

201220002A (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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牛島 俊和

平成25年(2013)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<br>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<br>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<br>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<br>不活化される新規遺伝子の同定        | .....20 |
|     | 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<br>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                                       |         |

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、炎症によりヒストン H3 のリジン 27 トリメチル化 (H3K27me3) 修飾が誘導され、その後天的な H3K27me3 修飾異常も、DNA メチル化異常の誘因となることを見出した。*Nanog* 遺伝子を発現する大腸腫瘍由来の初期化細胞は分化誘導により、栄養外胚葉への分化を示し、腫瘍性増殖能を失って胎盤組織の一部に組み込まれることを明らかにした。胃がんにおいて、CpG アイランドメチル化形質(CIMP)とがん遺伝子の変異が関連していることを示した。X 染色体上のがん抑制遺伝子 *FHL1* を同定した。*NTSR1* のメチル化は大腸がんの浸潤性と逆相関することを示した。MassARRAY プラットフォームを用いて CIMP 陽性腎細胞がんを判別することによる、腎細胞がん予後診断マーカーパネルを開発した。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。神経芽細胞腫の予後診断を継続して実施している。DNA 脱メチル化剤のハイスループットスクリーニングを共同研究で開始した。

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・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  
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* (ピロリ菌) 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。細胞初期化因子の発現のコントロールが可能なマウスとして、昨年度の本研究で作成した、山中4因子をドキシサイクリンによる遺伝子発現系を利用してコントロールするトランスジェニックマウス(「初期化可能マウス」)を用いた。ヒト細胞株は、ATCC から購入または JCRB から分与をうけた。

### (2) マウス大腸腫瘍細胞の初期化と分化

初期化可能マウスを *Apc*<sup>Mim/+</sup> マウスと交配し、dextran sodium sulfate (DSS) を投与することでドキシサイクリンにより初期化因子誘導可能な大腸腫瘍を得た。試験管内でドキシサイクリンを添加することで *Nanog* 遺伝子を発現する大腸腫瘍由来の初期化細胞 (reprogrammed tumor cells; RT 細胞) を得た。

大腸腫瘍由来 RT 細胞の試験管内分化誘導は、血清存在下、LIF およびフィーダー細胞非存在下で行った。生体内での分化誘導は、GFP でラベルした RT 細胞をマウス初期胚(8 細胞期)にマイクロインジェクションすることにより行った。

### (3) ゲノム網羅的な DNA メチル化解析

ヒトのサンプルから抽出したゲノム DNA の網羅的メチル化解析には、Illumina 社の(1) Infinium HumanMethylation27 または(2) HumanMethylation450 beadchip、あるいは(3) Methylated CpG island amplification microarray (MCAM)法の、3通りの方法を使い分けた。

Infinium を用いた解析では、重亜硫酸処理したゲノム DNA を増幅後 HumanMethylation27 では 27,578

CpG 部位、HumanMethylation450 では 482,421 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、iSCAN (Illumina) スキャナを用いてデータを取得した。完全メチル化を 1、完全非メチル化を 0 とする  $\beta$  値を用いて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。

### (4) 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、シーケンシング法、pyrosequencing 法、MassARRAY 法により解析した。MasARRAY 法においては、得られた質量分析結果を、解析ソフトウェア EpiTYPER (SEQUENOM)を用いて、リファレンス配列にアラインメントし、メチル化 DNA に由来する RNA 断片と非メチル化 DNA に由来する RNA 断片との質量の比から、DNA メチル化率を算出した。

### (5) ゲノム網羅的なヒストン修飾解析

特定のヒストン修飾に特異的な抗体を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP)した産物を、シーケンシング(ChIP-seq)あるいはマイクロアレイ(ChIP-chip)を用いることにより網羅的に解析した。

### (6) ゲノム網羅的な遺伝子発現解析、ゲノムコピー数異常解析

オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて行った。

### (7) 遺伝子および noncoding RNA 発現定量解析

リアルタイム PCR を用いた定量的 RT-PCR 法により行った。

### (8) 遺伝子変異解析

Life Technologies 社の Ion AmpliSeq Cancer Panel Kit および 36 個のカスタムプライマーを用いて 55 個のがん関連遺伝子をカバーする 226 種の増幅産物から成るライブラリーを作成し、Life Technologies 社の Ion 316 chip および Ion PGM Sequencer を用いて塩基配列を決定した。マッピングと変異アレル頻度の解析は CLC bio 社の CLC Genomics Workbench を用いて行った。変異が認められた領域は個別に増幅し、ジデオキシ法により塩基配列を確認した。

### (9) 胃洗浄液の回収

EMR: Endoscopic mucosal resection/ ESD: Endoscopic submucosal dissection 治療の適応となる症例の治療前後(治療直前および、治療 1 週間後の内視鏡観察時)から採取した洗浄廃液を回収した。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新規に作成した 250mL 専用採取管を用いて胃洗浄液を回収した。

### (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

炎症による DNA メチル化異常の誘発機構の解析を目的として、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、その異常は発がんによらば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。さらに、T・B 細胞が遺伝的に欠損している SCID マウスにおいても、大腸粘膜に Wild type と同等の DNA メチル化異常も誘発されることを見出し、DNA メチル化異常誘発には T・B 細胞は不要であることを示してきた。

本年度は、同様のマウスモデルにおいて、誘発された腫瘍での H3K27me3 修飾異常を同定、この異常は、炎症に暴露した直後に誘発され、その後炎症が消失した後も長期間持続することを見出した。さらに、H3K27 me3 の上昇が見られた遺伝子に関して、DNA メチル化レベルを調べたところ、一部の遺伝子 (*Dapk1*) において DNA メチル化異常が誘発されることを見出した。

#### 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、初期化可能マウスを *Apc* Min マウスと交配し、dextran sodium sulfate (DSS) を投与することで得られた大腸腫瘍に試験管内でドキシサイクリンを添加することにより、*Nanog* 遺伝子を発現する大腸腫瘍由来の初期化細胞 (reprogrammed tumor cells; RT 細胞) を樹立した。

本年度は、RT 細胞を分化誘導培養条件で培養すると栄養外胚葉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確認した。*Cdx2* 遺伝子の発現上昇が大腸腫瘍の *Apc* 遺伝子欠損に関連するかを確認するために、*Apc* 遺伝子欠損 ES 細胞を作製した。*Cdx2* 遺伝子の発現上昇は *Apc* 遺伝子欠損 ES 細胞でも確認され、*Apc* 遺伝子の欠損が *Cdx2* 遺伝子発現上昇の原因となっていることが明らかになった。

大腸腫瘍由来の RT 細胞を 8 細胞期のマウス初期胚にマイクロインジェクションすることで、大腸腫瘍由来 RT 細胞が胎盤組織へと分化することが確認された。胎盤組織に分化した大腸腫瘍細胞由来 RT 細胞は、Ki67 免疫染色にて腫瘍性増殖能を失っていることが示唆された。一方で初期胚に注入した RT 細胞は胎児成分には寄与しておらず、RT 細胞は栄養外胚葉への分化能を有するものの、体細胞への分化能を持たないことが示唆された。

#### (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 胃がんにおける CIMP とがん遺伝子変異の関係

がんでのエピジェネティック異常の全体像の解明を目的として、昨年度までに、大腸がんエピゲノム解析、microRNA (miRNA) 遺伝子のエピジェネティックな異常の解析、大腸がん・胃がん・乳がん・膀胱がんにおけるメチル化異常の同定を行ってきた。本年度は、30 個の胃がんについて、DNA メチル化のゲノム網羅的解析および 55 個のがん関連遺伝子についての変異解析を行った。その結果、個々の胃がんにおける異常メチル化を示す遺伝子数は広範囲に分布していること、30 個中 19 個の胃がんには 8 種の遺伝子 (*CDH1*, *CTNBN1*, *ERBB2*, *KRAS*, *MLH1*, *PIK3CA*, *SMARCB1*, *TP53*) について変異が認められることを示した。さらに、CIMP 陽性の胃がんは、がん遺伝子の変異も持つ傾向があることを見出した。また、大腸がんにおいてメチル化異常を示す long ncRNA (lncRNA) 遺伝子の同定を進め、大腸がんにおいてメチル化異常を受けるが、正常大腸ではメチル化されていない lncRNA 遺伝子を新規に 2 個同定した。

##### 2-2 X 染色体上のがん抑制遺伝子 *FHL1* の同定

昨年度までに、*ANGPTL4* 遺伝子は、腫瘍の血管新生を抑制し、変異および DNA メチル化の双方で不活化されるがん抑制遺伝子であることを示してきた。また、DNA メチル化異常誘発機構の解析によりメチル化抵抗性と判定された遺伝子の中に、がんではメチル化により不活化されるがん抑制遺伝子が例外的に含まれることを示し、この事実を応用してがん抑制遺伝子の新規同定法 (Outlier Approach) を開発した。

本年度は、常染色体上の遺伝子とは異なり、1 回のヒットで不活化しうる X 染色体上の遺伝子に着目

して研究を進めた。*FHL1* 遺伝子は、胃癌細胞株 AGS でメチル化によりサイレンシングされている遺伝子の1つであり、ピロリ菌感染によってメチル化が誘発されること、健常者より胃癌患者でメチル化レベルが高いことを見出した。また、sh-RNA を用いて *FHL1* をノックダウンしたがん細胞株を用いた *in vitro*, *in vivo* の解析の結果、*FHL1* はがんの増殖を抑制することを示した。さらに、大腸がんにおいて突然変異(Lys214Asn)が存在することを見出し、Invasion assay 等により、この変異により活性が喪失することを示した。

### 2-3 大腸がん浸潤と相関する *NTSR1* のメチル化

大腸がんの浸潤・転移に關与する遺伝子メチル化を明らかにするため、側方進展型で非浸潤性の大腸がん臨床例と、浸潤性大腸がん臨床例のメチル化を MCAM 法によりゲノム網羅的に比較した。その結果、ニューロテンシン受容体1型 (*NTSR1*) 遺伝子のメチル化は、非浸潤性がんにおいて高度だが、浸潤がんでは低レベルであることを示した。*NTSR1* の過剰発現によって大腸がん細胞のコロニー形成および浸潤能が増加し、逆に *NTSR1* のノックダウンによってコロニー形成および浸潤能の抑制が認められた。また *NTSR1* のメチル化を示さない大腸がん症例は、メチル化を示す症例と比較して予後不良であった。

## (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、ピロリ菌感染陰性者では、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ので、腎細胞がん固有の CIMP マーカー遺伝子17個を同定した。

今年度は、これまでの Infinium 解析とは異なるプラットフォームである MassARRAY 法で、DNA メチル化率の技術的検証を行った。CIMP マーカー17遺伝子のプロモーター領域の配列中の全ての CpG 部位について定量性が良好であるような至適 PCR 条件を探索した結果、CIMP マーカー14遺伝子において、至適条件で MassARRAY 解析を実施できることが明らかになった。また、これら CIMP マーカー14遺伝

子全ての、プロモーター領域全域に亘って、CIMP 陽性症例においてのみ高度の DNA メチル化が維持されていることが明らかになった。

CIMP 陰性腎細胞がん88症例と、CIMP 陽性腎細胞がん14症例の組織検体において MassARRAY 解析を実施し、14遺伝子の312CpG部位における DNA メチル化率を定量した。受信者動作特性曲線 (ROC) 解析により、算出した Area under curve (AUC) が 0.95 より大きい32 CpG 部位についてみると、各 CpG 部位単独で CIMP 陽性群を診断する際の感度・特異度はそれぞれ83.3%以上・98.5%以上であった。さらに、32 CpG 部位の診断閾値を組み合わせて CIMP 診断指標を策定したところ、14腎細胞がん症例を感度・特異度とも100%で CIMP 陽性であると診断することができた。

現在、検証コホートの腎細胞がん100症例において MassARRAY 解析を実施している。また検証コホートの臨床病理学的因子ならびに予後情報の収集を概ね終えており、本研究期間内に CIMP 診断の予後診断法としての有用性の検証を終了できると期待される。さらに、前向き検証コホートの登録も既に行っている。

他方で、MassARRAY 法は研究目的の解析に際しては定量性に優れているが、大型で高額な機器を要し、解析手技は煩雑で、少数症例ごとの解析に適さない。そこで、エピゲノム診断の病院における臨床検査としての実用化のために、専用診断機器等の開発に向けて、企業との共同開発研究を開始した。

### 3-2 胃洗浄廃液由来 DNA を用いた胃癌の存在診断

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*) による胃癌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、早期胃癌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2年目経過中である。

### 3-3 CIMP による神経芽細胞腫の予後診断

これまでに、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

昨年度までに、新規の DNA メチル化異常の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ために、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、クローン化を進めてきた。本年度は、企業との共同研究により、新規脱メチル化剤のスクリーニングを開始した。

### 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、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こと、を示してきた。本年度は、DSS 投与マウス大腸炎モデルにおいて H3K27me3 修飾異常を同定、H3K27 me3 の上昇が見られた遺伝子の一部で DNA メチル化異常が誘発されることを見出した。本研究により、元々もっている H3K27me3 修飾のみならず、炎症などにより獲得した後天性の H3K27me3 異常も、DNA メチル化異常の誘因となることが始めて示された。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られる。

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。これまでの研究により、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。本年度の研究により、樹立した初期化細胞株 (Nanog 陽性 RT 細胞) が栄養外胚葉への分化能を有することが示された。胎盤に分化転換した大腸腫瘍細胞は、その腫瘍性増殖能を失い増殖を停止することが明らかとなり、腫瘍発生に十分な遺伝子変異を有する腫瘍細胞であっても、その分化状態の変化により腫瘍細胞の性質が大きく変化することが示された。この結果は、エピジェネティック修飾状態ががん細胞の性質決定に重要な役割を果たしていることを示し、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。さらには、エピジェネティック修飾状態を標的とした腫瘍細胞の分化転換ががん治療に応用可能であることを示唆する結果と考えられた。

一方で、腫瘍細胞におけるエピゲノム異常の起源解明には、大腸腫瘍由来 RT 細胞の大腸上皮へと分化誘導し、その過程でのエピゲノム解析が必要である。しかしながら、RT 細胞は体細胞への分化能を持

たないことが明らかになりつつある。大腸腫瘍細胞における *Apc* 遺伝子の欠損がその原因になっている可能性を考えており、今後は樹立された RT 細胞に一時的に *Apc* 遺伝子機能を回復させ大腸上皮への分化を試みる予定である。

#### (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

がん細胞および前がん病変におけるエピゲノム異常の解明は、がんそのものや発がん過程を理解するため、また、これらの異常を臨床応用するための基盤的情報である。本年度は、エピゲノム、ゲノム異常の統合的な解析の結果、CIMP 陽性の胃がんは、がん遺伝子の変異をも持つ傾向があることを見出し、大腸がんで見出された CIMP とがん遺伝子変異との関連が、胃がんにおいても認められることを示した。

X 染色体上の *FHL1* 遺伝子は 1 回のヒットで賦活化する消化管の腫瘍抑制遺伝子であり、ピロリ菌感染によりメチル化が誘発されることから、エピジェネティックな発がんの場の形成にも関与していると考えられる。

*NTSRI* 遺伝子のように、大腸腺腫では高頻度にメチル化しているが、進行大腸がんでは頻度が低下し、メチル化が浸潤性と逆相関する遺伝子も明らかとなった。

#### (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、本年度は、MassARRAY プラットフォームを用いて CIMP 陽性腎細胞がんを判別することによる、腎細胞がん予後診断マーカーパネルを開発した。腎細胞がんは労働人口に属する壮年期にもしばしば発生し、検診における超音波検査等で診断され、対側の腎臓が健康であればほぼ例外なく手術適応になる。すなわち、CIMP マーカー遺伝子を用いた予後診断法の実施に際しては、手術検体から余分な侵襲なく組織検体が採取でき、臨床検査として導入し易いと期待される。腎摘除術で根治する症例群が腎細胞がんの大勢をなす反面、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。このような症例群があらかじめ予測できれば、泌尿器科診療にとって有益であると期待される。

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は順調に進展しており、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癌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。これまで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り、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が共同研究で進行中である。

#### 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. Okochi-Takada E, Hattori N, Tsukamoto T, Miyamoto K, Ando T, Ito S, Yamamura Y, Wakabayashi M, Nobeyama Y and Ushijima T. ANGPTL4 is a secreted tumor-suppressor that inhibits angiogenesis. **Oncogene**, in press.
2. Asada K, Watanabe N, Nakamura Y, Ohira M, Westermann F, Schwab M, Nakagawara A and Ushijima T. Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas. **Jpn J Clin Oncol**, in press.
3. Niwa T, Toyoda T, Tsukamoto T, Mori A, Tatematsu M and Ushijima T. Prevention of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancers in gerbils by a DNA demethylating agent. **Cancer Prev Res**, 6: 263-270, 2013.
4. Asada K, Ando T, Niwa T, Nanjo S, Watanabe N, Okochi-Takada E, Yoshida T, Miyamoto K, Enomoto S, Ichinose M, Tsukamoto T, Ito S, Tatematsu M, Sugiyama T and Ushijima T. *FHL1* on chromosome X is a single-hit gastrointestinal tumor-suppressor gene and contributes to the

formation of an epigenetic field defect. **Oncogene**, 32: 2140-2149, 2013.

5. Kim JG, Takeshima H, Niwa T, Rehnberg E, Shigematsu Y, Yoda Y, Yamashita S, Kushima R, Maekita T, Ichinose M, Katai H, Park WS, Hong YS, Park CH and Ushijima T. Comprehensive DNA methylation and extensive mutation analyses reveal an association between the CpG island methylator phenotype and oncogenic mutations in gastric cancers. **Cancer Lett**, 330: 33-40, 2013.
6. Takeshima H, Ikegami D, Wakabayashi M, Niwa T, Kim YJ and Ushijima T. Induction of aberrant trimethylation of histone H3 lysine 27 by inflammation in mouse colonic epithelial cells. **Carcinogenesis**, 33: 2384-2390, 2012.
7. Frau M, Tomasi ML, Simile MM, Demartis MI, Salis F, Latte G, Calvisi DF, Seddaiu MA, Daino L, Feo CF, Brozzetti S, Solinas G, Yamashita S, Ushijima T, Feo F and Pascale RM. Role of transcriptional and posttranscriptional regulation of methionine adenosyltransferases in liver cancer progression. **Hepatology**, 56: 165-175, 2012.
8. Kikuyama M, Takeshima H, Kinoshita T, Okochi-Takada E, Wakabayashi M, Akashi-Tanaka S, Ogawa T, Seto Y and Ushijima T. Development of a novel approach, the epigenome-based outlier approach, to identify tumor-suppressor genes silenced by aberrant DNA methylation. **Cancer Lett**, 322: 204-212, 2012.
9. 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**, 15: 382-388, 2012.
10. Shigematsu Y, Niwa T, Yamashita S, Taniguchi H, Kushima R, Katai H, Ito S, Tsukamoto T, Ichinose M and Ushijima T. Identification of a DNA methylation marker that detects the presence of lymph node metastases of gastric cancers. **Oncol Lett**, 4:268-274, 2012.
11. Ushijima T and Takeshima H. Epigenetic epidemiology of infectious diseases. In: Michels KB (ed), *Epigenetic Epidemiology*. Germany, Springer, 269-288, 2012.
12. Sato T, Arai E, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T and Kanai Y. DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. **PLoS One**, 8: e59444, 2013.
13. 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**, 33: 1487-1493, 2012.
14. Shimizu T, Suzuki H, Nojima M, Kitamura H, Yamamoto E, Maruyama R, Ashida M, Hatahira T, Kai M, Masumori N, Tokino T, Imai K, Tsukamoto T and Toyota M. Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. **Eur Urol**, 63: 1091-1100, 2013.
  15. Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T, Ashida M, Kai M, Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, Toyota M, Itoh F and Sugai T. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. **Genes Chromosomes Cancer**, 52: 140-149, 2013.
  16. Yamamoto E, Suzuki H, Yamano HO, Maruyama R, Nojima M, Kamimae S, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada T, Suzuki R, Sato A, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Sugai T, Imai K, Shinomura Y and Toyota M. Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. **Am J Pathol**, 181: 1847-1861, 2012.
  17. Takamaru H, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Suzuki R, Yamamoto H, Kai M, Tokino T, Sugai T, Imai K, Toyota M and Shinomura Y. Aberrant methylation of *RASGRF1* is associated with an epigenetic field defect and increased risk of gastric cancer. **Cancer Prev Res**, 5: 1203-1212, 2012.
  18. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E and Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. **Mol Oncol**, 6: 567-578, 2012.
  19. 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**, 33: 1307-1317, 2012.
  20. Maruyama R and Suzuki H. Long noncoding RNA involvement in cancer. **BMB Rep**, 45: 604-611, 2012.
  21. Hirata A, Utikal J, Yamashita S, Aoki H, Watanabe A, Yamamoto T, Okano H, Bardeesy N, Kunisada T, Ushijima T, Hara A, Jaenisch R, Hochedlinger K and Yamada Y. Dose-dependent roles for canonical Wnt signaling in *de novo* crypt formation and cell cycle properties of the colonic epithelium. **Development**, 140: 66-75, 2013.
  22. Yamada K, Ohno T, Aoki H, Semi K, Watanabe A, Moritake H, Shiozawa S, Kunisada T, Kobayashi Y, Toguchida J, Shimizu K, Hara A and Yamada Y. *EWS/ATF1* expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. **J Clin Invest**, 123: 600-610, 2013.
  23. Semi K, Matsuda Y, Ohnishi K and Yamada Y. Cellular reprogramming and cancer development. **Int J Cancer**, 132: 1240-1248, 2012.
  24. Arioka Y, Watanabe A, Saito K and Yamada Y. Activation-induced cytidine deaminase alters the subcellular localization of Tet family proteins. **PLoS One**, 7: e45031, 2012.
- 本研究費に密接に関係するもの
1. Yoshida T, Kato J, Maekita T, Yamashita S, Enomoto S, Ando T, Niwa T, Deguchi H, Ueda K, Inoue I, Iguchi M, Tamai H, Ushijima T and Ichinose M. Altered mucosal DNA methylation in parallel with highly active *Helicobacter pylori*-related gastritis. **Gastric Cancer**, in press.
  2. Chiba T, Marusawa H and Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. **Gastroenterology**, 143: 550-563, 2012.
  3. Watanabe M, Kato J, Inoue I, Yoshimura N, Yoshida T, Mukoubayashi C, Deguchi H, Enomoto S, Ueda K, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Utsunomiya H, Yamamichi N, Fujishiro M, Iwane M, Tekeshita T, Mohara O, Ushijima T and Ichinose M. Development of gastric cancer in nonatrophic stomach with highly active inflammation identified by serum levels of pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody together with endoscopic rugal hyperplastic gastritis. **Int J Cancer**, 131: 2632-2642, 2012.
  4. 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**, 31: 3949-3960, 2012.
  5. Matsuda Y, Yamashita S, Lee YC, Niwa T, Yoshida T, Gyobu K, Igaki H, Kushima R, Lee S, Wu MS, Osugi H, Suehiro S and Ushijima T. Hypomethylation of Alu repetitive elements in esophageal mucosa, and its potential contribution to the epigenetic field for cancerization. **Cancer Causes Control**, 23: 865-873, 2012.

6. Saito Y, Suzuki H, Imaeda H, Matsuzaki J, Hirata K, Tsugawa H, Hibino S, Kanai Y, Saito H and Hibi T. The tumor suppressor *microRNA-29c* is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells. **Int J Cancer**, 132: 1751-1760, 2013.
  7. Kanai Y and Arai E. DNA methylation alterations in human cancers. In: Tollefsbol T (ed), *Epigenetics in Human Disease*. Amsterdam, Elsevier, 29-52, 2012.
  8. Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Liu YT, Izumiya M, Abe K, Ochiai M, Jiang L, Nagai H, Okazaki Y, Murakami H, Sekido Y, Arai E, Kanai Y, Hino O, Takahashi T, Nakagama H and Toyokuni S. Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. **PLoS One**, 7: e43403, 2012.
  9. Yamamoto H, Adachi Y, Taniguchi H, Kunimoto H, Noshō K, Suzuki H and Shinomura Y. Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. **World J Gastroenterol**, 18: 2745-2755, 2012.
  10. Sukawa Y, Yamamoto H, Noshō K, Kunimoto H, Suzuki H, Adachi Y, Nakazawa M, Nobuoka T, Kawayama M, Mikami M, Matsuno T, Hasegawa T, Hirata K, Imai K and Shinomura Y. Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer. **World J Gastroenterol**, 18: 6577-6586, 2012.
  11. Yi JM, Dhir M, Guzzetta AA, Iacobuzio-Donahue CA, Heo K, Yang KM, Suzuki H, Toyota M, Kim HM and Ahuja N. DNA methylation biomarker candidates for early detection of colon cancer. **Tumour Biol**, 33: 363-372, 2012.
  12. Oishi Y, Watanabe 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.
  13. Kashima L, Idogawa M, Mita H, Shitashige M, Yamada T, Ogi K, Suzuki H, Toyota M, Ariga H, Sasaki Y and Tokino T. CHFR protein regulates mitotic checkpoint by targeting PARP-1 protein for ubiquitination and degradation. **J Biol Chem**, 287: 12975-12984, 2012.
  14. Hama R, Watanabe Y, Shinada K, Yamada Y, Ogata Y, Yoshida Y, Tamura T, Hiraishi T, Oikawa R, Sakurai J, Maehata T, Koizumi H and Itoh F. Characterization of DNA hypermethylation in two cases of peritoneal mesothelioma. **Tumor Biol**, 33: 2031-2040, 2012.
2. 学会発表
    1. Ushijima T. Induction mechanisms of aberrant DNA methylation. The 3rd Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Diseases. Shanghai, April 2012.
    2. Ushijima T. The etiology and mechanisms of epigenomic aberrations: their application to prevention of epigenomic disorders. BIOtech 2012. Tokyo, April 2012.
    3. Ushijima T. *Helicobacter pylori* infection, inflammation, DNA methylation, and gastric cancer. 4th Asia-Pacific Gastroesophageal Cancer Congress. Singapore, July 2012.
    4. Ushijima T. Epigenetic field defect induced by chronic inflammation. The 2nd Japan-China Symposium on Cancer Research. Chiba, May 2012.
    5. Ushijima T. Epigenetic field defect as cancer risk marker and prevention target. 2012 Seoul National University Cancer Research Institute Symposium. Seoul, May 2012.
    6. Hattori N, Niwa T, Helin K and Ushijima T. Development of a novel technique to visualize a combination of histone modifications. ISSCR 10th Annual Meeting, Yokohama, June 2012.
    7. Ushijima T. Epigenetic field for cancerization: its cause and clinical implications. São Paulo Advanced School of Comparative Oncology. São Paulo, September-October 2012.
    8. Ushijima T. Chronic inflammation and epigenetic alterations. The 2nd Epigenomics of Common Diseases Conference. Baltimore, October 2012.
    9. Ushijima T. Induction mechanisms of epigenetic alterations by chronic inflammation. International Symposium on Genetic Regulation and Targeted Therapy of Cancer. Guangzhou, November 2012.
    10. Ushijima T. Epigenetic field for cancerization: its induction mechanisms. International Symposium on Genetic and Epigenetic Control of Cell Fate. Kyoto, November 2012.
    11. Ushijima T. Epigenetic Alterations in Tumors, Pre-tumorous Stages, and Their Origin. 3rd International Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting. Fukuoka, November 2012.
    12. Hattori N, Kimura K and Ushijima T. Applications of iChmo to Analyzing Novel Biological Phenomena. JSPS A3 Foresight Program 2013 Sapporo Meeting. Sapporo, March 2013.
    13. Ushijima T. Inflammation and epigenetic field for cancerization. Third Clinical Epigenetics International Meeting. Solingen, March 2013.

14. 牛島俊和, 丹羽 透, 南條宗八. Bringing epigenetic field defect into cancer risk diagnosis and prevention. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.
15. 丹羽 透, 竹島秀幸, 池上大悟, 山下 聡, 牛島俊和. ヒストン修飾異常もエピジェネティックな発がんの素地に関与する可能性. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.
16. 竹島秀幸, 池上大悟, 若林美香, 牛島俊和. 特定の細胞外環境は H3K27 トリメチル化異常を誘発する. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.
17. Hattori N, Niwa T and Ushijima T. Development of a novel technique to visualize combination of histone modifications. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.
18. 牛島俊和. DNA メチル化異常の起源と診断への応用. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月.
19. 牛島俊和. ピロリ菌感染によるエピジェネティック異常誘発の解明と発がんリスク診断への応用. 第 23 回日本消化器癌発生学会総会, 2012 年 11 月.
20. 牛島俊和. エピジェネティックな胃発癌機構とリスク診断への応用. 第 85 回日本胃癌学会総会, 2013 年 2-3 月.
21. Kanai Y, Shibata T, Ito T, Suzuki Y, Yamashita S, Tian Y, Gotoh M, Ojima H and Arai E. Standard epigenome analysis in digestive organs and research applications to multistage hepatocarcinogenesis. International Human Epigenome Consortium 2012. Seoul, September 2012 (invited).
22. Kanai Y. Epigenome profiling during multistage hepatocarcinogenesis and activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). 17th Japan-Korea Cancer Research Workshop. Busan, November-December 2012 (invited).
23. Sato T, Arai E, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T and Kanai Y. DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. Ninth American Association of Cancer Research-Japanese Cancer Association Joint Conference. Hawaii, February 2013.
24. Arai E, 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. Ninth American Association of Cancer Research-Japanese Cancer Association Joint Conference, Hawaii, February 2013.
25. Arai E, Sakamoto H, Ichikawa H, Totsuka H, Gotoh M, Mori T, Ohnami S, Nakagawa T, Fujimoto H, Wang L, Aburatani H, Yoshida T and Kanai Y. Multilayer-omics (whole-exome, methylome and transcriptome) analysis identifies the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway as a key player in the development of renal cell carcinoma. 103rd American Association of Cancer Research Annual Meeting. Washington DC, April 2013.
26. Sato T, Arai E, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T and Kanai Y. DNA methylation profiles at precancerous stage cluster lung adenocarcinomas into subclusters associated with carcinogenetic pathway, clinicopathological aggressiveness and patient outcome. 103rd American Association of Cancer Research Annual Meeting. Washington DC, April 2013.
27. Kanai Y. Epigenome profiling during multistage human carcinogenesis and activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). 2013 Illumina Scientific Summit. Thailand, 2013 (invited).
28. 新井恵吏, 坂本裕美, 市川 仁, 戸塚裕彦, 後藤政広, 森 泰昌, 大浪澄子, 中川 徹, 藤元博行, 王 凌華, 油谷浩幸, 吉田輝彦, 金井弥栄. 腎臓明細胞がんにおける多層的オミックス (エクソーム・メチローム・トランスクリプトーム) 解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.
29. 佐藤 崇, 新井恵吏, 河野隆志, 後藤政広, 渡辺俊一, 副島研造, 別役智子, 金井弥栄. 前がん段階における DNA メチル化異常が肺腺がんの悪性度と予後を規定する. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.
30. 西山直隆, 新井恵吏, 長塩 亮, 藤元博行, 細田文恵, 柴田龍弘, 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ゲノム構造異常: 臨床病理学的意義ならびに DNA メチル化異常との関係. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.
31. Suzuki H. Dysregulation of noncoding RNA genes and its clinical application. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference. Hawaii, February 2013 (invited).
32. 鈴木 拓. 大腸がんのエピゲノム解析によるがん関連 miRNA 遺伝子の同定. 第 59 回日本食品科学工学会大会, 2012 年 8 月.
33. Suzuki H, Niinuma T, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, Noshio K, Yamamoto H, Imai K, Toyota M and Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.

34. 鈴木 拓, 山本英一郎, 篠村恭久. 大腸腫瘍におけるニューロテンシン受容体 1 型遺伝子のメチル化と臨床的意義. 第 20 回日本消化器関連学会週間(JDDW 2012), 2012 年 10 月.
35. 鈴木 拓, 山本英一郎, 丸山玲緒, 山野泰穂, 甲斐正広, 山本博幸, 篠村恭久. 大腸腫瘍におけるニューロテンシン受容体 1 型遺伝子のメチル化と臨床的意義. 第 23 回日本消化器癌発生学会総会. 2012 年 11 月.
36. 鈴木 拓, 野島正寛, 丸山玲緒, 山本英一郎, 津矢田明泰, 篠村恭久. miR-196a および HOTAIR の過剰発現は消化管間質腫瘍の悪性度を促進する. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月.
37. 鈴木 拓, 山本英一郎, 神前正幸, 丸山玲緒, 野島正寛, 山野泰穂, 菅井 有, 山本博幸, 篠村恭久. 大腸腫瘍におけるニューロテンシン受容体 1 型遺伝子のメチル化と臨床的意義. 第 9 回日本消化管学会総会学術総会, 2013 年 1 月.
38. Watanabe Y, Oishi Y, Yoshida Y, Hiraishi T, Oikawa R, Maehata T, Suzuki H and Itoh F. DDW2012. San Diego, May 2012.
39. Watanabe Y, Sato Y, Ishigooka S, Hosoya K, Oikawa R, Maehata T, Yasuda H and Itoh F. ACG2012. Las Vegas, October 2012.
40. Watanabe Y, Yoshida Y, Oikawa R, Maehata T and Itoh F. SIDDS2012. Seoul, November 2012.
41. Yamada Y. Application of reprogramming technology to cancer research. 19th international Charles Heidelberger symposium on Cancer Research. Kagoshima, February 2013.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
    - Date of Filing: 15.05.07
    - Priority: JP/15.05.06/ JPA 2006134878
    - Title: Method for Detecting Disease-related Marker Using Gastric Mucosal Lavage Fluid
    - Designated States: AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL PL PT RO SE SK TR
  2. 実用新案登録
    - 該当無し
  3. その他
    - 該当無し

分担研究報告書

DNA メチル化異常のゲノム網羅的な解析とリスク診断・性質診断への応用

研究代表者 牛島俊和 国立がん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、炎症によりヒストン H3 のリジン 27 トリメチル化修飾が誘導され、その一部が DNA メチル化異常に進展することを示した。胃がんにおいて、CpG アイランドメチル化形質とがん遺伝子の変異が関連していることを示した。X 染色体上のがん抑制遺伝子 *FHL1* を同定した。神経芽細胞腫の予後診断の前向き試験を継続した。エピジェネティック治療の基盤の確立については、DNA 脱メチル化剤のハイスループットスクリーニングを共同研究で開始した。

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；主にがん抑制遺伝子）と、がん化の結果または随伴現象としてサイレンシングされた遺伝子（パッセンジャー）とが存在する。ドライバーの同定が重要なことは明らかであるが、パッセンジャーや、遺伝子サイレンシングの原因とはならない非プロモーター領域の DNA メチル化異常でも、診断的に有用な場合がある。

研究代表者は、ヒト胃がんの強力な誘発因子である *Helicobacter pylori*（ピロリ菌）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。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

ヒトのサンプルから抽出したゲノム DNA の網羅的メチル化解析には、482,421 箇所の CpG 部位の解析が可能な Illumina 社の HumanMethylation450 を用いた。完全メチル化を 1、完全非メチル化を 0 とする  $\beta$  値を用いて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) ゲノム網羅的なヒストン修飾解析

ヒストン H3 のリジン 27 トリメチル化修飾 (H3K27me3) に特異的な抗体および Agilent 社の Mouse CpG island microarray を用いた、ChIP-chip 法により解析した。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 遺伝子変異解析

Life Technologies 社の Ion AmpliSeq Cancer Panel Kit および 36 個のカスタムプライマーを用いて 55 個のがん関連遺伝子をカバーする 226 種の増幅産物から成るライブラリーを作成し、Life Technologies 社の Ion 316 chip および Ion PGM Sequencer を用いて塩基配列を決定した。マッピングと変異アレル頻度の解析は CLC bio 社の CLC Genomics Workbench を用いて行った。変異が認められた領域は個別に増幅し、ジデオキシ法により塩基配列を確認した。

(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

炎症による DNA メチル化異常の誘発機構の解析を目的として、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。さらに、T・B 細胞が遺伝的に欠損している SCID マウスにおいても、大腸粘膜に Wild type と同等の DNA メチル化異常も誘発されることを見出し、DNA メチル化異常誘発には T・B 細胞は不要であることを示してきた。

本年度は、同様のマウスモデルにおいて、誘発された腫瘍での H3K27me3 修飾異常を同定、この異常は、炎症に暴露した直後に誘発され、その後炎症が消失した後でも長期間持続することを見出した。さらに、H3K27 me3 の上昇が見られた遺伝子に関して、DNA メチル化レベルを調べたところ、一部の遺伝子 (*Dapkl1*) において DNA メチル化異常が誘発されるこ

とを見出した。

(2) 胃がんにおける CIMP とがん遺伝子変異の関係

胃がんにおけるエピジェネティック異常の全体像の解明を目的として、30 個の胃がんについて、DNA メチル化のゲノム網羅的解析および 55 個のがん関連遺伝子についての変異解析を行った。その結果、個々の胃がんにおける異常メチル化を示す遺伝子数は広範囲に分布していること、30 個中 19 個の胃がんには 8 種の遺伝子 (*CDH1*, *CTNBN1*, *ERBB2*, *KRAS*, *MLH1*, *PIK3CA*, *SMARCB1*, *TP53*) について変異が認められることを示した。さらに、エピゲノム、ゲノム異常の統合的な解析の結果、CIMP 陽性の胃がんは、がん遺伝子の変異も持つ傾向があることを見出した。

(3) X 染色体上のがん抑制遺伝子 *FHL1* の同定

昨年度までに、*ANGPTL4* 遺伝子は、腫瘍の血管新生を抑制し、変異および DNA メチル化の双方で不活化されるがん抑制遺伝子であることを示してきた。また、DNA メチル化異常誘発機構の解析によればメチル化抵抗性と判定された遺伝子の中に、がんではメチル化により不活化されるがん抑制遺伝子が例外的に含まれることを示し、この事実を応用してがん抑制遺伝子の新規同定法 (Outlier Approach) を開発した。

本年度は、常染色体上の遺伝子とは異なり、1 回のヒットで不活化しうる X 染色体上の遺伝子に着目して研究を進めた。*FHL1* 遺伝子は、胃がん細胞株 AGS でメチル化によりサイレンシングされている遺伝子の 1 つであり、ピロリ菌感染によってメチル化が誘発されること、健常者より胃がん患者でメチル化レベルが高いことを見出した。また、sh-RNA を用いて *FHL1* をノックダウンしたがん細胞株を用いた *in vitro*, *in vivo* の解析の結果、*FHL1* はがんの増殖を抑制することを示した。さらに、大腸がんにおいて突然変異 (Lys214Asn) が存在することを見出し、Invasion assay 等により、この変異により活性が喪失することを示した。

(4) 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。本年度までに、前向き臨床試験に際して得られた累積 227 例について CIMP の解析を行った。

(5) エピジェネティック治療の基盤の確立

昨年度までに、新規の DNA メチル化異常の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ために、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、クローン化を進めてきた。本年度は、企業との共同研究に

より、新規脱メチル化剤のスクリーニングを開始した。

#### 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。本年度は、エピゲノム、ゲノム異常の統合的な解析の結果、CIMP 陽性の胃がんは、がん遺伝子の変異をも持つ傾向があることを見出し、大腸がんで見出された CIMP とがん遺伝子変異との関連が、胃がんにおいても認められることを示した。

DSS 投与マウス大腸炎モデルにおいて H3K27me3 修飾異常を同定し、H3K27 me3 の上昇が見られた遺伝子の一部で DNA メチル化異常が誘発されることを見出した。本研究により、元々もっている H3K27me3 修飾のみならず、炎症などにより獲得した後天性の H3K27me3 異常も、DNA メチル化異常の誘因となることが始めて示された。

X 染色体上の *FHL1* 遺伝子は 1 回のヒットで賦活化する消化管の腫瘍抑制遺伝子であり、ピロリ菌感染によりメチル化が誘発されることから、エピジェネティックな発がんの場の形成にも関与していると考えられる。

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。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。これまで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り、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が共同研究で進行中である。

#### E. 結論

胃がんにおいて、CpG アイランドメチル化形質とがん遺伝子の変異が関連していることを示した。炎症により H3K27me3 修飾が誘導され、その一部が DNA メチル化異常に進展することを示した。X 染色体上のがん抑制遺伝子 *FHL1* を同定した。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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Okochi-Takada E, Hattori N, Tsukamoto T, Miyamoto K, Ando T, Ito S, Yamamura Y,

Wakabayashi M, Nobeyama Y and Ushijima T. ANGPTL4 is a secreted tumor-suppressor that inhibits angiogenesis. **Oncogene**, in press.

2. Asada K, Watanabe N, Nakamura Y, Ohira M, Westermann F, Schwab M, Nakagawara A and Ushijima T. Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas. **Jpn J Clin Oncol**, in press.
3. Niwa T, Toyoda T, Tsukamoto T, Mori A, Tatematsu M and Ushijima T. Prevention of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancers in gerbils by a DNA demethylating agent. **Cancer Prev Res**, 6: 263-270, 2013.
4. Asada K, Ando T, Niwa T, Nanjo S, Watanabe N, Okochi-Takada E, Yoshida T, Miyamoto K, Enomoto S, Ichinose M, Tsukamoto T, Ito S, Tatematsu M, Sugiyama T and Ushijima T. *FHL1* on chromosome X is a single-hit gastrointestinal tumor-suppressor gene and contributes to the formation of an epigenetic field defect. **Oncogene**, 32: 2140-2149, 2013.
5. Kim JG, Takeshima H, Niwa T, Rehnberg E, Shigematsu Y, Yoda Y, Yamashita S, Kushima R, Maekita T, Ichinose M, Katai H, Park WS, Hong YS, Park CH and Ushijima T. Comprehensive DNA methylation and extensive mutation analyses reveal an association between the CpG island methylator phenotype and oncogenic mutations in gastric cancers. **Cancer Lett**, 330: 33-40, 2013.
6. Takeshima H, Ikegami D, Wakabayashi M, Niwa T, Kim YJ and Ushijima T. Induction of aberrant trimethylation of histone H3 lysine 27 by inflammation in mouse colonic epithelial cells. **Carcinogenesis**, 33: 2384-2390, 2012.
7. Frau M, Tomasi ML, Simile MM, Demartis MI, Salis F, Latte G, Calvisi DF, Seddaiu MA, Daino L, Feo CF, Brozzetti S, Solinas G, Yamashita S, Ushijima T, Feo F and Pascale RM. Role of transcriptional and posttranscriptional regulation of methionine adenosyltransferases in liver cancer progression. **Hepatology**, 56: 165-175, 2012.
8. Kikuyama M, Takeshima H, Kinoshita T, Okochi-Takada E, Wakabayashi M, Akashi-Tanaka S, Ogawa T, Seto Y and Ushijima T. Development of a novel approach, the epigenome-based outlier approach, to identify tumor-suppressor genes silenced by aberrant DNA methylation. **Cancer Lett**, 322: 204-212, 2012.
9. 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**, 15: 382-388, 2012.

10. Shigematsu Y, Niwa T, Yamashita S, Taniguchi H, Kushima R, Katai H, Ito S, Tsukamoto T, Ichinose M and Ushijima T. Identification of a DNA methylation marker that detects the presence of lymph node metastases of gastric cancers. **Oncol Lett**, 4:268-274, 2012.
11. Ushijima T and Takeshima H. Epigenetic epidemiology of infectious diseases. In: Michels KB (ed), *Epigenetic Epidemiology*. Germany, Springer, 269-288, 2012.

本研究費に密接に関係するもの

1. Yoshida T, Kato J, Maekita T, Yamashita S, Enomoto S, Ando T, Niwa T, Deguchi H, Ueda K, Inoue I, Iguchi M, Tamai H, Ushijima T and Ichinose M. Altered mucosal DNA methylation in parallel with highly active *Helicobacter pylori*-related gastritis. **Gastric Cancer**, in press.
2. Chiba T, Marusawa H and Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. **Gastroenterology**, 143: 550-563, 2012.
3. Watanabe M, Kato J, Inoue I, Yoshimura N, Yoshida T, Mukoubayashi C, Deguchi H, Enomoto S, Ueda K, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Utsunomiya H, Yamamichi N, Fujishiro M, Iwane M, Tekeshita T, Mohara O, Ushijima T and Ichinose M. Development of gastric cancer in nonatrophic stomach with highly active inflammation identified by serum levels of pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody together with endoscopic rugal hyperplastic gastritis. **Int J Cancer**, 131: 2632-2642, 2012.
4. 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**, 31: 3949-3960, 2012.
5. Matsuda Y, Yamashita S, Lee YC, Niwa T, Yoshida T, Gyobu K, Igaki H, Kushima R, Lee S, Wu MS, Osugi H, Suehiro S and Ushijima T. Hypomethylation of Alu repetitive elements in esophageal mucosa, and its potential contribution to the epigenetic field for cancerization. **Cancer Causes Control**, 23: 865-873, 2012.

2. 学会発表

1. Ushijima T. Induction mechanisms of aberrant DNA methylation. The 3rd Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Diseases. Shanghai, April 2012.
2. Ushijima T. The etiology and mechanisms of epigenomic aberrations: their application to prevention of epigenomic disorders. BIOtech 2012. Tokyo, April 2012.
3. Ushijima T. *Helicobacter pylori* infection, inflammation, DNA methylation, and gastric cancer. 4th Asia-Pacific Gastroesophageal Cancer Congress. Singapore, July 2012.
4. Ushijima T. Epigenetic field defect induced by chronic inflammation. The 2nd Japan-China Symposium on Cancer Research. Chiba, May 2012.
5. Ushijima T. Epigenetic field defect as cancer risk marker and prevention target. 2012 Seoul National University Cancer Research Institute Symposium. Seoul, May 2012.
6. Hattori N, Niwa T, Helin K and Ushijima T. Development of a novel technique to visualize a combination of histone modifications. ISSCR 10th Annual Meeting, Yokohama, June 2012.
7. Ushijima T. Epigenetic field for cancerization: its cause and clinical implications. São Paulo Advanced School of Comparative Oncology. São Paulo, September-October 2012.
8. Ushijima T. Chronic inflammation and epigenetic alterations. The 2nd Epigenomics of Common Diseases Conference. Baltimore, October 2012.
9. Ushijima T. Induction mechanisms of epigenetic alterations by chronic inflammation. International Symposium on Genetic Regulation and Targeted Therapy of Cancer. Guangzhou, November 2012.
10. Ushijima T. Epigenetic field for cancerization: its induction mechanisms. International Symposium on Genetic and Epigenetic Control of Cell Fate. Kyoto, November 2012.
11. Ushijima T. Epigenetic Alterations in Tumors, Pre-tumorous Stages, and Their Origin. 3rd International Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting. Fukuoka, November 2012.
12. Hattori N, Kimura K and Ushijima T. Applications of iChmo to Analyzing Novel Biological Phenomema. JSPS A3 Foresight Program 2013 Sapporo Meeting. Sapporo, March 2013.
13. Ushijima T. Inflammation and epigenetic field for cancerization. Third Clinical Epigenetics International Meeting. Solingen, March 2013.
14. 牛島俊和, 丹羽透, 南條宗八. Bringing epigenetic field defect into cancer risk diagnosis



- and prevention. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.
15. 丹羽 透, 竹島秀幸, 池上大悟, 山下 聡, 牛島俊和. ヒストン修飾異常もエピジェネティックな発がんの素地に関与する可能性. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.
  16. 竹島秀幸, 池上大悟, 若林美香, 牛島俊和. 特定の細胞外環境は H3K27 トリメチル化異常を誘発する. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.
  17. Hattori N, Niwa T and Ushijima T. Development of a novel technique to visualize combination of histone modifications. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月.
  18. 牛島俊和. DNA メチル化異常の起源と診断への応用. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月.
  19. 牛島俊和. ピロリ菌感染によるエピジェネティック異常誘発の解明と発がんリスク診断への応用. 第 23 回日本消化器癌発生学会総会, 2012 年 11 月.
  20. 牛島俊和. エピジェネティックな胃発癌機構とリスク診断への応用. 第 85 回日本胃癌学会総会, 2013 年 2-3 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。昨年度までに実施した腎組織検体における高密度ビーズチップを用いたゲノム網羅的DNAメチル化解析で、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が高く予後不良である、CpGアイランドメチル化形質 (CIMP) 陽性の腎細胞がん症例群を同定していた。さらに、腎細胞がん固有のCIMPマーカー17遺伝子を同定していた。

平成24年度においては、CIMPマーカー遺伝子のプロモーターCpGアイランド全域のDNAメチル化状態を、ビーズチップとは異なるMassARRAYプラットフォームで検証し、CIMP陽性腎細胞がんにおいて、プロモーターCpGアイランド全域が強固にDNAメチル化を受けることを示した。受信者動作特性曲線 (receiver operating characteristic: ROC)解析により、CIMPマーカー遺伝子のプロモーター領域CpGアイランドには、CIMP陽性腎細胞がんをCIMP陰性腎細胞がんから高い精度で判別し得るCpG部位が、高密度ビーズチップのプロブCpG部位に加え、さらに多数存在することが分かった。ROC曲線下面積 (area under the curve: AUC) 0.95以上である32CpG部位を用いてCIMP診断指標を開発した。腎細胞がん102症例の組織検体においてMassARRAY解析を施行したところ、同診断指標を用いて感度・特異度とも100%で、14症例をCIMP陽性であると診断し得た。

CIMP陽性腎細胞がんは予後不良群であるので、CIMP診断指標は、予後診断指標として用いられると期待される。CIMPマーカー遺伝子を用いた腎細胞がん症例の予後診断の、病院における臨床検査としての実用化を目指し、企業との共同研究を開始した。さらに、ゲノム (エクソーム)・トランスクリプトーム・プロテオーム統合解析で、CIMP陽性群で高頻度に異常を来す分子経路を同定している。我々の指標を用いた腎摘除術検体におけるCIMP診断を、同分子経路の阻害剤を用いた術後アジュバント療法のためのコンパニオン診断とし得ると期待される。

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予後不良である、CpGアイランドメチ

ル化形質 (CIMP) 陽性の症例群を同定し、CIMPマーカーとなる17遺伝子を同定している。

本年度はCIMPマーカー遺伝子プロモーター領域全域のCpGアイランドのDNAメチル化状態を、ビーズチップとは異なるプラットフォームで検証しつつさらに詳細に解析し、予後診断指標を開発することを目指した。さらに、多層的オミックス解析結果を参照し、腎細胞がんのCIMP診断の、個別化医療における有用性を明らかにすることを目指した。

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・クロロホ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、 $\beta$  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。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。

上記 Infinium 解析を基に同定した CIMP マーカー遺伝子の DNA メチル化率は、MassARRAY 法で定量した。具体的には、バイサルファイト変換 DNA を増幅・in vitro 転写し、RNaseA により特異的に切断し、生成断片の質量の差異を、MALDI-TOF MS (MassARRAY Analyzer 4; SEQUENOM)で検出した。解析に用いるプライマーは専用アプリケーション EpiDesigner (SEQUENOM)を用いて設計している。得られた質量分析結果は、解析ソフトウェア EpiTYPER (SEQUENOM)を用いて、リファレンス配列にアラインメントし、メチル化 DNA に由来する RNA 断片と非メチル化 DNA に由来する RNA 断片との質量の比から、DNA メチル化率を算出した。

#### (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、臨床病理学的に悪性度の高いがんを生じ、予後不良である、CIMP 陽性症例群を同定していた。さらに、非がん腎組織において  $\beta$  値が特に低値であり、腎細胞がん組織において同一症例の非がん腎組織に比して特に DNA メチル化亢進が顕著であるプローブ群に着目し、さらにランダムフォレスト解析を併用することにより、FAM150A, GRM6, ZNF540, ZFP42, ZNF154, RIMS4, PCDHAC1, KHDRBS2, ASCL2, KCNQ1, PRAC, WNT3A, TRH, FAM78A, ZNF671, SLC13A5, NKX6-2 の 17 遺伝子を、腎細胞がん固有の CIMP マーカー遺伝子であると同定していた。

今年度は、Infinium 解析とは異なるプラットフォームである MassARRAY 法で、DNA メチル化率の技術的検証を行った。はじめに、Infinium アレイのプローブが設計された CpG 部位を含む、CIMP マーカー 17 遺伝子のプロモーター領域を標的配列とする PCR プライマーを、EpiDesigner を用いて設計した。PCR バイアスを排除するため、メチル化・非メチル化対照 DNA を種々の比率で混合し、全てのプライマー対について、DNA ポリメラーゼと温度設定等を種々に組み合わせた解析を複数回試行して、標的配列中の全ての CpG 部位について定量性が良好であるような至適 PCR 条件を決定した。CIMP マーカー 14 遺伝子において、至適条件で MassARRAY 解析を実施できることが分かった(1 塩基伸長反応に基づく Infinium アレイにおいては解析可能で、MassARRAY 法の実施には不適である遺伝子は、3 遺伝子存在した)。

MassARRAY 法は定量性に優れるのに加え、解析可能な PCR 標的配列が 100 ないし 500bp 程度であるので、当初のマーカー候補である Infinium プローブ部位の周辺の多数の CpG 部位の DNA メチル化率を、合わせて評価することができた。これにより、MassARRAY 法で解析可能であった CIMP マーカー 14 遺伝子全ての、プロモーター領域全域に亘って、CIMP 陽性症例においてのみ高度の DNA メチル化が維持されていることが分かった。昨年度までの解析で、プロモーター領域全域の DNA メチル化により安定してサイレンシングを受ける遺伝子が、CIMP マーカー遺伝子として同定されていたことが確認できた。

CIMP 陰性腎細胞がん 88 症例と、CIMP 陽性腎細胞がん 14 症例の組織検体において MassARRAY 解析を実施し、14 遺伝子の 312CpG 部位における DNA メチル化率を定量した。その結果に基づき、受信者動作特性曲線 (receiver operating characteristic: ROC) 解析を行い、各 CpG 部位単独で CIMP 陽性症例を CIMP 陰性症例から見分けるときの感度・特異度を求めた。さらに、312CpG 部位の ROC 曲線下面積 (area

under the curve: AUC を算出した。また、各 CpG 部位に対して、「感度+特異度」が最大となるようにカットオフ値（診断閾値）を設定した。

ROC 解析により、Infinium プローブ部位である当初のマーカー候補 CpG 部位に加えて、各 CIMP マーカー遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドに、CIMP 陽性群を CIMP 陰性群から区別し得る診断能力の高い CPG 部位が多数存在することがわかった。すなわち、AUC が 0.9 より大きい CpG 部位は 141 箇所、AUC が 0.95 より大きい CpG 部位は 32 箇所であった。尚、MassARRAY 法においては、連続する CpG 部位には全体で 1 計測値が与えられるので、前記 AUC が 0.9 より大きい 141 CpG 部位は、AUC 算出の根拠となる MassARRAY 法の計測値 90 個に相当する。また同様に、AUC が 0.95 より大きい 32 CpG 部位は、MassARRAY 法の計測値 23 個に相当する。AUC が 0.95 より大きい 32 CpG 部位 (23 計測値) についてみると、各 CpG 部位単独で CIMP 陽性群を診断する際の感度・特異度はそれぞれ 83.3%以上・98.5%以上であった。さらに、32 CpG 部位 (23 計測値) の診断閾値を組み合わせることで CIMP 診断指標を策定したところ、同指標により、14 腎細胞がん症例を感度・特異度とも 100% で CIMP 陽性であると診断することができた。

現在、検証コホートの腎細胞がん 100 症例において MassARRAY 解析を実施している。また検証コホートの臨床病理学的因子ならびに予後情報の収集を概ね終えており、本研究期間内に CIMP 診断の予後診断法としての有用性の検証を終了できると期待される。さらに、前向き検証コホートの登録も既に行っている。

他方で、MassARRAY 法は研究目的の解析に際しては定量性に優れているが、大型で高額な機器を要し、解析手技は煩雑で、また少数症例ごとの解析に適さない。そこで、エピゲノム診断の病院における臨床検査としての実用化のために、MassARRAY 法とは異なるプラットフォームの専用診断機器等の開発に向けて、企業との共同開発研究を開始した。

#### D. 考察

腎細胞がんは労働人口に属する壮年期にもしばしば発生し、検診における超音波検査等で診断され、対側の腎臓が健康であればほぼ例外なく手術適応になる。すなわち、CIMP マーカー遺伝子を用いた我々の予後診断法の実施に際しては、手術検体から余分な侵襲なく組織検体が採取でき、臨床検査として導入し易いと期待される。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、がん細胞の微小環境の影響を受け易い mRNA・タンパク質発現等と比し、診断指標としての再現性が高く、バイオマーカーとして概して優れていると考えられる。

腎摘除術で根治する症例群が腎細胞がんの大勢を

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。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属しながら、急速に遠隔転移を来す症例が比較的しばしば経験される。このような症例群があらかじめ予測できれば、泌尿器科診療にとって有益であると期待される。

さらに、分担研究者等は腎発がんの分子機構について多角的な検討を進めており、本研究事業と異なるプロジェクト型共同研究で、CIMP 陽性腎細胞がんにおける、エクソンキャプチャーを用いたエクソーム解析 (網羅的遺伝子変異解析)・SurePrint Human Gene Expression アレイを用いたトランスクリプトーム解析・two dimensional image converted analysis of liquid chromatography-mass spectrometry 法によるプロテオーム解析の統合解析を試みている。このような多層的オミックス解析により、CIMP 陽性群で高頻度に異常を来す分子経路を同定している。以上を総合すると、我々が本研究において実用化を目指している CIMP 診断法は、単に予後予測を行うだけでなく、個別化医療の基盤となる病型診断であると期待される。手術検体において我々の診断法を実施し、CIMP 陰性であれば術後再発なく根治することが期待される。CIMP 陽性群においては、再発の早期診断を目指した頻回の画像診断等が推奨されるのみならず、同定した分子経路の阻害剤を再発後の治療に用いるか、術後直ちに実施するアジュバント療法に用いる、といったスキームが考えられる。今後、前臨床研究を実施し、CIMP 陽性腎細胞がん症例が、同定した分子経路の阻害剤を用いた術後アジュバント療法の適応となることを支持する所見を得たいと考える。

#### E. 結論

CIMP マーカー遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化率を定量することにより、腎細胞がんの予後診断法を開発した。企業との共同研究を開始し、病院における臨床検査としての実用化を目指している。本診断法は、CIMP 陽性腎細胞がん症例における個別化医療に有用であると期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Sato T, Arai E, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T and Kanai Y. DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. *PLoS One*, 8: e59444, 2013.
2. 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