が立てられる。

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。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、前向き試験を継続している。胃がんリスク診断は、大規模な前向き研究として、別途実施中である。

#### E. 結論

発がん因子曝露による 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、エピジェネティックな機構とゲノム構造が独立して働いていることが明らかになった。また、DNA メチル化異常誘発には特定の慢性炎症が重要である。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り、実用化に向けた研究を進めている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Hur K, Niwa T, Toyoda T, Tsukamoto T, Tatematsu M, Yang HK and Ushijima T. Insufficient role of cell proliferation in aberrant DNA methylation induction, and involvement of

specific types of inflammation. **Carcinogenesis**, 32: 35-41, 2011.

2. Gyobu K, Yamashita S, Matsuda Y, Igaki H, Niwa T, Oka D, Kushima R, Osugi H, Lee S, Suehiro S and Ushijima T. Identification and validation of DNA methylation markers to predict lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinomas. **Ann Surg Oncol**, 18: 1185-1194, 2011.
3. Yoshida T, Yamashita S, Takamura-Enya T, Niwa T, Ando T, Enomoto S, Maekita T, Nakazawa K, Tatematsu M, Ichinose M and Ushijima T. *Alu* and *Sata* hypomethylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae. **Int J Cancer**, 128: 33-39, 2011.
4. Ushijima T and Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Sci**, 101: 300-305, 2010.
5. Takeshima H and Ushijima T. Methylation destiny: Moira takes account of histones and RNA polymerase II. **Epigenetics**, 5: 89-95, 2010.
6. Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M and Ushijima T. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. **Cancer Res**, 70: 1430-1440, 2010.
7. Tomita H, Hirata A, Yamada Y, Hata K, Oyama T, Mori H, Yamashita S, Ushijima T and Hara A. Suppressing effect of global DNA hypomethylation on gastric carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 31: 1627-1633, 2010.
8. Ishii G, Hashimoto H, Asada K, Ito T, Hoshino A, Fujii S, Kojima M, Kuwata T, Harigaya K, Nagai K, Ushijima T and Ochiai A. Fibroblasts associated with cancer cells keep enhanced migration activity after separation from cancer cells: a novel character of tumor educated fibroblasts. **Int J Oncol**, 37: 317-325, 2010.
9. Nakajima T, Enomoto S, Yamashita S, Ando T, Nakanishi Y, Nakazawa K, Oda I, Gotoda T and Ushijima T. Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. **J Gastroenterol**, 45: 37-44, 2010.

本研究費に密接に係るもの

1. Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Hareyama N, Imai S, Narita M, Torigoe K, Niikura K, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Ushijima T and Suzuki T. Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment.

- Hippocampus**, 21: 127-132, 2011.
2. Ushijima T, Okochi-Takada E and Takeshima H. Epigenomic analysis in toxicology. In: Handbook of Systems Toxicology. ed. Casciano DA and Sahu SC. John Wiley & Sons, West Sussex, 489-507, 2011.
  3. Herceg Z and Ushijima T. Introduction: Epigenetics and cancer. **Adv Genet**, 70: 1-23, 2010.
  4. Niwa T and Ushijima T. Induction of epigenetic alterations by chronic inflammation and its significance on carcinogenesis. **Adv Genet**, 71: 41-56, 2010.
  5. Ikegami D, Narita M, Imai S, Miyashita K, Tamura R, Takagi S, Yokomizo A, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Kuzumaki N, Ushijima T and Suzuki T. Epigenetic modulation at the CCR2 gene correlates with the maintenance of behavioral sensitization to methamphetamine. **Addict Biol**, 15: 358-361, 2010.
  6. Kuzumaki N, Ikegami D, Imai S, Narita M, Tamura R, Yajima M, Suzuki A, Miyashita K, Niikura K, Takeshima H, Ando T, Ushijima T and Suzuki T. Enhanced IL-1 $\beta$  production in response to the activation of hippocampal glial cells impairs neurogenesis in aged mice. **Synapse**, 64: 721-728, 2010.
  7. Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Sasaki T, Niikura K, Narita M, Miyashita K, Imai S, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Ushijima T and Suzuki T. Hippocampal epigenetic modification at the doublecortin gene is involved in the impairment of neurogenesis with aging. **Synapse**, 64: 611-616, 2010.
  8. Hattori N and Ushijima T. Analysis of gene-specific DNA methylation. In: Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. ed. Tollefsbol T. Academic Press, England, pp125-134, 2010.
2. 学会発表
1. Ushijima T. Induction of epigenetic alterations by *H. pylori*-induced inflammation. AACR Annual Meeting. Washington, D.C., April, 2010. (chair, invited)
  2. Ushijima T and Takeshima H. Methylation destiny: aberrant DNA methylation targets genes defined by stalled RNA polymerase II, histone modifications, and distance to repetitive sequences. Korean Society of Biochemistry and Molecular Biology. Seoul, May, 2010. (invited)
  3. Ushijima T. Cancer epigenome: Translation into preventiv, diagnostic, and therapeutic targets. Korean National Cancer Center Symposium. Seoul, May, 2010. (invited)
  4. Ushijima T. Critical role of *H. pylori*-triggered inflammation in the formation of an epigenetic field for gastric cancers. Seoul International Gastric Cancer Symposium. Seoul, June, 2010. (invited)
  5. Ushijima T. Induction of aberrant DNA methylation by *H. pylori* infection-triggered inflammation. 5th Asian Epigenome Meeting. Jeju, June, 2010. (invited)
  6. Ushijima T. Epigenetic field defect in the stomach: formation by inflammation due to *Helicobacter pylori* infection and use as a cancer risk marker. 3rd Annual Scientific Meeting of Singapore Gastric Cancer Consortium. Singapore, July, 2010. (invited)
  7. Hattori N, Okochi-Takada E, Takeshima H, Wakabayashi M, Yamashita S and Ushijima T. Screening of promoter CpG islands methylated in human mammary epithelial cells. NSFC A3 foresight program 2010 seminar. Beijing, September, 2010.
  8. Ushijima T. Epimutation induction by environmental factors, such as *H. pylori* infection and smoking. Symposium at Annual Meeting of Environmental Mutagen Society. Fortworth, October, 2010. (invited)
  9. Shigematsu Y, Niwa T, Ichinose M and Ushijima T. Current status of our research to identify CpG islands whose DNA methylation status is associated with the presence of lymph node metastases of gastric cancers. NSFC A3 Foresight Program 2010 Seminar. Beijing, October, 2010.
  10. Ushijima T. Critical role of inflammation triggered by *H. pylori* infection in methylation induction. 41st International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Tokyo, November, 2010. (organizer, invited)
  11. Ushijima T. Epigenome damage by the environment. Howard Hughes Medical Institute "Unraveling epigenomes in health and disease" Workshop. Washington, D.C., December, 2010. (invited)
  12. Hattori N, Okochi-Takada E, Kikuyama M, Wakabayashi M, Yamashita S, Watanabe N and Ushijima T. Identification of five genes with promoter methylation in rat mammary carcinomas by a combination of DNA methylation microarray and expression microarray. XVIIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat. Kyoto,



December, 2010.

13. 牛島俊和 International Human Epigenome Consortiumの現況 文科省政策研究所シンポジウム 2010年4月
  14. 牛島俊和 国際ヒトエピゲノムコンソーシアムの状況と環境エピゲノミクス 環境エピゲノミクス研究会 2010年7月
  15. 丹羽 透、豊田武士、塚本徹哉、森 明子、許根、立松正衛、牛島俊和 DNA 脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine による *Helicobacter pylori* 感染 *N*-methyl-*N*-nitrosourea 誘発スナネズミ胃がんの予防 第25回発癌病理研究会 2010年8月
  16. Ushijima T Cancer risk diagnosis based upon accumulation of epigenomic damage 第69回日本癌学会学術総会 international session 2010年9月
  17. Niwa T, Toyoda T, Tsukamoto T, Mori A, Hur K, Tatematsu M and Ushijima T Prevention of gastric cancers associated with *Helicobacter pylori* infection by a DNA demethylating reagent 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月
  18. 山下 聡、形部 憲、高橋 智、松田恭典、牛島俊和 過剰なテストステロンは前立腺に異常DNAメチル化を誘発する 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月
  19. 大河内(高田)江里子、塚本徹哉、若林美香、山村義孝、立松正衛、牛島俊和 *ANGPTL4* はヒト胃がんにおいてプロモーターCpG アイランドのメチル化により不活化を受けるがん抑制遺伝子である 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月
  20. Ushijima T Aberrant DNA methylation in solid tumors: implications to epigenetic therapy 日本血液学会シンポジウム 2010年9月
  21. 牛島俊和 がんにおけるDNAメチル化異常とその診断応用 日本癌治療学会-癌学会合同シンポジウム 2010年10月
  22. 牛島俊和 Induction mechanisms of aberrant DNA methylation. 日本色素細胞学会 2010年11月
  23. 牛島俊和 Gene-specific induction of aberrant DNA methylation by *Helicobacter pylori* infection. 東大分生研シンポジウム 2010年11月
  24. 大河内(高田)江里子、若林美香、牛島俊和 *ANGPTL4* は血管新生抑制を介してヒト胃がんの進展抑制遺伝子として機能する 第33回日本分子生物学会 2010年12月
- 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
  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

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 国立がん研究センター研究所分子病理分野 分野長

研究要旨

昨年度までの成果として、腎細胞がん症例より得られた非がん腎組織は、組織学的に特記すべき所見を示さなくても、既にDNAメチル化異常が蓄積した前がん段階にあることを示してきた。本年度は、定量性に優れたスクリーニング法を導入し、腎発がん過程におけるDNAメチル化プロファイルの変化を、網羅的に明らかにすることを目指した。

非腎腫瘍症例より得られた正常腎組織 (C)29検体・109腎細胞がん (淡明細胞がん)症例より得られた非がん腎組織検体 (N)と腎細胞がん組織検体 (T)において、Infinium Human Methylation27 BeadChip (Illumina)を用い、DNAメチル化状態を評価した。DNAメチル化状態と、症例の臨床病理学的因子の相関を検討した。

Cumulative logit model 解析ならびにWilcoxon検定により、NにおいてCに比してDNAメチル化状態に既に有意な変化があり、Tにおいて同一の傾向性を持ってさらに有意に変化する801プローブを抽出した。この801プローブを用いた階層的クラスタリングにより、腎細胞がん症例は、クラスターAとクラスターBに分けられた。大腸がん等において既に報告されているCpGアイランドメチル化形質 (CIMP)マーカー遺伝子のDNAメチル化は、クラスターBに蓄積していた。クラスターBには、腫瘍径が大きく、単結節周囲増殖型あるいは多結節癒合型の肉眼型をとり、組織学的異型度が高度で、腎静脈本幹腫瘍栓や静脈侵襲を伴い、浸潤性発育を示し、壊死を伴い、診断時の病期が進行した腎細胞がん症例が、有意に蓄積していた。分類木解析等で、腎細胞がんの腫瘍径・肉眼型・静脈侵襲の有無とよく相関するDNAメチル化異常を示す遺伝子の候補が、複数同定された。

腎多段階発がん過程に早期から起こるDNAメチル化異常が、腎細胞がんの臨床病理像の形成に寄与すると考えられた。本解析をもとに、腎がんにおけるCIMP遺伝子の同定・腎細胞がんの予後予測指標の策定・DNAメチル化異常を介して腎発がんに関与し創薬標的となりうる遺伝子の同定を進めることができると期待される。

A. 研究目的

本研究は、組織検体におけるゲノム DNAメチル化解析に基づき、多段階発がん過程におけるDNAメチル化異常の意義を明らかにすることを目的としている。腎細胞がんの発生過程については、昨年度までの成果として、腎細胞がん症例より得られた非がん腎組織は、組織学的に特記すべき所見を示さなくても既にDNAメチル化異常の蓄積する前がん段階にあること、前がん段階におけるDNAメチル化プロファイルはその症例に生じた腎細胞がんに関与することを示してきた。本年度は、より網羅性の高い解析を施行してDNAメチル化異常の意義の理解を進め、DNAメチル化異常を介して腎細胞がんの発生に関与する遺伝子の同定を目指した。

B. 研究方法

腎盂がん・胚細胞腫瘍の後腹膜リンパ節転移等を伴う非腎腫瘍症例において、国立がん研究センター中央病院で施行された腎摘除術標本より、正常腎組織29検体を採取した。腎細胞がん (淡明細胞がん)109症例の腎摘除術標本より、非がん腎組織検体ならびに腎細胞がん組織検体を採取した。フェノール・クロロフォルム抽出により得たゲノムDNA500ngを、EZ DNA methylation Kit (Zymo Research)によるバイサルファイト変換に供し、定法に従ってInfinium Human Methylation27 Beadchip Kit (Illumina)によるDNAメチル化解析に供した。本ビーズチップにより、約14,000のヒトRefSeq遺伝子を

カバーする 27,578 CpG 部位の DNA メチル化状態を、1 塩基の解像度で解析可能である。バイサルファイト変換ゲノム DNA を 0.01N NaOH で変性し、37°C20 時間増幅後、酵素処理により断片化して、Freedom EVO (TECAN)を用い 48°C20 時間 ハイブリダイゼーションした。プライマー伸長反応後、BeadStation 500 スキャナ (Illumina)を用いてデータを取得し、GenomeStudio Data Analysis ソフトウェア (Illumina)による解析に供した。各 CpG 部位に対する DNA メチル化率は、 $\beta$  値 [メチル化検出プローブのシグナル強度 / (メチル化検出プローブのシグナル強度 + 非メチル化検出プローブのシグナル強度)] で定義される。DNA メチル化状態と、症例の臨床病理学的因子すなわち腫瘍径・肉眼型 (単結節型・単結節周囲増殖型・多結節癒合型)・組織学的異型度 (グレード 1-4)・腎静脈本幹腫瘍栓の有無・静脈侵襲の有無・発育様式 (圧排型・浸潤型)・壊死の有無・診断時の病期 (I-IV) との相関を検討した。

#### (倫理面への配慮)

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

Infinium HumanMethylation27 BeadChip に搭載された 27,578 プローブ中、コール割合が 0.9 以下であるのは 32 プローブのみで、その 32 プローブの多くは日本人における多型が報告されている遺伝子上に設計されていた。そこで、この 32 プローブを除く常染色体上の 26,454 プローブにおける平均  $\beta$  値 (DNA メチル化率)を解析に供した。26,454 プローブの DNA メチル化状態について、加齢・性別に依存した著しい偏りは見られなかった。分散共分散行列に対する主成分分析により、第 1 主成分が、がんと非がんを区別するのに寄与していることがわかった。Logistic model による  $p$  値を用いた Q-Q プロットにより群間の分布の差を比較すると、正常腎組織と、前がん状

態にあると考えられる腎細胞がん症例より得られた非がん腎組織においては、異なった分布であることが確認された。腎細胞がん症例より得られた非がん腎組織と腎細胞がんの間では、分布はさらに大きく異なっていた。

(a) 正常腎組織と前がん状態にある腎組織の間で、DNA メチル化率に有意な差のあるプローブ (性別・年齢・実験のバッチで補正し、false discovery rate [FDR]  $q=0.01$  で有意となるプローブ)は、4,830 プローブであった。

(b) 次に、Cumulative logit model 解析により、正常腎組織・前がん状態にある腎組織・腎細胞がん組織の 3 群間に、一定の順序性・傾向性をもって変化を認めるプローブを抽出した (性別・年齢・実験のバッチで補正し、FDR [ $q=0.01$ ]で有意となるプローブ)。11,093 プローブにおける DNA メチル化状態は、前がん状態において正常腎組織に比し既に変化しており、腎細胞がんへの進展に伴ってさらに同じ方向に変化する、すなわちその変化が腎細胞がんに継承されると理解された。

(c) 同一症例より得られた非がん腎組織 (前がん状態にある腎組織)と腎細胞がん組織の間で Wilcoxon matched-pairs 解析を施行したところ、10,874 プローブにおける DNA メチル化状態が両者の間で有意に異なっていることが分かった (FDR [ $q=0.01$ ])。

(a)・(b)・(c)の全ての検定で有意となったプローブは、801 プローブであった。この 801 プローブにおいては、前がん状態において正常腎組織に比して DNA メチル化状態が変化し、その変化がさらに亢進して腎細胞がんの発生に寄与する可能性があると考えられた。そこで、この 801 プローブについて、同一症例より得られた非がん腎組織 (前がん状態にある腎組織)と腎細胞がん組織の  $\Delta \beta$  値を用いて階層的クラスタリングを施行した。腎細胞がん症例は、クラスター A とクラスター B に分けられた。クラスター分類と、性別・年齢との相関は認められなかった。クラスター B には、腫瘍径が大きく ( $p=0.00010689$ )、単結節周囲増殖型あるいは多結節癒合型の肉眼型をとり ( $p=0.000987059$ )、組織学的異型度が高度で ( $p=0.000190682$ )、腎静脈本幹腫瘍栓 ( $p=0.004665575$ ) や静脈侵襲 ( $p=0.000228027$ )を伴い、浸潤性発育を示し ( $p=7.01068 \times 10^{-6}$ )、壊死を伴い ( $p=4.18507 \times 10^{-6}$ )、診断時の病期が進行した ( $p=5.68174 \times 10^{-5}$ )腎細胞がん症例が、有意に蓄積していた。大腸がん等において既に報告されている CpG アイランドメチル化形質 (CIMP)マーカー遺伝子の DNA メチル化状態を見ると、クラスター B において高頻度に DNA メチル化を受ける遺伝子が多かった。

Wilcoxon 検定あるいは Jonckheere-Terpstra 傾向検定で、腫瘍径・肉眼型・組織学的異型度・腎静脈本幹腫瘍栓の有無・静脈侵襲の有無・発育様式・壊死の有無・診断時の病期とその DNA メチル化状態が有

意に相関するプローブは (FDR [q=0.01])、合計 246 プローブであった。この 246 プローブを用いて分類木解析を施行し、その DNA メチル化状態がそれぞれの臨床病理学的因子を分けることができる上位プローブを、各因子について 3 ないし 6 プローブ同定した。探索範囲を広げるため、上記(a)・(b)・(c)の条件を 1 項目以上満たす 15,819 プローブを用いて同様に分類木解析を施行した。肉眼型・腫瘍径・組織学的異型度・静脈侵襲について、246 プローブならびに 15,819 プローブの双方において安定した分類木が得られた。肉眼型と遺伝子 A 上に設計されたプローブ、腫瘍径と遺伝子 B・C 上に設計されたプローブ、組織学的異型度と遺伝子 D 上に設計されたプローブ、静脈侵襲と遺伝子 E 上に設計されたプローブの DNA メチル化状態との関係がそれぞれ強固であることが、246 プローブならびに 15,819 プローブを用いた分類木解析で共通して示された。Random forest 解析によっても、肉眼型と遺伝子 A 上に設計されたプローブ、腫瘍径と遺伝子 B 上に設計されたプローブ、静脈侵襲と遺伝子 E 上に設計されたプローブの DNA メチル化状態との関係がそれぞれ強固であることが示された。遺伝子 A ないし E ならびに、上記 246 プローブの階層的クラスタリングで遺伝子 A ないし E とその DNA メチル化状態がよく類似していた遺伝子群は、DNA メチル化異常を介して腎細胞がんの臨床病理学的悪性度を規定する遺伝子の候補と考えられた。

#### D. 考察

本年度は、従来法に比して定量性ならびに網羅性に優れた DNA メチル化解析法を導入した。従来解析によって示唆されていたように、腎細胞がん症例より得られた非がん腎組織においては、組織学的に特記すべき所見を示さなくても、DNA メチル化異常が蓄積していることが確認された。前がん状態において既に起こり、腎細胞がんへと継承されるような DNA メチル化異常が、エピジェネティックな異常をさらに誘導し、腎細胞がんの悪性度を規定する可能性が示された。大腸がん等においては臨床病理像と CIMP の相関が整理され、発がん経路の理解が進んでいるが、本解析をもとに腎発がんにおいても CIMP 遺伝子の同定を進めることができると期待される。腎細胞がんにおいては一般に、他の臓器がんにおいて高頻度に異常を認めるがん抑制遺伝子等の寄与が、VHL 遺伝子を除き概して少ないことが報告されてきた。近年リシークエンシングやエクソーム解析をもとに新たに腎がんへの寄与が注目されるようになった遺伝子におけるジェネティックな異常と、腎細胞がんにおける CIMP の相関を検討し、腎発がん経路の理解を進めたい。また現在症例の予後情報を収集しているが、クラスター B を特徴づける遺伝子群の DNA メチル化状態を指標として、腎細胞がんの予後予測を行いうると期待される。腎細胞がんの悪性度

を反映するような臨床病理学的因子とよく相関する DNA メチル化異常を示す、複数の遺伝子が挙げられた。現在、同一症例より得られた組織検体ならびに脱メチル化剤処理した培養腎がん細胞株における mRNA 発現解析解析を準備している。これらの試料で DNA メチル化異常と発現の相関を確認し、機能解析等を付加することによって、DNA メチル化異常を介して腎発がんに寄与し創薬標的候補となる遺伝子を絞り込む予定である。

#### E. 結論

腎多段階発がん過程に早期から起こる DNA メチル化異常が、腎細胞がんの臨床病理像の形成に寄与すると考えられた。本解析をもとに、腎がんにおける CIMP 遺伝子の同定・腎細胞がんの予後予測指標の策定・DNA メチル化異常を介して腎発がんに寄与し創薬標的となりうる遺伝子の同定を進めることができると期待される。

#### F. 研究発表

##### 1.論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Nagashio R, Arai E, Ojima H, Kosuge T, Kondo Y and Kanai Y. Carcinogenetic risk estimation based on quantification of DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage. **Int J Cancer**, in press.
2. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J and Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. **Carcinogenesis**, 32: 462-469, 2011.
3. Arai E and Kanai Y. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. **Int J Clin Exp Pathol**, 4: 58-73, 2011.
4. Arai E, Wakai-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 renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. **Pathobiology**, 78: 1-9, 2011.
5. Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J and Kanai Y. Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. **J Biomed Biotechnol**, 2011: 780836, 2011.
6. Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles