

20118017A (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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牛島 俊和

平成24年(2012)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10
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14
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19
鈴木 拓 札幌医科大学分子生物学講座
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22
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24
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26

IV 研究成果の刊行物・別刷

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、エピジェネティック治療の基盤を確立することを目的としている。本年度は、慢性炎症による DNA メチル化異常誘発にリンパ球は不要であり、単球・マクロファージが Effector として重要である可能性が高いことを明らかにした。マウス大腸腫瘍細胞から *Nanog* 陽性の初期化細胞を樹立した。大腸前がん病変におけるメチル化異常の網羅的解析を行い、臨床病理像との相関を検証した結果、CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) 陽性大腸腺腫に特徴的な形態 (ピットパターン) を明らかにした。腎細胞がんの予後診断の指標と成り得る CIMP マーカーとして、18 個の CpG 部位を同定した。胃洗浄廃液での DNA メチル化解析による胃がんの存在診断について、前向き多施設臨床試験を進めた (1 年目・症例エントリー中)。神経芽細胞腫の予後診断を継続して実施している。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を樹立することにより、DNA 脱メチル化剤のハイスループットスクリーニングを可能にした。

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
鈴木 拓	札幌医科大学 分子生物学講座・助教
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

(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 メチル化異常が遺伝子プロモーター領域 CpG アイランド

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、(4) エピジェネティック治療の基盤を確立すること、を目的とする。

B. 研究方法

(1) マウス、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。C.B17/lcr-scid/scid (SCID)マウス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。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) マウス大腸腫瘍細胞の初期化

山中因子の発現コントロールには、ドキシサイクリンによる遺伝子発現系を利用したマウスシステムを用いた。*Rosa26* プロモーター制御下に *M2rtTA* を発現し、*Coll1a1* 遺伝子座において tet オペレーター下に 2A polypeptide で連結させた山中 4 因子を有するトランスジェニックマウス(「初期化可能マウス」)を作製した。初期化可能マウスの大腸腫瘍は、初期化可能マウスを *Apc*^{Min/+}マウスに交配し、得られた 7 週齢マウスに DSS (2%)を 1 週間飲水投与することにより誘発した。投与終了後 4 週後に屠殺し、大腸腫瘍を摘出した。山中因子の誘導は、試験管内でドキシサイクリン処理により行った。

樹立した初期化細胞が、腫瘍細胞由来であることの確認は、PCR-RFLP 法を用いて *Apc* 遺伝子の LOH を検索することにより行った。樹立された細胞の完全な初期化の評価は、*Nanog* 遺伝子の mRNA 発現解析により行った。また初期化細胞の分化能は、マウス初期胚へのマイクロインジェクションにより検討した。

(3) ゲノム網羅的な DNA メチル化解析

ゲノム網羅的な DNA メチル化解析では、1) methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)-CGI マ

イクロアレイ法、2) Methylated CpG island amplification microarray (MCAM) 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、独自に開発したアルゴリズム(Me value, Yamashita *et al.* DNA Res. 2009)によりメチル化の程度を判定した。

MCAM 法では、MCA 法により準備したプローブを、XmaI/SmaI により切断されてできた PCR 増幅可能な領域をカバーするように専用設計した DNA マイクロアレイにハイブリダイゼーションさせた。

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) ゲノム網羅的な遺伝子および microRNA 発現解析

オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて行った。

(6) 遺伝子および microRNA 発現定量

リアルタイム PCR を用いた定量的 RT-PCR 法により行った。

(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、かつ、形状を DNA 回収時の遠心分離に対応できるものにして特注した 250mL 専用採取管を用いて胃洗浄液を回収した。

(8) 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。

(9) 分子経路探索

MetaCore ソフトウェア (<http://www.genego.com>) を用いて行った。

(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。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。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 マウス大腸炎モデルを用いた DNA メチル化異常誘発機構の解析

昨年度までに DSS 投与マウス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、発がんの素地の形成に関与していることを明らかにしてきた。さらに、DNA メチル化異常誘発の程度と発現量が相関した炎症関連遺伝子として、*Ifng*, *Il1b*, *Nos2* を見出した。本年度は、T・B 細胞が遺伝的に欠損している SCID マウスに DSS を飲水投与した。SCID マウスでも、野生型マウスと同等に、大腸腫瘍が誘発され、さらに大腸粘膜に DNA メチル化異常が誘発された。DSS 投与後に、SCID マウスおよび野生型マウスの双方で共通して発現上昇が認められる炎症関連遺伝子として、*Ifng*, *Il1b*, *Nos2* を見出した。

1-2 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

これまで、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てきた。昨年度までに、*Apc*^{Min/+}マウス大腸腫瘍細胞にレトロウイルスを用いて山中 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 様細胞には、*Nanog* 遺伝子などの初期化マーカーは発現しておらず、不完全な初期化細胞と考えられた。

そこで本年度は、マウス大腸腫瘍細胞が初期化可能か否かを明らかにすることを目的として、山中因子の発現コントロールに、ドキシサイクリンによる遺伝子発現系を利用したマウスシステムを用いた(初期化可能マウス)。このマウスを *Apc*^{Min/+}マウスと交配し、得られたマウスに DSS 飲水投与することにより、大腸腫瘍を誘発した。この大腸腫瘍細胞を培養し、試験管内でドキシサイクリン処理により山中因子を誘導することで、形態が多能性幹細胞に類似した細胞株を複数得た。これら細胞株は、腫瘍細胞由来であることが確認され、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。さらに、完全初期化のマーカーとして使用される *Nanog* 遺伝子の発現が確認され、腫瘍細胞の完全な初期化が可能であることが示唆され

た。

樹立した大腸腫瘍由来の reprogrammed tumor cells (RT 細胞)を分化誘導培養条件で培養すると胎盤分化に重要な転写因子である *Cdx2* 遺伝子の発現が上昇することを見出した。さらに、RT 細胞をマウス初期胚にマイクロインジェクションすることで、RT 細胞が胎盤組織へと分化することが確認された。

(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

2-1 大腸腫瘍の形態とメチル化異常の関連

大腸がんをはじめ様々な臓器のがんで CpG アイランドメチル化形質(CpG island methylator phenotype, CIMP)が見られることが知られているが、CIMP と臨床像との関連は未だ不明な点が多い。本年度は、大腸がん発生初期における DNA メチル化を解析する目的で 122 例の大腸腺腫の DNA メチル化を解析し、内視鏡像および臨床病理像との関連を詳細に検討した。大腸腫瘍では、拡大内視鏡によるピットパターン分類が悪性度診断に有用であることが知られている。今回、通常 Type II ピットに類似しながらも、円形に開いた形状のピットパターンが、*BRAF* 変異陽性かつ CIMP 陽性の鋸歯状腺腫にきわめて特異的に見られることを新たに見だし、これを Type II-Open ピットと命名した。

2-2 大腸前がん病変の網羅的メチル化解析

一般にメチル化異常は発がんの早期に発生するとされているが、その詳細は不明な点が多い。大腸発がんにおける CIMP の意義を明らかにするため、16 例の大腸腺腫、14 例の粘膜内癌、28 例の大腸がん組織を対象に MCAM 法による網羅的 DNA メチル化解析を行った。その結果、大腸腺腫の一群はすでに CIMP 陽性を獲得していることを明らかにした。また大腸発がん早期にメチル化する遺伝子として *KCNV1*, *IGF2BP1* などを新たに同定した。

(3) 診断的に有用な DNA メチル化異常の同定

3-1 腎細胞癌の予後診断マーカー同定

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、昨年度までに、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。さらに、腎細胞がんの前がん段階から DNA メチル化異常が蓄積し、臨床病理学的に悪性度の高い CIMP 陽性症例群を同定していた。CIMP 陽性群は予後不良であることから、CIMP マーカー遺伝子の DNA メチル化状態は、予後診断指標となり得ると予想され

た。そこで、本年度は、腎癌がん特異的な CIMP マーカー遺伝子の同定を進めた。

非がん腎組織検体においてメチル化レベルが特に低値であり、腎細胞がん組織検体において同一症例の非がん部と比べて特に DNA メチル化亢進が顕著である CpG 部位が、CIMP 陽性症例に蓄積していることを見出した。そこで、非がん腎組織検体における平均 β 値が 0.2 以下で、 $\Delta\beta$ ($\beta_T - \beta_N$) が 0.4 以上である頻度が CIMP 陽性症例において陰性症例に比して有意に高い、15 遺伝子 16 個の CpG 部位に着目した。さらに、 $\Delta\beta$ が CIMP 陽性・陰性群間で有意に異なるプローブ群を用いて、ランダムフォレスト解析により 2 群の分類器の同定を行ったところ、4 遺伝子の 4 個の CpG 部位が両群の判別に有用であることが認められた。これらを統合した 17 遺伝子 18 個の CpG 部位が、腎細胞がん CIMP マーカーであると考えられた。

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 (MINT25, Sox17, miR34b/c, ACMG1) による胃がんの存在診断の開発を継続した。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、聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科、筑波大学消化器内科、札幌厚生病院消化器科、札幌医療センター斗南病院消化器病センター、札幌北楡病院消化器科、手稲溪仁会病院消化器病センター、恵佑会札幌病院消化器内科、小樽腋済会病院消化器科、小樽協会病院消化器内科、済生会横浜市東部病院消化器科が加わり、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、1 年～5 年後まで洗浄廃液を回収し、再発予測診断プログラムの構築を目的として前向き試験を開始した。現在 1 年目経過中で症例エントリー中にある。

3-3 CIMP による神経芽細胞腫の予後診断

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、累積 227 例について CIMP の診断を行った。

(4) エピジェネティック治療の基盤確立

新規の DNA メチル化異常の誘発因子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 DNA 脱メチル化剤スクリーニング用の細胞株の樹立を進めてきた。本年度は、DNA メチル化した *UCHL1* 遺伝子プロモーターの下流に分泌性ルシフェラーゼを接続したコンストラクトを、大腸がん細胞株 HCT116 に導入した。その結果、既知の DNA 脱メチル化剤

(5-aza-dC)処理に反応して発光し、外来性 *UCHL1* 遺伝子プロモーターの脱メチル化されるクローンを 3 個樹立した。さらにサブクローニングを行い、高感度・高特異度に DNA 脱メチル化剤の検出が可能なサブクローンを合計 14 個樹立した。

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。昨年度までに、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を明らかにしてきた。本年度は、マウス大腸炎モデルについて SCID マウスを用いて解析した結果、DNA メチル化異常誘発に T・B 細胞は不要であることが明らかになった。即ち、残る炎症細胞で *Il1b*, *Nos2* を発現する単球・マクロファージが DNA メチル化異常誘発の重要な Effector である可能性が非常に高いと考えられた。今後さらに、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を立てることができる。

腫瘍細胞のエピジェネティック修飾異常の起源および意義解明には、腫瘍細胞の完全な初期化が必要である。しかしながら、腫瘍細胞の完全な初期化は困難であることが示唆されている。本研究により、初期化可能マウスを用いることで、少なくとも一部の腫瘍細胞に完全な初期化が誘導できることが分かった。今回樹立した初期化細胞株 (Nanog 陽性 RT 細胞) ではレトロウイルス由来の外來遺伝子のリークも無く、今後のエピゲノム解析に有用なツールとなることが期待される。今後はこの細胞株について 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予定である。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。また、大腸腫瘍由来の RT 細胞から非腫瘍性胎盤組織への分化誘導が認められたことは、腫瘍発生に十分な遺伝子変異を有する細胞であってもエピジェネティック修飾状態次第で非腫瘍性細胞に変化し得ることを示唆する。エピゲノム制御を標的としたがん治療の妥当性を示す結果と考えられた。

(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

大腸腫瘍の拡大内視鏡によるピットパターン分類において、今回新たに、BRAF 変異陽性かつ CIMP 陽性の鋸歯状腺腫にきわめて特異的に見られるピットパターンを見出し、Type II-Open ピットと命名した。この知見は、分子異常と腫瘍の形態の興味深い

関連を明らかにするとともに、CIMP 陽性大腸がんの前癌病変を効率的に同定しうる診断法につながると期待される。

また、大腸前がん病変の網羅的 DNA メチル化解析から、大腸がんの早期の段階で多数の遺伝子に DNA メチル化異常が誘発されていることが明らかとなった。これらのメチル化を便や大腸洗浄液から検出することで大腸がんの早期診断が可能であるか、検証を継続している。

(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。既に前向き臨床試験(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。がんの病態診断としては、本年度に、腎細胞がんについて、予後診断指標となり得ると期待される CIMP マーカー (17 遺伝子 18 個の CpG 部位) を同定した。現在 CIMP マーカーとして同定した CpG 部位と、同一の CpG アイランドに属する近傍の CpG 部位の DNA メチル化レベルを、これまで用いてきた Infinium 解析とは異なるプラットフォーム (質量分析計を基盤とする MassARRAY 法 [SEQUENOM]) で検証すると共に、診断閾値を設定して臨床検査としての最適化を進めている。検証コホート 110 症例の組織検体の収集も既に終えている。腎細胞がんの再発の可能性が高い症例は密に経過観察して再発を早期に診断し、後療法を追加すれば予後が改善できる可能性がある。しかし、病理組織学的に低異型度で最もありふれた組織型である淡明細胞がん属しながら急速に遠隔転移を来す症例が経験され、既存の臨床病理学的因子等による予後予測はほぼ不能である。現在開発を進めている DNA メチル化異常に基づく予後診断法においては、予後不良 (CIMP 陽性) 群とそうでない群との間で CIMP マーカーの DNA メチル化率の差違が大きいので、病院の検査室等でも容易に診断を実施できると期待される。

神経芽細胞腫の予後診断については、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。

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 DNA メチル化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。

(4) エピジェネティック治療の基盤確立

新規の DNA メチル化異常の誘発因子のスクリーニングは、ひいては新規エピジェネティック薬の開発に繋がる。本年度に樹立した細胞株を用いることにより、プレートリーダーを用いたハイスループットな DNA 脱メチル化剤スクリーニングが可能になった。今後、新規の DNA 脱メチル化剤の発見を目指して、天然・合成化合物のスクリーニングを共同研究で進める。

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. Nanjo S, Asada K, Yamashita S, Nakajima T, Nakazawa K, Maekita T, Ichinose M, Sugiyama T and Ushijima T. Identification of gastric cancer risk markers that are informative in individuals with past *H. pylori* infection. **Gastric Cancer**, in press.
2. Ushijima T and Hattori N. Molecular pathways: involvement of *helicobacter pylori*-triggered inflammation in the formation of an epigenetic field defect, and its usefulness as cancer risk and exposure markers. **Clin Cancer Res**, 18: 923-929, 2012.
3. Katsurano M, Niwa T, Yasui Y, Shigematsu Y, Yamashita S, Takeshima H, Lee M. S, Kim Y. J, Tanaka T and Ushijima T. Early-stage formation of an epigenetic field defect in a mouse colitis model, and non-essential roles of T- and B-cells in DNA methylation induction. **Oncogene**, 31: 342-351, 2012.
4. Takeshima H, Yamashita S, Shimazu T and Ushijima T. Effects of genome architecture and epigenetic factors on susceptibility of promoter CpG islands to aberrant DNA methylation induction. **Genomics**, 98: 182-188, 2011.
5. Cai LY, Izumi S, Abe M, Imura M, Yasugi T, Wakazono K, Ohnuki Y, Kondo A and Ushijima T. Does aberrant DNA methylation occur in human uterine leiomyomas? An Attempt of Genome-Wide Screening by MS-RDA. **Tokai J Exp Clin Med**, 36: 84-90, 2011.
6. Hattori N, Okochi-Takada E, Kikuyama M,

- Wakabayashi M, Yamashita S and Ushijima T. Methylation silencing of angiopoietin-like 4 in rat and human mammary carcinomas. **Cancer Sci**, 102: 1337-1343, 2011.
7. Arai E, Chiku S, Mori T, Gotoh M, Nakagawa T, Fujimoto H and Kanai Y. Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. **Carcinogenesis**, in press.
 8. 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**, 129: 1170-1179, 2011.
 9. Suzuki H, Takatsuka S, Akashi H, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Kai M, Yamano HO, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K and Toyota M. Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of microRNA genes in colorectal cancer. **Cancer Res** 71: 5646-5658, 2011.
 10. Kimura T, Yamamoto E, Yamano HO, Suzuki H, Kamimae S, Nojima M, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Takagi R, Kato R, Harada T, Suzuki R, Maruyama R, Kai M, Imai K, Shinomura Y, Sugai T and Toyota M. A Novel Pit Pattern Identifies the Precursor of Colorectal Cancer Derived From Sessile Serrated Adenoma. **Am J Gastroenterol**, 107: 460-469, 2012.
 11. Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Noshio K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, Nishida T, Bamba T, Kanda T, Ajioka Y, Taguchi T, Okahara S, Takahashi H, Nishida Y, Hosokawa M, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, and Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. **Cancer Res**, 72: 1126-1136, 2012.
 12. Shitani M, Sasaki S, Akutsu N, Takagi H, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto H, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, and Shinomura Y. Genome-wide analysis of DNA methylation identifies novel cancer-related genes in hepatocellular carcinoma. **Tumour Biol**, in press.
 13. Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T and Yamada Y. Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis. **Development**, 139: 667-677, 2012.
 14. Hatano Y, Yamada Y, Hata K, Phutthaphadoong S, Aoki H and Hara A. Genetic ablation of a candidate tumor suppressor gene, *Rest*, does not promote mouse colon carcinogenesis. **Cancer Sci**, 102: 1659-1664, 2011.
- 本研究費に密接に関係するもの
1. Lee YC, Wang HP, Wang CP, Ko JY, Lee JM, Chiu HM, Lin JT, Yamashita S, Oka D, Watanabe N, Matsuda Y, Ushijima T and Wu MS. Revisit of field cancerization in squamous cell carcinoma of upper aerodigestive tract: better risk assessment with epigenetic markers. **Cancer Prev Res**, 4: 1982-1992, 2011.
 2. Kong D, Piao YS, Yamashita S, Oshima H, Oguma K, Fushida S, Fujimura T, Minamoto T, Seno H, Yamada Y, Satou K, Ushijima T, Ishikawa TO and Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. **Oncogene**, in press.
 3. Ushijima T and Yoshida T. Field cancerization in gastric cancer. In: Dakubo GD (ed), Field cancerization: basic science and clinical applications. USA, Nova Science Publishers, 187-199, 2011.
 4. Arai E, Nakagawa T, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H and Kanai Y. DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. **Histopathology**, 60: E12-18, 2012.
 5. Kanai Y and Arai E. DNA methylation alterations in human cancers. In: Epigenetics in Human Disease. ed. Tollefsbol T. Elsevier, in press.
 6. Watanabe T, Ishihara K, Hirose A, Watanabe S, Hino S, Ojima H, Kanai Y, Sasaki Y and Nakao M. Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in the human tumor necrosis factor/lymphotoxin locus in hepatocellular carcinoma cells. **Mol Cell Biol**, 32: 1529-1541, 2012.
 7. Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T and Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. **Genome Res**, 22: 208-219, 2012.
 8. Yano Y, Konishi K, Yamochi T, Katagiri A, Nozawa H, Suzuki H, Toyota M, Kubota Y, Muramoto T, Kobayashi Y, Tojo M, Konda K,

- Makino R, Kaneko K, Yoshikawa N, Ota H and Imawari M. Clinicopathological and molecular features of colorectal serrated neoplasias with different mucosal crypt patterns. **Am J Gastroenterol**, 106: 1351-1358, 2011.
9. Yamamoto E, Suzuki H, Takamaru H, Yamamoto H, Toyota M and Shinomura Y. Role of DNA methylation in the development of diffuse-type gastric cancer. **Digestion**, 83: 241-249, 2011.
 10. Okamoto Y, Sawaki A, Ito S, Nishida T, Takahashi T, Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Takeuchi I, Shinjo K, An B, Ito H, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Kataoka H, Joh T, Sekido Y and Kondo Y. Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumour. **Gut**, 61: 392-401, 2012.
 11. Watanabe Y, Oishi Y, Yoshida Y, Sato Y, Hiraishi T, Oikawa R, Maehata T, Suzuki H, Toyota M, Niwa H, Suzuki M and Itoh F. Hypermethylation of Sox17 gene is useful as a molecular diagnostic application in early gastric cancer. **Tumour Biol**, 33: 383-393, 2012.
 12. Baba S, Oishi Y, Watanabe Y, Oikawa R, Morita R, Yoshida Y, Hiraishi T, Maehata T, Nagase Y, Fukuda Y, Nakazawa M, Ishigouka S, Hattori N, Suzuki H, Toyota M, Niwa H, Suzuki M and Itoh F. Gastric Wash-Based Molecular Testing for Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. **Digestion**, 84: 299-305, 2011.
2. 学会発表
1. Ushijima T. Dynamic aspects of epigenome - induction of aberrant DNA methylation by carcinogenic bacterial infection. 11th Belgian Society of Human Genetics Meeting. Louvain-la-Neuve, March, 2011.
 2. Ushijima T. Aberrant DNA methylation and gastric cancer. 9th International Gastric Cancer Congress. Seoul, April, 2011.
 3. Ushijima T. Epigenetic risk diagnosis of gastric cancer, and its molecular basis. 4th Annual Scientific Meeting of The Singapore Gastric Cancer Consortium. Singapore, July, 2011.
 4. Ushijima T. Induction of aberrant DNA methylation by *Helicobacter pylori* infection - its use as cancer risk diagnosis and molecular mechanisms. Japanese-German Cancer Workshop. Hiroshima, September, 2011.
 5. Hattori N, Okochi-Takada E, Kikuyama M, Wakabayashi M, Yamashita S, Watanabe N and Ushijima T. Identification of genes with promoter methylation in rat mammary carcinomas by a combination of DNA methylation microarray and expression microarray. International Symposium "Sex-differences in Epigenetics and Epigenomics". Tokyo, September, 2011.
 6. Ushijima T. Basic and translational aspects of epigenetic field for cancerization. France-Japan Symposium on Cancer Research 2011. Tokyo, November, 2011.
 7. Ushijima T. The *H. pylori* infection- inflammation- DNA methylation- gastric cancer pathway. The 21st HCS - The 5th Three Universities' Consortium International Symposium. Hiroshima, November, 2011.
 8. 牛島俊和. エピジェネティクスとがん予防. 第10回分子予防環境医学研究会大会, 2011年1月.
 9. 服部奈緒子, 大河内(高田)江里子, 菊山みずほ, 若林美香, 山下 聡, 渡邊直子, 牛島俊和. 網羅的 DNA メチル化解析および遺伝子発現解析を用いたラット乳がんでの異常 DNA メチル化の同定. 平成 22 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ, 2011年2月.
 10. 牛島俊和, 丹羽透. エピジェネティックな胃癌の素地とその形成機構. 第100回日本病理学会総会, 2011年4月.
 11. 牛島俊和. 人生を刻むエピゲノム変化. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011年5月.
 12. 牛島俊和, 丹羽透. エピジェネティック異常のがん予防における有用性— 新たながん予防効果予測マーカーとして、また、予防の作用点として. がん予防大会 2011, 2011年6月.
 13. 牛島俊和. *H. pylori* の特殊能力: DNA メチル化異常を誘発する炎症の誘発. 第17回日本ヘリコバクター学会, 2011年6月.
 14. 丹羽透, 桂野美貴, 森 明子, 牛島俊和. Chronic inflammation induces aberrant DNA methylation in colonic epithelia and forms an epigenetic field for cancerization. 第1回 GI Research Academy, 2011年6月.
 15. 南條宗八, 浅田 潔, 杉山敏郎, 牛島俊和. *H. pylori* によるエピゲノム傷害を反映した、従来より信頼性の高い胃がんリスクマーカーの同定. 第17回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2011年6月.
 16. 安藤孝将, 浅田 潔, 丹羽透, 吉田岳一, 細川歩, 杉山敏郎, 牛島俊和. 胃癌における X 染色体上の癌抑制遺伝子 *FHL1* の同定と *H.pylori* 感染による DNA メチル化異常. 第17回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2011年6月.
 17. 山下 聡, 高橋 智, 松田恭典, 形部 憲, 牛島俊和. ラット前立腺がんモデルを用いたテストステロンによる DNA メチル化異常誘発とその分

- 子機構の解明. 第 26 回発癌病理研究会, 2011 年 8 月.
18. 丹羽 透, 森 明子, 石田達也, 森 毅, 生島俊和. 大腸腸内細菌叢はマウス大腸上皮における炎症によるエピジェネティック変化の誘発に影響する. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月.
 19. Yamashita S, Takahashi S, Matsuda Y, Gyobu K and Ushijima T. Molecular mechanisms for induction of DNA methylation by testosterone overdose in the rat prostate. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2011 年 10 月.
 20. 大河内(高田)江里子, 服部奈緒子, 若林美香, 生島俊和. ANGPTL4 は血管新生抑制を介して腫瘍の進展を抑制する. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月.
 21. 浅田 潔, 安藤孝将, 生島俊和. 胃がんにおける X 染色体上のがん抑制遺伝子 FHL1 の同定. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月.
 22. 南條宗八, 浅田 潔, 山下 聡, 中島 健, 前北隆雄, 一瀬雅夫, 杉山敏郎, 生島俊和. ヘリコバクター・ピロリ菌によるエピゲノム傷害を反映した胃がんリスクマーカーの同定. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月.
 23. 安藤孝将, 杉山敏郎, 生島俊和. 胃癌における X 染色体上の癌抑制遺伝 FHL1 の同定. 第 19 回日本消化器関連学会週間, 2011 年 10 月.
 24. 生島俊和. ピロリ菌感染によるエピゲノム変化. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 2011 年 11 月.
 25. 竹島秀幸, 生島俊和. 慢性炎症による DNA メチル化異常の誘発とそのメカニズム. 蛋白質研究所セミナー「疾患における エピゲノム異常の分子機構」, 2011 年 11 月.
 26. 生島俊和. "Dynamic" Phase of Epigenome: Induction of Aberrant DNA Methylation by Inflammation. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月.
 27. 大河内(高田)江里子, 丹羽 透, 若林美香, 森 明子, 生島俊和. 高感度 DNA 脱メチル化剤検出系の開発. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月.
 28. 服部奈緒子, 丹羽 透, 生島俊和. ヒストン修飾の組合せの可視化技術の開発. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月.
 29. 竹島秀幸, 池上大悟, 若林美香, 生島俊和. 慢性炎症によるヒストン H3K27 トリメチル化異常の誘発. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月.
 30. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. 27th Annual European Association of Urology Congress, 2012.
 31. 金井弥栄. 多層オミックス解析による疾患の本態解明と臨床応用 シンポジウム 2 「オミックス解析と病理学」第 101 回日本病理学会総会, 2012.
 32. 佐藤 崇, 新井恵吏, 知久季倫, 河野隆志, 蔦 幸治, 後藤政広, 渡辺俊一, 副島研造, 別役智子, 金井弥栄. 肺多段階発がん過程における DNA メチル化の変化のゲノム網羅的解析. 第 101 回日本病理学会総会, 2012.
 33. 西山直隆, 新井恵吏, 長塩 亮, 藤元博行, 細田文恵, 柴田龍弘, 塚本泰司, 横井左奈, 井本逸勢, 稲澤譲治, 金井弥栄. 尿路上皮がんにおける染色体構造異常と臨床病理学的検討: DNA メチル化状態と染色体構造異常との関係. 第 100 回日本泌尿器科学会総会, 2012.
 34. 新井恵吏, 知久季倫, 森 泰昌, 後藤政広, 中川 徹, 藤元博行, 金井弥栄. ゲノム網羅的 DNA メチル化解析による腎臓明細胞がんの CpG アイランドメチル化形質. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会, 2012.
 35. 佐藤 崇, 新井恵吏, 知久季倫, 河野隆志, 蔦 幸治, 後藤政広, 渡辺俊一, 副島研造, 別役智子, 金井弥栄. 肺多段階発がん過程における DNA メチル化異常のゲノム網羅的解析. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会, 2012.
 36. 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", 2011.
 37. Nagashio R, Arai E, Ojima H, Kosuge T, Kondo Y, 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", 2011.
 38. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. American Association for Cancer Research. 102nd Annual Meeting, 2011.
 39. 新井恵吏, 金井弥栄. 泌尿器系腫瘍及びその背景組織のメチル化解析. ワークショップ 1 前癌病変及び背景粘膜におけるエピジェネティクス異常. 第 100 回日本病理学会総会, 2011.

40. 新井恵吏、森 泰昌、知久季倫、後藤政広、中川 徹、藤元博行、金井弥栄. 腎細胞がん発生過程における DNA メチル化異常の網羅的解析. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.
41. 長塩 亮、新井恵吏、尾島英知、小菅智男、金井弥栄. 慢性障害肝における DNA メチル化状態を指標とした発がんリスク評価の肝生検検体を用いた臨床応用. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.
42. Suzuki H. Functional consequences and clinical application of epigenetic changes in gastric cancer. 9th International Gastric Cancer Congress. Seoul, Apr, 2011. (invited)
43. Suzuki H and Toyota M. Genome-wide profiling of chromatic signatures reveals epigenetic regulation of microRNA genes in colorectal cancer. 20th KOGO annual conference. Osongsaengmyeong, Sept, 2011. (invited)
44. Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Shimizu T, Shinomura Y, Imai K and Toyota M. The origin of colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. 39th Congress of International Society for Oncology and BioMarkers. Firenze, Oct, 2011.
45. Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Shinomura Y, Imai K and Toyota M. Clinical implication of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. Seoul International Digestive Disease Symposium 2011. Seoul, November, 2011. (invited)
46. Watanabe Y, Castoro R, Toyota M, Itoh F, Issa JP. AACR2012 Chicago, April, 2012.
47. Hama R, Watanabe Y, Itoh F. AACR2012 Chicago, April 2012.
48. Watanabe Y, Toyota M, Itoh F. DDW2011 Chicago, March, 2011.
49. Oishi Y, Watanabe Y, Itoh F. DDW2011 Chicago, March, 2011.
50. Watanabe Y, Toyota M, Itoh F. 6th International Society of Gastroenterological Carcinogenesis (ISGC). Houston, January, 2011.
51. Yamada Y, Role of epigenetic modifications in multistage colon carcinogenesis, 27th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Jeju, Republic of Korea, November, 2011.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
清水 崇、鈴木 拓、豊田 実、塚本泰司. 膀胱癌細胞の検出方法、膀胱癌細胞の検出方法に用いるプライマー及び膀胱癌マーカー. 特願2011-203705、平成23年9月16日出願。
- 清水 崇、鈴木 拓、豊田 実、塚本泰司. 膀胱癌細胞の検出方法、膀胱癌細胞の検出方法に用いるプライマー及び膀胱癌マーカー. PCT/JP2012/56605、平成23年3月14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、エピジェネティック治療の基盤を確立することを目的としている。本年度は、慢性炎症による DNA メチル化異常誘発にリンパ球は不要であり、単球・マクロファージが Effector として重要である可能性が高いことを明らかにした。ラット乳がんモデルにおいて、ヒト乳がんと共通して DNA メチル化により不活化されている遺伝子 *Agptl4* を同定した。神経芽細胞腫の予後診断は、前向き試験を継続した。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を樹立することにより、DNA 脱メチル化剤のハイスループットスクリーニングを可能にした。

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；主にごん抑制遺伝子）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 CGI がメチル化される性質（CGI 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、(4) エピジェネティック治療の基盤を確立すること、を目的とする。

B. 研究方法

(1) マウス、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。C.B17/Icr-scid/scid (SCID) マウス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。

(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, Yamashita *et al.* DNA Res. 2009) 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) ゲノム網羅的な遺伝子発現解析

オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて行った。

(5) 遺伝子発現定量

リアルタイムPCRを用いた定量的RT-PCR法により行った。

(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) マウス大腸炎モデルを用いたDNAメチル化異常誘発機構の解析

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、その異常は発がんを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。さらに、DNAメチル化異常誘発の程度と発現量が相関した炎症関連遺伝子を同定した。本年度は、DNAメチル化異常誘発に関与する炎症成分の特定を進めるため、T・B細胞が遺伝的に欠損しているSCIDマウスを用いて解析を行った。SCIDマウスにDSSを飲水投与した結果、Wild typeと同様に大腸腫瘍が誘発されること、さらに大腸粘膜に同等のDNAメチル化異常も誘発されることを見出した。DSS投与後に、SCIDマウスおよびWild typeの双方で共通して発現上昇が認められる炎症関連遺伝子として、*Ifng*, *Il1b*, *Nos2*を見出した。

(2) ラット乳がんモデルにおけるDNAメチル化により不活化された遺伝子の同定

実験動物発がんモデルにおけるエピジェネティック異常は、ほとんど解析されておらず、ヒトのがんとの共通・相違点もほとんど不明である。本年度は、PhIPおよびDMBAで誘発したラット乳がんにおいて、MeDIP-CGIマイクロアレイ法と脱メチル化剤処理後の細胞株における遺伝子発現をマイクロアレイで解析する方法とを組み合わせることにより、DNAメチル化により不活化されている遺伝子をゲノム網羅的に探索した。その結果、ラット乳がんではDNAメチル化により不活化されている遺伝子 *Agptl4* を同定した。*AGPTL4*のDNAメチル化による不活化はヒト乳がんにおいても認められた(11/91, 12%)。

(3) 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184例についてCIMPの解析を行った。本年度も前向き試験を継続し、累積227例についてCIMPの解析を行った。

(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DNA脱メチル化剤スクリーニング用の細胞株の樹立を進めてきた。本年度は、DNAメチル化した *UCHL1* 遺伝子プロモーターの下流に分泌性ルシフェラーゼを接続したコンストラクトを大腸がん細胞株 HCT116 に導入した。その結果、既知のDNA脱メチル化剤(5-aza-dC)処理に反応して発光し、外来性 *UCHL1* 遺伝子プロモーターの脱メチル化が確認されたクローンを3個樹立した。さらにepigeneticな背景を揃えるためにサブクローニングを行い、高感度・高特異度にDNA脱メチル化剤の検出が可能なサブクローンを合計14個樹立した。

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。昨年度までに、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を明らかにしてきた。本年度は、マウス大腸炎モデルについてT・B細胞が欠損しているSCIDマウスにおいてもWild typeと同様にDNAメチル化異常誘発が認められたことから、DNAメチル化異常誘発にT・B細胞は不要であることが明らかになった。即ち、残る炎症細胞で *Il1b*, *Nos2* を発現する単球・マクロファージがDNAメチル化異常誘発の重要なEffectorである可能性が非常に高い。今後さらに、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を立てることができると考え、研究を進めている。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。胃がんリスク診断の大規模な前向き研究は、別途実施中である。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、前向き試験を継続している。

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

新規のDNAメチル化異常の誘発因子のスクリーニングは、ひいては新規エピジェネティック薬の開発に繋がる。本年度に樹立した細胞株を用いることにより、プレートリーダーを用いたハイスループッ

トな DNA 脱メチル化剤スクリーニングが可能になった。今後、新規の DNA 脱メチル化剤の発見を目指して、天然・合成化合物のスクリーニングを共同研究で進める。

E. 結論

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、リンパ球は不要である。がんでの DNA メチル化異常は、がんのリスクまたは病態診断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。DNA 脱メチル化誘発因子のハイスループットスクリーニングを可能にする細胞株を樹立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Nanjo S, Asada K, Yamashita S, Nakajima T, Nakazawa K, Maekita T, Ichinose M, Sugiyama T and Ushijima T. Identification of gastric cancer risk markers that are informative in individuals with past *H. pylori* infection. **Gastric Cancer**, in press.
2. Ushijima T and Hattori N. Molecular pathways: involvement of *helicobacter pylori*-triggered inflammation in the formation of an epigenetic field defect, and its usefulness as cancer risk and exposure markers. **Clin Cancer Res**, 18: 923-929, 2012.
3. Katsurano M, Niwa T, Yasui Y, Shigematsu Y, Yamashita S, Takeshima H, Lee M. S, Kim Y. J, Tanaka T and Ushijima T. Early-stage formation of an epigenetic field defect in a mouse colitis model, and non-essential roles of T- and B-cells in DNA methylation induction. **Oncogene**, 31: 342-351, 2012.
4. Takeshima H, Yamashita S, Shimazu T and Ushijima T. Effects of genome architecture and epigenetic factors on susceptibility of promoter CpG islands to aberrant DNA methylation induction. **Genomics**, 98: 182-188, 2011.
5. Cai LY, Izumi S, Abe M, Imura M, Yasugi T, Wakazono K, Ohnuki Y, Kondo A and Ushijima T. Does aberrant DNA methylation occur in human uterine leiomyomas? An Attempt of Genome-Wide Screening by MS-RDA. **Tokai J Exp Clin Med**, 36: 84-90, 2011.
6. Hattori N, Okochi-Takada E, Kikuyama M, Wakabayashi M, Yamashita S and Ushijima T. Methylation silencing of angiopoietin-like 4 in rat and human mammary carcinomas. **Cancer Sci**, 102: 1337-1343, 2011.

本研究費に密接に関係するもの

1. Lee YC, Wang HP, Wang CP, Ko JY, Lee JM, Chiu HM, Lin JT, Yamashita S, Oka D, Watanabe N, Matsuda Y, Ushijima T and Wu MS. Revisit of field cancerization in squamous cell carcinoma of upper aerodigestive tract: better risk assessment with epigenetic markers. **Cancer Prev Res**, 4: 1982-1992, 2011.
 2. Kong D, Piao YS, Yamashita S, Oshima H, Oguma K, Fushida S, Fujimura T, Minamoto T, Seno H, Yamada Y, Satou K, Ushijima T, Ishikawa TO and Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. **Oncogene**, in press.
 3. Ushijima T and Yoshida T. Field cancerization in gastric cancer. In: Dakubo GD (ed), Field cancerization: basic science and clinical applications. USA, Nova Science Publishers, 187-199, 2011.
- ##### 2. 学会発表
1. Ushijima T. Dynamic aspects of epigenome - induction of aberrant DNA methylation by carcinogenic bacterial infection. 11th Belgian Society of Human Genetics Meeting. Louvain-la-Neuve, March, 2011.
 2. Ushijima T. Aberrant DNA methylation and gastric cancer. 9th International Gastric Cancer Congress. Seoul, April, 2011.
 3. Ushijima T. Epigenetic risk diagnosis of gastric cancer, and its molecular basis. 4th Annual Scientific Meeting of The Singapore Gastric Cancer Consortium. Singapore, July, 2011.
 4. Ushijima T. Induction of aberrant DNA methylation by *Helicobacter pylori* infection - its use as cancer risk diagnosis and molecular mechanisms. Japanese-German Cancer Workshop. Hiroshima, September, 2011.
 5. Hattori N, Okochi-Takada E, Kikuyama M, Wakabayashi M, Yamashita S, Watanabe N and Ushijima T. Identification of genes with promoter methylation in rat mammary carcinomas by a combination of DNA methylation microarray and expression microarray. International Symposium "Sex-differences in Epigenetics and Epigenomics". Tokyo, September, 2011.
 6. Ushijima T. Basic and translational aspects of epigenetic field for cancerization. France-Japan Symposium on Cancer Research 2011. Tokyo, November, 2011.
 7. Ushijima T. The *H. pylori* infection- inflammation-DNA methylation- gastric cancer pathway. The 21st HCS - The 5th Three Universities'

- Consortium International Symposium. Hiroshima, November, 2011.
8. 牛島俊和. エピジェネティクスとがん予防. 第10回分子予防環境医学研究会大会, 2011年1月.
 9. 服部奈緒子, 大河内(高田)江里子, 菊山みずほ, 若林美香, 山下 聡, 渡邊直子, 牛島俊和. 網羅的 DNA メチル化解析および遺伝子発現解析を用いたラット乳がんでの異常 DNA メチル化の同定. 平成 22 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ, 2011年2月.
 10. 牛島俊和, 丹羽 透. エピジェネティックな胃発がんの素地とその形成機構. 第100回日本病理学会総会, 2011年4月.
 11. 牛島俊和. 人生を刻むエピゲノム変化. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011年5月.
 12. 牛島俊和, 丹羽 透. エピジェネティック異常のがん予防における有用性— 新たながん予防効果予測マーカーとして、また、予防の作用点として. がん予防大会 2011, 2011年6月.
 13. 牛島俊和. *H. pylori* の特殊能力: DNA メチル化異常を誘発する炎症の誘発. 第17回日本ヘリコバクター学会, 2011年6月.
 14. 丹羽 透, 桂野美貴, 森 明子, 牛島俊和. Chronic inflammation induces aberrant DNA methylation in colonic epithelia and forms an epigenetic field for cancerization. 第1回 GI Research Academy, 2011年6月.
 15. 南條宗八, 浅田 潔, 杉山敏郎, 牛島俊和. *H. pylori* によるエピゲノム傷害を反映した、従来より信頼性の高い胃がんリスクマーカーの同定. 第17回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2011年6月.
 16. 安藤孝将, 浅田 潔, 丹羽 透, 吉田岳一, 細川歩, 杉山敏郎, 牛島俊和. 胃癌における X 染色体上の癌抑制遺伝子 *FHL1* の同定と *H.pylori* 感染による DNA メチル化異常. 第17回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2011年6月.
 17. 山下 聡, 高橋 智, 松田恭典, 形部 憲, 牛島俊和. ラット前立腺がんモデルを用いたテストステロンによる DNA メチル化異常誘発とその分子機構の解明. 第26回発癌病理研究会, 2011年8月.
 18. 丹羽 透, 森 明子, 石田達也, 森 毅, 牛島俊和. 大腸腸内細菌叢はマウス大腸上皮における炎症によるエピジェネティック変化の誘発に影響する. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月.
 19. Yamashita S, Takahashi S, Matsuda Y, Gyobu K and Ushijima T. Molecular mechanisms for induction of DNA methylation by testosterone overdose in the rat prostate. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2011年10月.
 20. 大河内(高田)江里子, 服部奈緒子, 若林美香, 牛島俊和. ANGPTL4 は血管新生抑制を介して腫瘍の進展を抑制する. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月.
 21. 浅田 潔, 安藤孝将, 牛島俊和. 胃がんにおける X 染色体上のがん抑制遺伝子 *FHL1* の同定. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月.
 22. 南條宗八, 浅田 潔, 山下 聡, 中島 健, 前北隆雄, 一瀬雅夫, 杉山敏郎, 牛島俊和. ヘリコバクター・ピロリ菌によるエピゲノム傷害を反映した胃がんリスクマーカーの同定. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月.
 23. 安藤孝将, 杉山敏郎, 牛島俊和. 胃癌における X 染色体上の癌抑制遺伝子 *FHL1* の同定. 第19回日本消化器関連学会週間, 2011年10月.
 24. 牛島俊和. ピロリ菌感染によるエピゲノム変化. 日本人類遺伝学会第56回大会, 2011年11月.
 25. 竹島秀幸, 牛島俊和. 慢性炎症による DNA メチル化異常の誘発とそのメカニズム. 蛋白質研究所セミナー「疾患における エピゲノム異常の分子機構」, 2011年11月.
 26. 牛島俊和. "Dynamic" Phase of Epigenome: Induction of Aberrant DNA Methylation by Inflammation. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月.
 27. 大河内(高田)江里子, 丹羽 透, 若林美香, 森 明子, 牛島俊和. 高感度 DNA 脱メチル化剤検出系の開発. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月.
 28. 服部奈緒子, 丹羽 透, 牛島俊和. ヒストン修飾の組合せの可視化技術の開発. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月.
 29. 竹島秀幸, 池上大悟, 若林美香, 牛島俊和. 慢性炎症によるヒストン H3K27 トリメチル化異常の誘発. 第34回日本分子生物学会年会, 2011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

本研究は、組織検体におけるゲノム網羅的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する。昨年度までに、腎組織検体において高解像度・高密度ビーズチップを用いたゲノム網羅的DNAメチル化解析を施行し、前がん段階からDNAメチル化異常が蓄積し、臨床病理学的に悪性度の高いがんを生じるCpGアイランドメチル化形質 (CIMP) 陽性の症例群を同定していた。

CIMP陽性症例群は陰性群に比して有意に予後不良であったことから、本年度は、腎特異的なCIMPマーカー遺伝子の同定を試みた。検討の対象とした非がん腎組織検体において例外なくDNAメチル化率が低値であり、CIMP陽性腎細胞がんとは陰性腎細胞がんの間でDNAメチル化亢進の程度に顕著な差があるCpG部位に着目し、またランダムフォレスト解析も併用して、17遺伝子の18CpG部位をCIMPマーカーと同定した。現在CIMPマーカーとなるCpG部位におけるDNAメチル化状態を指標として、腎細胞がん症例の予後診断法の開発を進めている。手術検体を用いた臨床検査としての実用化を目指し、検証コホート症例の収集も行っている。

さらに、網羅的DNAメチル化解析と網羅的発現解析の結果を照合し、DNAメチル化異常が高頻度に発現異常に帰結する遺伝子群において、MetaCoreソフトウェアによるGeneGoパスウェイ解析を施行した。細胞接着・免疫応答・Gタンパク質経路等を含む9分子経路が、腎発がんに関連する可能性が示唆された。特に、タイト結合に関連する細胞接着分子ファミリー遺伝子群のDNAメチル化亢進による発現低下が、腎発がんに関連する重要な寄与をなす可能性が示された。さらに、既に同一組織検体において行っていた網羅的変異解析の結果を照合したところ、同一遺伝子の変異が上記9分子経路中4分子経路に共通して寄与することがわかった。同遺伝子の変異は、既に腎がんに関連する適用が認められている分子標的治療薬の、奏効性マーカーとなる可能性があると考えられた。

DNAメチル化異常の網羅的解析結果を、ゲノム・トランスクリプトーム解析等と照合することにより、発がんの分子経路の理解が進展し、診断薬・治療薬創薬標的の同定等の臨床応用が進むことが期待される。

A. 研究目的

本研究は、組織検体におけるゲノム網羅的 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する。昨年度までに、正常腎組織・腎細胞がん症例より得られた非がん腎組織（組織学的に特記すべき所見を示さないが、DNAメチル化異常が蓄積する前がん段階にある）・腎細胞がん組織において、1塩基解像度の高密度ビーズチップを用いたゲノム網羅的 DNAメチル化解析を施行した。前がん段階から DNAメチル化異常が蓄積し、臨床病理学的に悪性度の高いがんを生じる CpG アイランドメチル化形質

(CIMP) 陽性の症例群を同定している。本年度は、腎細胞がんに関連する特異的な CIMPマーカー遺伝子の DNAメチル化状態を指標とする腎細胞がん症例の予後診断法の開発と、DNAメチル化異常を介して腎発がんに関連する可能性のある分子経路の同定を目指した。

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、正常腎組織検体を採取した。腎細胞がん（淡明細胞がん）症例の腎摘除術標本より、非がん腎組織検体 (N)ならび

に腎細胞がん組織検体 (T) 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 DNA 500ng を、EZ DNA methylation Kit (Zymo Research) を用いてバイサルファイト変換し、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。各 CpG 部位に対する DNA メチル化率は、 β 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。 $\Delta\beta$ ($\beta_T - \beta_N$) が 0.2 以上である場合、T において同一症例の N に比しその CpG 部位の DNA メチル化が亢進しているを見なした。 $\Delta\beta$ ($\beta_T - \beta_N$) が -0.2 以下である場合、T において同一症例の N に比しその CpG 部位の DNA メチル化が減弱しているを見なした。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。また、DNA メチル化状態と、無再発生存率・全生存率との相関を検討した。

同一組織検体より抽出した全 RNA 200ng を、SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60K microarray (Agilent Technologies) を用いた網羅的発現解析に供した。各遺伝子の発現量 (E 値) は、 \log_2 -シグナル強度 (当該検体の全プローブにおけるシグナル強度の中央値で補正) で表した。同一遺伝子に対する複数のプローブがアレイに搭載されている場合は、全プローブに対する \log_2 -シグナル強度の平均値を、その遺伝子の E 値とした。 ΔE ($E_T - E_N$) が 4 以上である場合、T において同一症例の N に比しその遺伝子の発現が亢進しているを見なした。 ΔE ($E_T - E_N$) が -4 以下である場合、T において同一症例の N に比しその遺伝子の発現が減弱しているを見なした。

分子経路探索は、MetaCore ソフトウェア (<http://www.genego.com>) を用いて行い、 $P < 0.05$ をもって、その分子経路が腎臓がんに関連する可能性があると見なした。

(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 による網羅的 DNA メチル化解析で、昨年度までに、前がん段階から DNA メチル化異常が蓄積し、検討の対象としたあらゆる臨床病理学的因子と有意に相関する (臨床病理学的に悪性度の高い) CIMP 陽性症例群を同定していた。CIMP 陽性群においては、無再発生存率ならびに全生存率が、陰性群に比し有意に低値であった。再現性を持って腎細胞がんの CIMP を診断出来るようになれば、腎臓がんの分子機構の理解が進むと期待された。また、CIMP 陽性群は予後不良であることから、CIMP マーカー遺伝子の DNA メチル化状態は、予後診断指標となり得ると期待された。そこで、腎臓がん特異的な CIMP マーカー遺伝子の同定を試みた。

全症例・全プローブの DNA メチル化状態について β 値の散布図を作製して概観したところ、N において β 値が特に低値であり、T において同一症例の N に比して特に DNA メチル化亢進が顕著であるプローブ群が、CIMP 陽性症例に蓄積していることが分かった。これらのプローブ群から CIMP マーカーを同定すれば、CIMP 陽性・陰性群間の DNA メチル化率の差が大きく、診断閾値の設定と両群の判別が容易になると期待された。そこで、(i) 全 N 検体における平均 β 値が 0.2 以下で、(ii) $\Delta\beta$ ($\beta_T - \beta_N$) が 0.4 以上である頻度が CIMP 陽性症例において陰性症例に比して有意に高く ($P < 1.98 \times 10^{-6}$, フィッシャー検定)、 $\Delta\beta$ ($\beta_T - \beta_N$) が 0.4 以上である頻度が CIMP 陽性群において 43%以上であるが、CIMP 陰性群において 2%以下である、15 遺伝子 (FAM150A, GRM6, ZNF540, ZFP42, ZNF154, RIMS4, PCDHAC1, KHDRBS2, ASCL2, KCNQ1, PRAC, WNT3A, TRH, FAM78A, ZNF671) の 16CpG 部位に着目した。さらに、 $\Delta\beta$ ($\beta_T - \beta_N$) が CIMP 陽性・陰性群間で有意に異なる (false discovery rate [q=0.01]) 869 プローブを用いて、2 群の分類器を同定するためのランダムフォレスト解析を施行したところ、4 遺伝子の 4CpG 部位が両群の判別に有用であることが示された。これらのうち、2 遺伝子の 2CpG 部位は、上記 (i)-(iii) の基準とランダムフォレスト解析の双方で、両群の判別に有用であることが示された。すなわち、17 遺伝子 18CpG 部位が、CIMP マーカーであると考えられた。

現在 CIMP マーカーとして同定した CpG 部位と、同一の CpG アイランドに属する近傍の CpG 部位の DNA メチル化率を、Infinium 解析とは異なるプラッ

トフォーム (質量分析計を基盤とする MassARRAY 法 [SEQUENOM])で検証すると共に、診断閾値を設定して臨床検査としての最適化を行っている。最適化は Infinium 解析に用いたのと同じの組織検体 (学習コホート)で行っているが、検証コホート 110 症例の組織検体の収集も既に終えている。

DNA メチル化の変化が実際の発現変化に帰結し、腎臓がんに関連する分子経路を知るために、網羅的 DNA メチル化解析と網羅的発現解析の結果の照合を行った。すなわち、Infinium HumanMethylation27 Bead Array と SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60K microarray の全プローブを、ヒトリファレンスゲノム配列 (UCSC human genome 19)にアラインメントし、DNA メチル化と発現のプローブセットを各遺伝子に注釈づけした。Infinium HumanMethylation27 Bead Array のプローブが、遺伝子の 5'領域 (プロモーター・エクソン 1・イントロン 1 を含む)に位置し、1 症例 (T・N1 組)において $\Delta\beta$ ($\beta_T - \beta_N$)が 0.2 以上 (DNA メチル化亢進)かつ ΔE ($E_T - E_N$)が -4 以下 (発現減弱)である場合、down-regulation スコア 1 とした。Infinium HumanMethylation27 Bead Array のプローブが遺伝子の 5'領域に位置し、1 症例 (T・N1 組)において $\Delta\beta$ ($\beta_T - \beta_N$)が -0.2 以下 (DNA メチル化減弱)かつ ΔE ($E_T - E_N$)が 4 以上 (発現亢進)である場合、up-regulation スコア 1 とした。

Down-regulation スコアが 5 以上 である (DNA メチル化亢進が発現減弱に高頻度に帰結している可能性がある)遺伝子が 87、up-regulation スコアが 5 以上 である (DNA メチル化減弱が発現亢進に高頻度に帰結している可能性がある)遺伝子が 28 存在した。既に行っていたエクソーム解析ならびに SNP アレイ解析で、1 塩基変異、欠失・挿入型変異あるいは遺伝子内染色体断裂を高頻度に認める遺伝子と共に MetaCore ソフトウェアによる GeneGo パスウェイ解析に供したところ、9 分子経路が腎臓がんに関連する可能性が示唆された (投稿中)。9 分子経路には細胞接着・免疫応答・G タンパク質経路等が含まれていた。特にタイト結合に関連する細胞接着分子 A ファミリーを構成する複数の遺伝子の、DNA メチル化亢進による発現低下が、腎臓がんに関連する重要な寄与をなす可能性が示された。9 分子経路中 4 分子経路には、遺伝子 B の変異が共通して寄与する可能性が示されたが、遺伝子 B には既に有効な阻害剤が開発されている。また、諸臓器の腎臓がんに関連することがよく知られているが腎臓における破綻機構が不明確であった分子経路 C の、腎臓がん過程における破綻の分子機構が、既に行っていたエクソーム解析で明らかになっていった。これに、網羅的 DNA メチル化解析と網羅的発現解析の結果を重ねたところ、DNA メチル化異常による遺伝子 D の不活化も、分子経路 C の alternative な破綻機構を高頻度に提供している可能性が示唆された (投稿中)。

D. 考察

発がん過程で起こった DNA メチル化異常は、維持メチル化機構により DNA2 重鎖上に共有結合で安定に保持されるため、高感度の定量解析等の再現性が高く、タンパク質発現等に比しても、診断マーカーとして概して優れていると考えられる。

腎臓がんは労働人口に属する壮年期にもしばしば発生し、腎摘除術で根治する症例群が大勢をなす反面、急速に遠隔転移を来す症例群も明らかに存在し、両者の臨床経過には大きな差がある。さらに、転移しても免疫療法・分子標的治療薬等が奏効する症例が知られている。再発の可能性が高い症例は密に経過観察して再発を早期に診断し、後療法を追加すれば予後が改善できる可能性がある。しかし、病理組織学的に低異型度で最もありふれた組織型である淡明細胞がんに関連しながら急速に遠隔転移を来す症例が経験され、既存の臨床病理学的因子等による予後予測はほぼ不能である。

本研究で開発を進めている DNA メチル化異常に基づく予後診断法においては、予後不良 (CIMP 陽性)群とそうでない群との間で CIMP マーカーの DNA メチル化率の差が大きいため、病院の検査室等でも容易に診断を実施できると期待される。また、腎臓がん手術検体から、患者に余分な侵襲を加えることなく、予後診断に用いるゲノム DNA を豊富に抽出できる。よって、上記 17 遺伝子の 18CpG 部位における DNA メチル化率を評価することは、治療成績の向上を目指した新規腎臓がん予後診断法 (臨床検査)として有用と考えられた。他方では、再現性よく CIMP 陽性症例を同定出来るようになったことで、CIMP を規定する遺伝子変異や、CIMP を誘導しやすい発がん要因等の同定が進むことが期待された。

網羅的 DNA メチル化解析の結果を発現解析結果と照合することにより、腎臓がんの分子経路の理解を進めることができた。特に、遺伝子 B の阻害剤は、腎臓がんへの適用も既に認められている。しかし、遺伝子 B そのものの変異の頻度が他臓器において高くないこと等から、一般に、遺伝子 B の異常が阻害剤の奏効性指標となるとは考えられていなかった。分子標的薬適用の決定に際し、遺伝子 B の変異検索等が有用である可能性を、更に検討する必要があると考えられた。Down-regulation スコア・up-regulation スコアが高値である遺伝子群の機能解析等から、創薬標的の同定が進むことが期待される。

E. 結論

CIMP マーカーにおける DNA メチル化状態を指標とする腎臓がんの予後診断法の、確立ならびに実用化を目指したい。DNA メチル化異常の網羅的解析結果を、ゲノム・トランスクリプトーム解析等と照合することにより、発がん経路の理解が進展し、診

断薬・治療薬創薬標的の同定等の臨床応用が進むことが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Arai E, Chiku S, Mori T, Gotoh M, Nakagawa T, Fujimoto H and Kanai Y. Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. **Carcinogenesis**, in press.
2. 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**, 129: 1170-1179, 2011.

本研究費に密接に関係するもの

1. Arai E, Nakagawa T, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H and Kanai Y. DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. **Histopathology**, 60: E12-18, 2012.
2. Kanai Y and Arai E. DNA methylation alterations in human cancers. In: Epigenetics in Human Disease. ed. Tollefsbol T. Elsevier, in press.
3. Watanabe T, Ishihara K, Hirose A, Watanabe S, Hino S, Ojima H, Kanai Y, Sasaki Y and Nakao M. Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in the human tumor necrosis factor/lymphotoxin locus in hepatocellular carcinoma cells. **Mol Cell Biol**, 32: 1529-1541, 2012.
4. Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A and Noda T. Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. **Genome Res**, 22: 208-219, 2012.

2. 学会発表

1. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. 27th Annual European Association of

Urology Congress, 2012.

2. 金井弥栄. 多層のオミックス解析による疾患の本態解明と臨床応用 シンポジウム 2「オミックス解析と病理学」第 101 回日本病理学会総会、2012.
3. 佐藤 崇、新井恵吏、知久季倫、河野隆志、蔦 幸治、後藤政広、渡辺俊一、副島研造、別役智子、金井弥栄. 肺多段階発がん過程における DNA メチル化の変化のゲノム網羅的解析. 第 101 回日本病理学会総会、2012.
4. 西山直隆、新井恵吏、長塩 亮、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、塚本泰司、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、金井弥栄. 尿路上皮がんにおける染色体構造異常と臨床病理学的検討: DNA メチル化状態と染色体構造異常との関係. 第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012.
5. 新井恵吏、知久季倫、森 泰昌、後藤政広、中川徹、藤元博行、金井弥栄. ゲノム網羅的 DNA メチル化解析による腎臓明細胞がんの CpG アイランドメチル化形質. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会、2012.
6. 佐藤 崇、新井恵吏、知久季倫、河野隆志、蔦 幸治、後藤政広、渡辺俊一、副島研造、別役智子、金井弥栄. 肺多段階発がん過程における DNA メチル化異常のゲノム網羅的解析. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会、2012.
7. 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”, 2011.
8. Nagashio R, Arai E, Ojima H, Kosuge T, Kondo Y, 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”, 2011.
9. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. American Association for Cancer Research. 102nd Annual Meeting, 2011.
10. 新井恵吏、金井弥栄. 泌尿器系腫瘍及びその背景組織のメチル化解析. ワークショップ 1 前癌病変及び背景粘膜におけるエピジェネティクス異常. 第 100 回日本病理学会総会、2011.
11. 新井恵吏、森 泰昌、知久季倫、後藤政広、中川徹、藤元博行、金井弥栄. 腎細胞がん発生過程における DNA メチル化異常の網羅的解析. 第 5

- 回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.
12. 長塩 亮、新井恵吏、尾島英知、小菅智男、金井
弥栄. 慢性障害肝における DNA メチル化状態
を指標とした発がんリスク評価の肝生検検体を用いた臨床応用. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし