

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牛島 俊和

平成26年(2014)年 5月

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 12
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 17
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 22
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 25
伊東文生 聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科	
5. がん細胞におけるDNAメチル化異常の起源解明 27
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 30

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、ピロリ菌感染あるいはIL1β処理により、TET遺伝子群の発現が低下することを見出した。PKC活性化及び、様々なシグナル経路に関与するDGKG遺伝子が、ヒト大腸がんではDNAメチル化により不活化されているがん抑制遺伝子であることを見出した。大腸腫瘍由来の初期化細胞は、Apcのレスキューにより個体への発生が可能であることを明らかにした。マウス生体内で山中4因子を発現させ、その初期化の程度が不十分だとヒトWilms腫瘍と極めて類似した腫瘍が形成されることを見出した。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について、検証コホート100症例の解析によりCIMPマーカーの有用性を確認した。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。これまでに開発したDNA脱メチル化剤のハイスループットスクリーニング系を用いて4個のヒット化合物を得た。

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

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。研究代表者及び分担者らは、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

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

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製した、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。不完全な初期化により生じたがん細胞については、再度、細胞初期化因子を再発現させることで、完全初期化を試みた。キメラマウス作製は、樹立されたがん細胞由来 iPS 細胞を胚盤胞へマイクロインジェクションし、偽妊娠マウス子宮に移植することにより行った。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^{Min/+}* 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 の網羅的なメチル化解析には、Illumina 社の(1) Infinium

HumanMethylation27 または(2) HumanMethylation450 BeadChip、あるいは(3) Methylated CpG island amplification microarray (MCA) 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 β 値を用いてメチル化の程度を判定した。

MCA 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、シーケンス法、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、シーケンス(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アレイ CGH 法により行った。

(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 または 318 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) 遺伝子機能解析

遺伝子導入後、コロニー形成アッセイおよびマトリゲル浸潤アッセイにより解析した。

(10) 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 炎症による DNA メチル化異常の誘発機構の解析

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、その異常は発がんを遙か先だって大腸粘膜に誘発されていることを明らかにしてきた。また、DNA メチル化異常誘発の最終段階には T・B 細胞は不要であることを示してきた。さらに、炎症は H3K27me3 修飾異常も誘導し、その一部が DNA メチル化異常に進展することを明らかにしてきた。

本年度は、TMK1 細胞株を炎症関連因子である IL1β で処理することにより、DNA メチル基転移酵素の活性に変化が無いものの、DNA 脱メチル化に關与する TET 遺伝子群の発現が低下することを見出した。同様の結果は、ピロリ菌に感染したスナネズミ胃粘膜においても認められた。

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

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、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、大腸腫瘍由来の初期化細胞 (RT 細胞) を樹立した。さらに、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、RT 細胞が胎盤組織へと分化することと、腫瘍性増殖能を失うことを示した。

本年度は、大腸腫瘍細胞における *Apc* 遺伝子の欠損が分化異常の原因となっている可能性を考慮し、腫瘍由来 iPSC 様細胞は、*Apc* のレスキューにより個体への発生が可能であることを示した。キメラマウスにおいてレスキューした *Apc* 遺伝子を再破壊した結果、腸管上皮においては腫瘍が発生する一方で、肝臓など他の種類の細胞種では、*Apc* 遺伝子の再破壊後も明らかな腫瘍性変化は確認できなかった。

また、初期化可能マウスにドキシサイクリンを約 4 週間投与することにより、様々な臓器に多能性幹細胞を含む奇形腫が発生することを見出し、生体マウス内で iPS 細胞を作製することに成功した。次に生体内初期化を途中で中止したところ、奇形腫とは異なる、Wilms 腫瘍に類似した腫瘍の形成を引き起こすことを見出した。それらの腫瘍細胞では多能性幹細胞と部分的に類似した DNA メチル化パターンを示す一方で、多能性幹細胞におけるポリコム標的遺伝子が抑制されていなかった。不完全な初期化により発生したがん細胞は、完全初期化により、iPS 細胞へと変化し、非腫瘍性の細胞へと分化可能であ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 胃がんにおけるがん関連シグナル経路のジェネティックおよびエピジェネティック異常

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、non-coding RNA 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。また、30 症例の胃がんについて、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い、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。

本年度は、50 症例の胃がんについて同様の解析を行い、27 症例の胃がん中に合計 35 個の変異を確認、WNT 経路ではその negative regulator の DNA メチル化異常が主に認められること、AKT/mTOR 経路や MAPK 経路ではがん遺伝子変異が主であること、p53 経路

では p53 遺伝子変異と下流遺伝子の DNA メチル化異常の双方が認められることを示した。

2-2 大腸がん抑制遺伝子 *DGKG* の同定

昨年度までに、*ANGPTL4* および *FHL1* 遺伝子は、胃がんや大腸がんで変異および 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、大腸がんの浸潤・転移に關与する遺伝子メチル化をスクリーニングし、*NTSR1* のメチル化が大腸がん浸潤に關することを発見した。

本年度は、大腸がん細胞においてエピジェネティックに不活化し、かつ臨床例においても高頻度にメチル化する遺伝子の同定を目的とした。大腸がん細胞 HCT116 において脱メチル化処理によって発現回復する遺伝子を発現マイクロアレイおよびヒストン修飾 (H3K4me3) データを用いて同定した。また、腺管分離法で分離した大腸がん臨床例の DNA メチル化を MCAM 法で解析した。それらを統合して、大腸がんにおいてメチル化する遺伝子 219 個を同定した。Gene Ontology 解析からそれらの遺伝子は発生、分化に強く關連することが示され、その中から、シグナル脂質変換酵素遺伝子 *DGKG* に注目した。*DGKG* の異常 DNA メチル化は大腸腺腫および大腸がんの 50~60% において認められた。また *DGKG* 発現により大腸がん細胞の増殖、遊走、浸潤の抑制効果が認められた。

(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

がんの病態診断としては、これまでに、臨床的有用性が高い神経芽細胞腫の DNA メチル化予後マーカーを同定した。前向きに収集した材料での予後診断と追跡を継続して進めており、現在 227 症例の DNA メチル化診断結果を保有している。

また、腎細胞がんについては、昨年度までに、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、学習コホートの 102 組織検体を、MassARRAY 解析に供した。23 個の CpG ユニットの診断閾値を組み合わせると CIMP 診断基準を定めた結果、学習コホートの CIMP 陽性腎細胞がん 14 症例を、感度・特異度とも 100% で CIMP 陰性腎細胞がん症例から区別することが可能であった。

本年度は、検証コホート腎臓明細胞がん 100 症例のがん組織検体において、CIMP 診断のための MassARRAY 解析を行った。G ユニットのうち 16 CpG ユニット以上において DNA メチル化率が診断閾値より高値を示し、これまでに策定した診断基準により

CIMP 陽性と診断された検証コホートの腎細胞がんは、5 症例であった。検証コホートにおける腎細胞がん症例の予後については、CIMP 陽性腎臓明細胞がん症例の無再発生存率 ($P=1.41 \times 10^{-5}$)・全生存率 ($P=2.43 \times 10^{-13}$) 共に、CIMP 陰性症例に比して有意に低値であり、CIMP 陽性腎細胞がんの再発のハザード比は 10.6 倍 (COX 回帰, 95%信頼区間 2.81-40.2, $P=5.03 \times 10^{-4}$)、死亡のハザード比は 75.8 倍 (95%信頼区間 7.81-735, $P=1.89 \times 10^{-4}$) であった。

他方で、MassARRAY 法は定量性に優れているが、大型で高額な機器を要し、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、国内診断機器メーカーと共同研究契約を結び、MassARRAY 法とは異なるプラットフォームの DNA メチル化診断専用機器の共同開発研究を実施している。同一の組織検体において DNA メチル化定量を実施したところ、DNA メチル化率ならびに CIMP の有無の判定について、MassARRAY 法による結果と良好な一致を見ている。

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、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進めており、DNA メチル化解析を継続している。現在 3 年目経過中である。興味深いことに、治療直後にそのメチル化レベルが有意な低下を示した遺伝子に関して、1 年後の解析において、メチル化が上昇している症例が存在した。

さらに今年度は、DNA の網羅的メチル化解析にて有意に治療前後で差を認めた 18 の候補アレイプロープ (11 遺伝子) のうち HOX ドメインを有する転写因子である *BARHL2* 遺伝子の機能解析および分子マーカーとしての有用性について解析を進めた。*BARHL2* 遺伝子は胃がん細胞株 (MKN7, MKN45) においてメチル化によりサイレンシングされていることを確認した。MKN45 に対する *BARHL2* の遺伝子導入により、コロニー形成が抑制されることを示した。また、免疫染色により、*BARHL2* は胃がん組織において高頻度で発現低下していることを見出した。64 症例における *BARHL1* のメチル化解析により、症例の約 8 割が治療前において、高メチル化を示し、治療後にそのメチル化レベルが有意に低下することを示した ($P < 0.0001$)。

3-3 CIMPによる神経芽細胞腫の予後診断

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 症例について CIMP の診断を行った。

3-4 胃発がんリスク診断

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世界で初めて示してきた。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。826 症例での前向き臨床研究 (ESD 後の再発予測) の結果、有用性が確認された。

(4) エピジェネティック治療の基盤確立

新規のエピジェネティック薬のスクリーニングを目的として、昨年度までに、メチル化されたヒト遺伝子プロモーター下流に分泌性ルシフェラーゼ遺伝子を連結したコンストラクトを構築、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 に導入して、DNA 脱メチル化剤のハイスループットスクリーニングが可能な細胞を得た。本年度は、理化学研究所との共同研究により、19,840 個の化合物ライブラリー (NPDepo) をスクリーニングし、再現性が確認された 4 個のヒット化合物を得た。

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、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を示してきた。本年度は、ピロリ菌感染、さらに、慢性炎症による DNA メチル化異常の誘発と発現量がよく相関する IL1 β による細胞株の処理により、DNA 脱メチル化に関わる TET 遺伝子群の発現が低下することを明らかにした。このことから、DNA 脱メチル化作用の減弱が IL1 β によるメチル化異常誘発機構の一部である可能性が示された。DNA メチル化異常の誘発に重要な因子や機構を解明すれば、発がん促進作用の強い炎症の判別や、異常誘発に関与する遺伝子を標的としたがん予防につながる。

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。本年度の研究において、大腸腫瘍細胞から樹立された RT 細胞を大腸上皮以外に分化転換させると、その腫瘍性増殖能を失うことから、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を失うことが示された。エピゲノム制御が、遺伝子に傷を持ったがん細胞においても、その性質決定に重要な役割を果たしていることを示すものと考えられる。エピゲノム制御を標的としたがん治療の妥当性を示すと共に、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。

さらに、不完全な初期化、即ち、多能性獲得に向かう不完全なエピゲノムの改変が小児がん類似病変の形成、維持に関与していることが示された。同時に細胞脱分化が DNA メチル化異常の原因となりうることを示唆された。本研究における一連のプロセスには遺伝子配列の変化は起こらないことを考慮すると、不完全な初期化による発がん過程は遺伝子変異により引き起こされるのではなく、エピジェネティック修飾状態の変化による発がんであることが示唆された。小児がんなど一部の発がんでは同様の発がんメカニズムが働いている可能性が考えられた。同時にそのようながんでは、エピゲノム制御への介入が有効な治療法となりうることを示唆された。

(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

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。本年度までに、ヒト大腸がん及び胃がんにおいて DNA メチル化異常が誘発されるがん抑制遺伝子を複数 (*ANGPTL4*, *FHL1*, *DGKG*) 同定してきた。さらに、エピゲノム、ゲノム異常の統合的な解析の結果、胃がんにおいては、ジェネティック、エピジェネティック双方の異常により、がん関連遺伝子経路の異常が形成されていることを示した。

(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。がんの病態診断としては、神経芽細胞腫の予後診断の精度が向上すれば、特に中間リスク群で、積極的または待機的な治療選択がより正確に行えるようになる。検査企業との共同研究も順調に進行している。

また、本年度は、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について、検証セットを用いてその有用性を確認した。さらに、病院における臨床検査としての実用化のために、国内診断機器メーカーと、DNA メチル化診断専用機器の共同開発研究を進めている。腎摘除術後に急速に転移・再発を来す腎細胞がん症例は、臨床病理学的に予測困難である。一方で、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。本マーカーが臨床検査として実用化されれば、再発リスクに応じた術後治療が実施可能になると期待される。

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。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。また、*BARHL2* 遺伝子の DNA メチル化は、胃発がん早期において重要であることが示唆された。前向き試験に用いているマーカー同様の、有望なバイオマーカー候補と考えられる。

発がんリスク診断としては、別途遂行した前向き臨床研究により、非がん部に蓄積した DNA メチル化異常を用いて特定個人の現在の発がんリスクの診断が可能であることが示された。今後は、診断結果に応じて生活指導や検診の間隔調整が行えるか否かを明らかにする。エピジェネティック異常の蓄積を用いたリスク診断に関しては、本研究班の研究者が世界の最先端である。

(4) エピジェネティック治療の基盤確立

現在、各国でエピジェネティック薬の開発競争が行われている。本研究で得られたヒット化合物 4 個の中には既知の DNA 脱メチル化剤が含まれ、スクリーニング系の妥当性が示された。また、幅広い作用点の化合物の検出が可能で本スクリーニング系の特徴から、従来とは異なる作用点を持つ化合物も含まれることが期待される。スクリーニング対象とするライブラリーを拡張することにより、さらに多くのヒット化合物が得られる可能性もある。

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. Yoda Y, Takeshima H, Niwa T, Kim JG, Ando T, Kushima R, Sugiyama T, Katai H, Noshiro H and Ushijima T. Integrated analysis of cancer-related

pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer. **Gastric Cancer**, online.

2. 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**, 33: 2273-2278, 2014.
3. Takahashi T, Matsuda Y, Yamashita S, Hattori N, Kushima R, Lee YC, Igaki H, Tachimori Y, Nagino M and Ushijima T. Estimation of the fraction of cancer cells in a tumor DNA sample using DNA methylation. **PLoS One**, 8: e82302, 2013.
4. Shigematsu Y, Niwa T, Rehnberg E, Toyoda T, Yoshida S, Mori A, Wakabayashi M, Iwakura Y, Ichinose M, Kim YJ and Ushijima T. Interleukin-1b induced by *Helicobacter pylori* infection enhances mouse gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, 340: 141-147, 2013.
5. Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H and Nakagawara A. Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. **J Clin Invest**, 123: 2935-2947, 2013.
6. Asada K, Abe M and Ushijima T. Clinical application of the CpG island methylator phenotype to prognostic diagnosis in neuroblastomas. **J Hum Genet**, 58: 428-433, 2013.
7. Hattori N, Niwa T, Kimura K, Helin K and Ushijima T. Visualization of multivalent histone modification in a single cell reveals highly concerted epigenetic changes on differentiation of embryonic stem cells. **Nucleic Acids Res**, 41: 7231-7239, 2013.
8. 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**, 43: 641-645, 2013.
9. 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.

10. 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.
 11. 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.
 12. Sato T, Arai E, Kohno T, Takahashi Y, Miyata S, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T and Kanai Y. Epigenetic clustering of lung adenocarcinomas based on DNA methylation profiles in adjacent lung tissue: its correlation with smoking history and chronic obstructive pulmonary disease. **Int J Cancer**, in press.
 13. Kanai Y and Arai E. Multilayer-omics analyses of human cancers: exploration of biomarkers and drug targets based on the activities of the International Human Epigenome Consortium. **Front Genet**, 5: 24, 2014.
 14. 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.
 15. Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Noshio K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, Suzuki H and Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. **J Gastroenterol**, online.
 16. 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.
 17. 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.
 18. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E and Kai M. Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. **Front Genet**, 4: 258, 2013.
 19. Ohnishi K †, Semi K †, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K and Yamada Y. □ Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. □ † These authors are equally contributed to this work. **Cell**, 156: 663-677, 2014.
 20. 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.
 21. 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.
- 本研究費に密接に関係するもの
1. Yamada M, Fukagawa T, Nakajima T, Asada K, Sekine S, Yamashita S, Okochi-Takada E, Taniguchi H, Kushima R, Oda I, Saito Y, Ushijima T and Katai H. Hereditary diffuse gastric cancer in a Japanese family with a large deletion involving *CDH1*. **Gastric Cancer**, online.
 2. Imaoka T, Nishimura M, Doi K, Tani S, Ishikawa K, Yamashita S, Ushijima T, Imai T and Shimada Y. Molecular characterization of cancer reveals interactions between ionizing radiation and chemicals on rat mammary carcinogenesis. **Int J Cancer**, 134, 1529-1538, 2014.
 3. Yoshida T, Kato J, Inoue I, Yoshimura N, Deguchi H, Mukoubayashi C, Oka M, Watanabe M, Enomoto S, Niwa T, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Utsunomiya H, Yamamichi N, Fujishiro M, Iwane M, Takeshita T, Ushijima T and Ichinose M. Cancer development based on chronic active gastritis and resulting gastric atrophy as assessed by serum levels of pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody titer. **Int J Cancer**, 134: 1445-1457, 2014.

4. Suzuki T, Yamashita S, Ushijima T, Takumi S, Sano T, Michikawa T and Nohara K. Genome-wide analysis of DNA methylation changes induced by gestational arsenic exposure in liver tumors. **Cancer Sci**, 104: 1575-1585, 2013.
5. Ito Y, Yamada Y, Asada K, Ushijima T, Iwasa S, Kato K, Hamaguchi T and Shimada Y. EGFR L2 domain mutation is not correlated with resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. **J Cancer Res Clin Oncol**, 139: 1391-1396, 2013.
6. 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**, 16: 488-497, 2013.
7. Imai S, Ikegami D, Yamashita A, Shimizu T, Narita M, Niikura K, Furuya M, Kobayashi Y, Miyashita K, Okutsu D, Kato A, Nakamura A, Araki A, Omi K, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, Ando T, Takeshima H, Ushijima T, Kuzumaki N, Suzuki T and Narita M. Epigenetic transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 3 contributes to long-lasting neuropathic pain. **Brain**, 136: 828-843, 2013.
8. Arai E, Sakamoto H, Ichikawa H, Totsuka H, Chiku S, Gotoh M, Mori T, Nakatani T, Ohnami S, Nakagawa T, Fujimoto H, Wang L, Aburatani H, Yoshida T and Kanai Y. Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome. **Int J Cancer**, online.
9. 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.
10. Nishikawa G, Sekine S, Ogawa R, Matsubara A, Mori T, Taniguchi H, Kushima R, Hiraoka N, Tsuta K, Tsuda H and Kanai Y. Frequent GNAS mutations in low-grade appendiceal mucinous neoplasms. **Br J Cancer**, 108: 951-958, 2013.
11. Chihara Y, Kanai Y, Fujimoto H, Sugano K, Kawashima K, Liang G, Jones PA, Fujimoto K, Kuniyasu H and Hirao Y. Diagnostic markers of urothelial cancer based on DNA methylation analysis. **BMC Cancer**, 13: 275, 2013.
12. Matsubara A, Sekine S, Yoshida M, Yoshida A, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H and Kanai Y. Prevalence of MED12 mutations in uterine and extrauterine smooth muscle tumors. **Histopathology**, 62: 657-661, 2013.
13. Matsubara A, Sekine S, Kushima R, Ogawa R, Taniguchi H, Tsuda H and Kanai Y. Frequent GNAS and KRAS mutations in pyloric gland adenoma of the stomach and duodenum. **J Pathol**, 229: 579-587, 2013.
14. Yamazaki H, Mori T, Yazawa M, Maeshima A, Matsumoto F, Yoshimoto S, Ota Y, Kaneko A, Tsuda H and Kanai Y. Stem cell self-renewal factors, Bmi1 and HMGA2 expressed in head and neck squamous cell carcinoma: Clues to the tumor characteristics for diagnosis. **Lab Invest**, 93: 1331-1338, 2013.
15. Nakagawa T, Hara T, Kawahara T, Ogata Y, Nakanishi H, Komiyama M, Arai E, Kanai Y and Fujimoto H. Prognostic risk stratification of patients with urothelial carcinoma of the bladder with recurrence after radical cystectomy. **J Urol**, 189: 1275-1281, 2013.
16. Hara T, Nakanishi H, Nakagawa T, Komiyama M, Kawahara T, Manabe T, Miyake M, Arai E, Kanai Y and Fujimoto H. Ability of preoperative 3.0-Tesla magnetic resonance imaging to predict the absence of side-specific extracapsular extension of prostate cancer. **Int J Urol**, 20: 993-999, 2013.
17. Oguro S, Shimada K, Ino Y, Esaki M, Nara S, Kishi Y, Kosuge T, Kanai Y and Hiraoka N. Pancreatic intraglandular metastasis predicts poorer outcome in postoperative patients with pancreatic ductal carcinoma. **Am J Surg Pathol**, 37: 1030-1038, 2013.
18. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Oguro S, Shimada K, Kosuge T, Zavada J, Kanai Y and Hiraoka N. Arginase II expressed in cancer-associated fibroblasts indicates tissue hypoxia and predicts poor outcome in patients with pancreatic cancer. **PLoS One**, 8: e55146, 2013.
19. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y and Hiraoka N. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. **Br J Cancer**, 108: 914-923, 2013.
20. Tahara T, Yamamoto E, Madireddi P, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano HO, Sugai T, Kondo Y, Toyota M, Issa JP and Estécio MR. Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators. **Gastroenterology**, 146: 530-538, 2014.
21. Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano HO, Sugai

- T, An B, Shureiqi I, Toyota M, Kondo Y, Estecio MR and Issa JP. Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. **Cancer Res**, 74: 1311-1318, 2014.
22. Noshō K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, Naito T, Sukawa Y, Mikami M, Sumioka W, Yamamoto E, Kurokawa S, Adachi Y, Takahashi H, Okuda H, Kusumi T, Hosokawa M, Fujita M, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Suzuki H, Yamamoto H and Shinomura Y. Association of MicroRNA-31 with BRAF mutation, Colorectal-Cancer Survival and Serrated pathway. **Carcinogenesis**, 35: 776-783, 2014.
 23. Honda S, Okada T, Miyagi H, Minato M, Suzuki H and Taketomi A. Spontaneous rupture of an advanced pancreaticoblastoma: aberrant RASSF1A methylation and CTNNB1 mutation as molecular genetic markers. **J Pediatr Surg**, 48: e29-32, 2013.
 24. Morita R, Hirohashi Y, Suzuki H, Takahashi A, Tamura Y, Kanaseki T, Asanuma H, Inoda S, Kondo T, Hashino S, Hasegawa T, Tokino T, Toyota M, Asaka M, Torigoe T and Sato N. DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers. **Exp Mol Pathol**, 94: 322-329, 2013.
 25. Ohashi T, Idogawa M, Sasaki Y, Suzuki H and Tokino T. AKR1B10, a transcriptional target of p53, is Downregulated in Colorectal Cancers Associated with Poor Prognosis. **Mol Cancer Res**, 11: 1554-1163, 2013.
 26. Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, Itoh F, Tsugawa K and Ohta T. Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. **Genes Cells**, 18: 1120-1130, 2013.
2. 学会発表
1. Ushijima T. Sample optimization for development of clinically relevant cancer risk and prognostic biomarkers. Workshop at the AACR Annual Meeting. Washington, DC, April, 2013. (invited)
 2. Ushijima T. Aberrant H3K27me3 and DNA methylation induced by chronic inflammation. Gordon Research Conference (Cancer Genetics and Epigenetics). Il Ciocco, April, 2013. (invited)
 3. Ushijima T and Takeshima H. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of gastric cancers. Next Frontiers to Cure Cancer. São Paulo, June, 2013. (invited)
 4. Yoda Y, Kim JG, Takeshima H, Niwa T, Rehnberg E, Shigematsu Y, Yamashita S, Ando T, Sugiyama T, Katai H and Ushijima T. Mutation analysis by a personal sequencer and comprehensive DNA methylation analysis of gastric cancers. Workshop at the 10th International Gastric Cancer Congress. Verona, June, 2013.
 5. Ushijima T. Inflammation and epigenetic field for cancerization. 2nd Taiwan Epigenomics Meeting. Chia-Yi, July, 2013. (invited)
 6. Ushijima T. Epigenomic alterations induced by chronic inflammation. Jacques-Monod Conference. Roscoff, September, 2013. (invited)
 7. Ushijima T. Induction of Aberrant DNA methylation of *H. pylori* infection, and its application to cancer risk diagnosis and prevention. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. Maihama, December, 2013. (invited)
 8. Yoda Y, Takeshima H, Niwa T, Kim JG, Yamashita S, Ando T, Sugiyama T, Katai H and Ushijima T. Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancers. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. Maihama, December, 2013.
 9. 高橋崇真, 山下 聡, 松田恭典, 久嶋亮治, 牛島俊和. DNA メチル化を用いた細胞含有率測定マーカーの確立. 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2013 年 5 月.
 10. 牛島俊和. エピゲノム変化の誘発機構. 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月.
 11. 牛島俊和. *H. pylori* 感染胃炎によるエピジェネティックな発がん素地の形成とその橋渡し. 第 19 回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2013 年 6 月.
 12. 牛島俊和. Induction mechanism of epigenetic alterations. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月.
 13. 與田幸恵, 竹島秀幸, 若林美香, レンバーグエミル, 渡邊直子, 牛島俊和. 低用量エピジェネティック治療が高い治療効果を示すメカニズムの解明. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月.
 14. 牛島俊和. 炎症によるエピジェネティック異常誘発の分子機構. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「DNA メチル化の制御機構-メチル化模様形成、維持と消去-」, 2013 年 11 月.
 15. 高橋崇真, 山下 聡, 松田恭典, 久嶋亮治, 牛島俊和. DNA メチル化を用いた細胞含有量測定マーカーの確立. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月.
 16. 與田幸恵, 竹島秀幸, 丹羽 透, 山下 聡, 安藤孝将, 杉山敏郎, 片井 均, 牛島俊和. Integrated profiles of genetic and epigenetic alterations

- involved in gastric cancer-related pathway. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月.
17. 與田幸恵, 竹島秀幸, 丹羽 透, 山下 聡, 安藤孝将, 杉山敏郎, 片井 均, 牛島俊和. 遺伝子異常およびエピジェネティック異常の影響を受ける癌関連パスウェイの統合的解析. 第 86 回日本胃癌学会総会, 2014 年 3 月.
 18. Kanai Y. Epigenome profiling during multistage human carcinogenesis and activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). 2013 Illumina Scientific Summit, Phuket, April 2013. (invited)
 19. 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/ β -catenin pathway as a key player in the development of renal cell carcinoma. AACR Annual Meeting, Washington, DC, April, 2013.
 20. 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 carcinogenic pathway, clinicopathological aggressiveness and patient outcome. AACR Annual Meeting, Washington, DC, April, 2013.
 21. Arai E, Miura F, Yamashita S, Shibata T, Ito T, Suzuki Y, Tian Y, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T and Kanai Y. Epigenome mapping in purified human hepatocytes. Annual Meeting and Science Days IHEC 2013, Berlin, November, 2013.
 22. Yamanoi K, Arai E, Takahashi Y, Miyata S, Kushima R, Katai H, Sakamoto M and Kanai Y. Epigenetic clustering of gastric carcinoma based on DNA methylation profiles at the precancerous stage: its correlation with tumor aggressiveness and patient outcome. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. Maihama, December, 2013.
 23. 新井恵史, 坂本裕美, 尾野雅哉, 高橋順子, 宮田彩香, 藤元博行, 後藤政広, 山田哲司, 吉田輝, 金井弥栄. 腎細胞がんの多層的オミックス解析. Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma. 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2013 年 5 月.
 24. 田 迎, 新井恵史, 後藤政広, 藤元博行, 金井弥栄. CpG アイランドメチル化形質陽性腎細胞がんの DNA メチル化診断法の開発. Epigenetic diagnosis of CpG island methylator phenotype renal cell carcinomas. 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2013 年 5 月.
 25. 金井弥栄. がんにおけるエピゲノム変化の解明と病態診断への応用. シンポジウム 7「エピゲノムが拓く新たな人体病理学」第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 (招待講演).
 26. 新井恵史, 坂本裕美, 尾野雅哉, 高橋順子, 宮田彩香, 藤元博行, 澁谷亜矢子, 後藤政広, 山田哲司, 吉田輝彦, 金井弥栄. 腎細胞がんの多層的オミックス解析. 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月.
 27. 金井弥栄. 国際ヒトエピゲノムコンソーシアムの取り組み. Activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). モーニングレクチャー5, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 (招待講演).
 28. 新井恵史, 坂本裕美, 尾野雅哉, 高橋順子, 宮田彩香, 藤元博行, 澁谷亜矢子, 後藤政広, 山田哲司, 吉田輝彦, 金井弥栄. CpG アイランドメチル化形質腎細胞がんの多層的オミックス解析. Integrated Multilayer-Omics Analysis in CpG Island Methylator Phenotype-positive Renal Cell Carcinomas. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月.
 29. 田迎, 新井恵史, 後藤政広, 藤元博行, 金井弥栄. CpG アイランドメチル化形質マーカー遺伝子の DNA メチル化レベルを指標とする腎細胞がんの予後診断法の開発. Epigenetic prognostication of renal cell carcinoma patients using CpG island methylator phenotype marker genes. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月.
 30. 鈴木 拓. がんエピゲノム解析による病態解明と診断応用. 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月.
 31. 鈴木 拓, 山本英一郎, 丸山玲緒, 鈴木 亮, 清水 崇, 原田 拓, 山野泰穂, 野島正寛, 高塚伸太郎, 新沼 猛, 甲斐正広, 篠村恭久, 今井浩三. マイクロ RNA 遺伝子のエピジェネティクス異常と臨床応用. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月.
 32. 丸山玲緒, 山本英一郎, 桑川昂平, 津矢田明泰, 鈴木 亮, 芦田仁己, 佐藤亜紀子, 甲斐正広, 山野泰穂, 菅井 有, 篠村恭久, 時野隆至, 鈴木拓. 消化器癌において重要な役割を果たす長鎖 ncRNA の網羅的同定の試み. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月.
 33. 原田 拓, 山本英一郎, 野島正寛, 丸山玲緒, 佐藤亜紀子, 甲斐正広, 山野泰穂, 鈴木 拓. 腸管洗浄液のメチル化検出による大腸癌診断法の開発. 第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2013 年 10 月.
 34. 丸山玲緒, 山本英一郎, 桑川昂平, 津矢田明泰, 鈴木 亮, 芦田仁己, 甲斐正広, 佐藤亜紀子, 新

- 沼 猛, 山野泰穂, 菅井 有, 篠村恭久, 時野隆至, 鈴木 拓. 消化器癌の発生や進展に關与する長鎖 ncRNA の量的・質的異常の探索と臨床応用への試み. 第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2013 年 10 月.
35. 鈴木 拓. microRNA 遺伝子のエピジェネティクス異常によるがん診断. 日本がん分子標的治療学会第 9 回トランスレーショナルワークショップ, 2014 年 1 月.
36. 鈴木 拓. 消化器癌のマイクロ RNA 異常とその臨床応用. エピジェネティック療法研究会第 6 回講演会, 2014 年 2 月.
37. 大石嘉恭, 渡邊嘉行, 平石哲也, 前畑忠輝, 伊東文生. 早期胃がん分子診断応用における Sox17 遺伝子高メチル化の有用性. 第 50 回日本臨床分子医学会学術集会, 2013 年 4 月.
38. 細谷浩介, 渡邊嘉行, 及川律子, 森田 亮, 吉田良仁, 前畑忠輝, 松本伸行, 山本博幸, 伊東文生. 早期胃がんの分子診断応用における BARHL2 遺伝子高メチル化の有用性. 第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2013 年 10 月.
39. 前畑忠輝, 渡邊嘉行, 及川律子, 吉田良仁, 森田 亮, 細谷浩介, 松本伸行, 山本博幸, 伊東文生. 早期胃がんの分子診断応用における BARHL2 遺伝子高メチル化の有用性. 第 64 回日本電気泳動学会総会, 2013 年 11 月.
40. Yamada Y. Dissecting cancer biology by studying induced pluripotency. Gordon Research Conference. Galveston, TX, March, 2014.
- 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、ピロリ菌感染あるいは IL1 β 処理により、DNA 脱メチル化に関与する *TET* 遺伝子群の発現が低下することを見出した。エピゲノム、ゲノム異常の統合的な解析の結果、胃がんにおいては、ジェネティック、エピジェネティック双方の異常により、がん関連シグナル経路の異常が形成されていることを示した。神経芽細胞腫の予後診断の前向き試験を継続した。これまでに開発した DNA 脱メチル化剤のハイスループットスクリーニング系を用いて、19,840 個の化合物ライブラリーをスクリーニングした結果、再現性が確認された 4 個のヒット化合物を得た。

A．研究目的

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

ゲノム網羅的な解析により見出された DNA メチル化異常が遺伝子プロモーター領域 CpG アイランド (CGI) に存在する場合、下流遺伝子のサイレンシングの原因となる。サイレンシングされる遺伝子には、がん化の原因として関与する遺伝子（ドライバー；主にがん抑制遺伝子）と、がん化の結果または随伴現象としてサイレンシングされた遺伝子（パッセンジャー）が存在する。ドライバーの同定が重要なことは明らかであるが、パッセンジャーや、遺伝子サイレンシングの原因とはならない非プロモーター領域の DNA メチル化異常でも、診断的に有用な場合がある。

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

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 の網羅的なメチル化解析には、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 β 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。

(6) 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 または 318 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) 炎症による DNA メチル化異常の誘発機構の解析

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遙か先だって大腸粘膜に誘発されていることを明らかにしてきた。また、DNA メチル化異常誘発の最終段階には T・B 細胞は不要であることを示してきた。さらに、炎症は H3K27me3 修飾異常も誘導し、その一部が DNA メチル化異常に進展することを明らかにしてきた。

本年度は、TMK1 細胞株を炎症関連因子である IL1 β で処理することにより、DNA メチル基転移酵素の活性に変化が無いものの、DNA 脱メチル化に関与する TET 遺伝子群の発現が低下することを見出した。同様の結果は、ピロリ菌に感染したスナネズミ胃粘膜においても認められた。

(2) 胃がんにおけるがん関連経路のジェネティック

およびエピジェネティック異常

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、昨年度までに、30 症例の胃がんについて、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、異常メチル化を示す遺伝子数は個々の胃がんにおいて大きく異なることを示した。また、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。

本年度は、50 症例の胃がんについて同様の解析を行い、27 症例の胃がん中に合計 35 個の変異を確認、WNT 経路ではその negative regulator の DNA メチル化異常が主に認められること、AKT/mTOR 経路や MAPK 経路ではがん遺伝子変異が主であること、p53 経路では p53 遺伝子変異と下流遺伝子の DNA メチル化異常の双方が認められることを示した。

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

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世界で初めて示してきた。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。826 症例での前向き臨床研究 (ESD 後の再発予測) の結果、有用性が確認された。

(4) エピジェネティック治療の基盤の確立

新規のエピジェネティック薬のスクリーニングを目的として、昨年度までに、メチル化されたヒト UCHL1 遺伝子プロモーター下流に分泌性ルシフェラーゼ遺伝子を連結したコンストラクトを構築、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 に導入して、DNA 脱メチル化剤のハイスループットスクリーニングが可能な細胞を得た。本年度は、理化学研究所との共同研究により、19,840 個の化合物ライブラリー (NPDepo) をスクリーニングし、再現性が確認された 4 個のヒット化合物を得た。

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、ピロリ菌感染、さらに、慢性炎症による DNA メチル化異常の誘発と発現量がよく相関する IL1 β による細胞株の処理により、DNA 脱メチル化に関わる TET 遺伝子群の発現が低下することを明らかにした。このことから、DNA 脱メチル化作用の減弱が IL1 β によるメチル化異常誘発機構の一部である可能性が示さ

れた。DNA メチル化異常の誘発に重要な因子や機構を解明すれば、発がん促進作用の強い炎症の判別や、異常誘発に関与する遺伝子を標的としたがん予防につながる。

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。これまでに、ヒト大腸がん及び胃がんにおいて DNA メチル化異常が誘発される遺伝子を複数 (*ANGPTL4*, *FHL1*) 同定してきた。これらは創薬標的となる可能性があり、常にその視点からの検討を加えている。さらに、エピゲノム、ゲノム異常の統合的な解析の結果、胃がんにおいては、ジェネティック、エピジェネティック双方の異常により、がん関連遺伝子経路の異常が形成されていることを示した。

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。神経芽細胞腫の予後診断の精度が向上すれば、特に中間リスク群で、積極的または待機的な治療選択がより正確に行えるようになる。検査企業との共同研究も順調に進行している。

現在、各国でエピジェネティック薬の開発競争が行われている。本研究で得られたヒット化合物4個の中には既知の DNA 脱メチル化剤が含まれ、スクリーニング系の妥当性が示された。また、幅広い作用点の化合物の検出が可能な本スクリーニング系の特徴から、従来とは異なる作用点を持つ化合物も含まれることが期待される。スクリーニング対象とするライブラリーを拡張することにより、さらに多くのヒット化合物が得られる可能性もある。

E . 結論

TET 遺伝子群の発現低下による DNA 脱メチル化作用の減弱が炎症によるメチル化異常誘発機構の一部である可能性が示された。胃がんにおいては、ジェネティック、エピジェネティック双方の異常により、がん関連遺伝子経路の異常が形成されていることを示した。神経芽細胞腫の予後診断の前向き試験を継続した。DNA 脱メチル化剤のハイスループットスクリーニング系を用いて4個のヒット化合物を得た。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. Yoda Y, Takeshima H, Niwa T, Kim JG, Ando T, Kushima R, Sugiyama T, Katai H, Noshiro H and Ushijima T. Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer. **Gastric Cancer**, online.
2. 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**, 33: 2273-2278, 2014.
3. Takahashi T, Matsuda Y, Yamashita S, Hattori N, Kushima R, Lee YC, Igaki H, Tachimori Y, Nagino M and Ushijima T. Estimation of the fraction of cancer cells in a tumor DNA sample using DNA methylation. **PLoS One**, 8: e82302, 2013.
4. Shigematsu Y, Niwa T, Rehnberg E, Toyoda T, Yoshida S, Mori A, Wakabayashi M, Iwakura Y, Ichinose M, Kim YJ and Ushijima T. Interleukin-1b induced by *Helicobacter pylori* infection enhances mouse gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, 340: 141-147, 2013.
5. Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H and Nakagawara A. Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. **J Clin Invest**, 123: 2935-2947, 2013.
6. Asada K, Abe M and Ushijima T. Clinical application of the CpG island methylator phenotype to prognostic diagnosis in neuroblastomas. **J Hum Genet**, 58: 428-433, 2013.
7. Hattori N, Niwa T, Kimura K, Helin K and Ushijima T. Visualization of multivalent histone modification in a single cell reveals highly concerted epigenetic changes on differentiation of embryonic stem cells. **Nucleic Acids Res**, 41: 7231-7239, 2013.
8. 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**, 43: 641-645, 2013.
9. 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.
10. 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.
 11. 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.
6. 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**, 16: 488-497, 2013.
 7. Imai S, Ikegami D, Yamashita A, Shimizu T, Narita M, Niikura K, Furuya M, Kobayashi Y, Miyashita K, Okutsu D, Kato A, Nakamura A, Araki A, Omi K, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, Ando T, Takeshima H, Ushijima T, Kuzumaki N, Suzuki T and Narita M. Epigenetic transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 3 contributes to long-lasting neuropathic pain. **Brain**, 136: 828-843, 2013.
 8. Hirata A, Utika 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.

本研究費に密接に関係するもの

1. Yamada M, Fukagawa T, Nakajima T, Asada K, Sekine S, Yamashita S, Okochi-Takada E, Taniguchi H, Kushima R, Oda I, Saito Y, Ushijima T and Katai H. Hereditary diffuse gastric cancer in a Japanese family with a large deletion involving *CDH1*. **Gastric Cancer**, online.
 2. Imaoka T, Nishimura M, Doi K, Tani S, Ishikawa K, Yamashita S, Ushijima T, Imai T and Shimada Y. Molecular characterization of cancer reveals interactions between ionizing radiation and chemicals on rat mammary carcinogenesis. **Int J Cancer**, 134, 1529-1538, 2014.
 3. Yoshida T, Kato J, Inoue I, Yoshimura N, Deguchi H, Mukoubayashi C, Oka M, Watanabe M, Enomoto S, Niwa T, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Utsunomiya H, Yamamichi N, Fujishiro M, Iwane M, Takeshita T, Ushijima T and Ichinose M. Cancer development based on chronic active gastritis and resulting gastric atrophy as assessed by serum levels of pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody titer. **Int J Cancer**, 134: 1445-1457, 2014.
 4. Suzuki T, Yamashita S, Ushijima T, Takumi S, Sano T, Michikawa T and Nohara K. Genome-wide analysis of DNA methylation changes induced by gestational arsenic exposure in liver tumors. **Cancer Sci**, 104: 1575-1585, 2013.
 5. Ito Y, Yamada Y, Asada K, Ushijima T, Iwasa S, Kato K, Hamaguchi T and Shimada Y. EGFR L2 domain mutation is not correlated with resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. **J Cancer Res Clin Oncol**, 139: 1391-1396, 2013.
2. 学会発表
 1. Ushijima T. Sample optimization for development of clinically relevant cancer risk and prognostic biomarkers. Workshop at the AACR Annual Meeting. Washington, DC, April, 2013. (invited)
 2. Ushijima T. Aberrant H3K27me3 and DNA methylation induced by chronic inflammation. Gordon Research Conference (Cancer Genetics and Epigenetics). Il Ciocco, April, 2013. (invited)
 3. Ushijima T and Takeshima H. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of gastric cancers. Next Frontiers to Cure Cancer. São Paulo, June, 2013. (invited)
 4. Yoda Y, Kim JG, Takeshima H, Niwa T, Rehnberg E, Shigematsu Y, Yamashita S, Ando T, Sugiyama T, Katai H and Ushijima T. Mutation analysis by a personal sequencer and comprehensive DNA methylation analysis of gastric cancers. Workshop at the 10th International Gastric Cancer Congress. Verona, June, 2013.
 5. Ushijima T. Inflammation and epigenetic field for cancerization. 2nd Taiwan Epigenomics Meeting. Chia-Yi, July, 2013. (invited)
 6. Ushijima T. Epigenomic alterations induced by chronic inflammation. Jacque-Monod Conference. Roscoff, September, 2013. (invited)
 7. Ushijima T. Induction of aberrant DNA methylation of *H. pylori* infection, and its application to cancer

- risk diagnosis and prevention. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. Maihama, December, 2013. (invited)
8. Yoda Y, Takeshima H, Niwa T, Kim JG, Yamashita S, Ando T, Sugiyama T, Katai H and Ushijima T. Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancers. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. Maihama, December, 2013.
 9. 高橋崇真, 山下 聡, 松田恭典, 久嶋亮治, 牛島俊和. DNA メチル化を用いた細胞含有率測定マーカーの確立. 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2013 年 5 月.
 10. 牛島俊和. エピゲノム変化の誘発機構. 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月.
 11. 牛島俊和. *H. pylori* 感染胃炎によるエピジェネティックな発がん素地の形成とその橋渡し. 第 19 回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2013 年 6 月.
 12. 牛島俊和. Induction mechanism of epigenetic alterations. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月.
 13. 與田幸恵, 竹島秀幸, 若林美香, レンバーグエミル, 渡邊直子, 牛島俊和. 低用量エピジェネティック治療が高い治療効果を示すメカニズムの解明. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月.
 14. 牛島俊和. 炎症によるエピジェネティック異常誘発の分子機構. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「DNA メチル化の制御機構-メチル化模様形成、維持と消去-」, 2013 年 11 月.
 15. 高橋崇真, 山下 聡, 松田恭典, 久嶋亮治, 牛島俊和. DNA メチル化を用いた細胞含有量測定マーカーの確立. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月.
 16. 與田幸恵, 竹島秀幸, 丹羽 透, 山下 聡, 安藤孝将, 杉山敏郎, 片井 均, 牛島俊和. Integrated profiles of genetic and epigenetic alterations involved in gastric cancer-related pathway. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月.
 17. 與田幸恵, 竹島秀幸, 丹羽 透, 山下 聡, 安藤孝将, 杉山敏郎, 片井 均, 牛島俊和. 遺伝子異常およびエピジェネティック異常の影響を受ける癌関連パスウェイの統合的解析. 第 86 回日本胃癌学会総会, 2014 年 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ゲノム網羅的DNAメチル化解析で、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の存在を示し、腎細胞がん固有のCIMPマーカー17遺伝子を同定していた。さらに、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メチル化状態を精密定量し、診断能力が高いことが判明した23 CpGユニットに適切な診断閾値を設定して、CIMP診断基準を策定していた。

平成25年度には、検証コホートの腎臓明細胞がん100症例において、CIMP診断のためのMassARRAY解析を実施し、昨年度までに策定した診断基準で、予後不良であるCIMP陽性腎細胞がんを再現性を持って診断できることを示した。検証コホートのCIMP陽性腎細胞がんの無再発生存率（ $P=1.41 \times 10^{-5}$ ）・全生存率（ $P=2.43 \times 10^{-13}$ ）は、CIMP陰性腎細胞がんに比して有意に低値であった。Cox回帰によって、検証コホートのCIMP陽性腎細胞がんの再発のハザード比は10.6倍（95%信頼区間2.81-40.2, $P=5.03 \times 10^{-4}$ ）、死亡のハザード比は75.8倍（95%信頼区間7.81-735, $P=1.89 \times 10^{-4}$ ）であった。以上により、我々の基準を用いたCIMP診断が、腎細胞がん症例の予後診断法として有用であることが分かった。現在、病院における臨床検査としての実用化を目指し、国内医療機器メーカーとDNAメチル化診断専用機器の共同開発研究を実施している。

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陽性腎臓明細胞がんを高頻度に異常を来す分子経路を同定し、同分子経路阻害剤の奏効性をCIMP陽性モデルとなる腎がん細胞株で検証している。我々の診断基準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等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可能性がある）・淡明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た。

さらに、Infinium解析で既にCIMP陽性症例と

CIMP陰性症例に分類していた学習コホート104症例において、CIMPマーカー遺伝子プロモーターCpGアイランド全域にわたる299CpG部位のDNAメチル化率をMassARRAY法で精密定量した。受信者動作特性曲線（receiver operating characteristic: ROC）解析により、曲線下面積（area under the curve; AUC）0.95以上でCIMP陽性症例を区別できる23CpGユニットを同定した。23CpGユニットに適切な診断閾値を設定し、学習コホートのCIMP陽性症例を感度・特異度とも100%でCIMP陰性症例から区別できる、CIMP診断基準を確立していた。

本年度は、検証コホートの腎臓明細胞がん症例において、CIMP診断のためのMassARRAY解析を実施し、昨年度までに策定した診断基準の予後診断能力を検証することを研究の目的とする。さらに、病院における臨床検査としての実用化を目指し、国内医療機

器メーカーと DNA メチル化診断専用機器の共同開発研究を行う。さらに、多層的オミックス解析により同定されたCIMP陽性腎細胞がん治療標的候補分子経路阻害剤の奏効性を検証し、腎臓明細胞がんのCIMP診断が個別化医療におけるコンパニオン診断として有用であることを証明する。

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。腎臓明細胞がん症例の腎摘除術標本より、非がん腎組織検体 ならびにがん組織検体を採取した。

フェノール・クロロフォルム抽出により得たゲノム DNA500ng を、EZ DNA methylation Kit (Zymo Research)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。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 MAS (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

従来の Infinium HumanMethylation27 BeadChip による網羅的 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 (腫瘍型が大きく、単結節周囲増殖型あるいは多結節癒合型の肉眼型をとり、組織学的異型度が高度で、高頻度に腎静脈本幹腫瘍栓形成・小静脈侵襲・浸潤性発育・壊死を示し、診断時の病期が進展しており)、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 β 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。

平成 24 年度には、Infinium 解析により CIMP 陰性腎細胞がん 88 症例と CIMP 陽性腎細胞がん 14 症例に既に分類してあった学習コホートの 102 組織検体を、Infinium 解析とは異なる定量解析プラットフォームである MassARRAY 解析に供した。CIMP マーカー遺伝子プロモーター全域に亘る 299 CpG 部位の DNA メチル化率を、MassARRAY 法により精密定量した。本解析に先立って、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。解析の対象とした CIMP マーカー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。ROC 解析を行い 299 CpG 部位の AUC を算出したところ、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、上記 32 CpG 部位は、MassARRAY 法の計測値 23 個 (23 CpG ユニット)に相当する。23 CpG ユニットに、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、23 CpG

ユニットの診断閾値を組み合わせることでCIMP診断基準を策定した。同診断基準により、Infinium解析により既に同定していた学習コホートのCIMP陽性腎細胞がん14症例を、感度・特異度とも100%でCIMP陰性腎細胞がん症例から区別することができた。

本年度は、検証コホート腎臓明細胞がん100症例のがん組織検体において、CIMP診断のためのMassARRAY解析を実施した。平成24年度に策定したCIMP診断基準に組み込まれた23 CpGユニットのDNAメチル化率の精密定量値の、検証コホート100症例における分布は、学習コホート102症例のそれと良く類似していた。23 CpGユニットにおけるDNAメチル化プロファイルが、腎臓明細胞がんにおいて再現することが分かった。23 CpGユニットのうち16 CpGユニット以上においてDNAメチル化率が診断閾値より高値を示し、平成24年度に策定したCIMP診断基準によりCIMP陽性と診断された検証コホートの腎細胞がんは、5症例であった。

検証コホートにおいて、我々の診断基準によりCIMP陰性・CIMP陽性と診断された腎細胞がん症例の予後を、カプランマイヤー法で評価した(観察期間27日ないし5,031日[平均1,860日])。CIMP陽性腎臓明細胞がん症例の無再発生存率($P=1.41 \times 10^{-5}$)・全生存率($P=2.43 \times 10^{-13}$)は、CIMP陰性症例に比して有意に低値であった(ログランク検定)。Cox回帰によって、検証コホートのCIMP陽性腎細胞がんの再発のハザード比は10.6倍(95%信頼区間2.81-40.2, $P=5.03 \times 10^{-4}$)、死亡のハザード比は75.8倍(95%信頼区間7.81-735, $P=1.89 \times 10^{-4}$)であった。以上により、我々の基準を用いたCIMP診断が、腎細胞がん症例の予後診断法として有用であることが分かった。言い換えると、平成24年度までに策定した診断基準で、予後不良であるCIMP陽性腎細胞がんを再現性を持って診断できることが、平成25年度に明らかになった。

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、国内診断機器メーカーと共同研究契約を結び、MassARRAY法とは異なるプラットフォームのDNAメチル化診断専用機器の共同開発研究を実施している。同社の採用する測定原理により我々と同一の組織検体においてDNAメチル化定量を実施したところ、DNAメチル化率ならびにCIMPの有無の判定について、MassARRAY法による我々の結果と良好な一致を見ている。

また、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(多層的オミックス解析)を試みている。アミノ酸置換を伴う1塩基変異・欠失挿入型変異・mRNA発現異常・タンパク発現異常が高頻度である遺伝子を用いたMetaCore分子経路解析で、CIMP陽性腎細胞がんにおいては、3層のオミックスの異常が、細胞接着・細胞周期・DNA修復に関わる多数の分子経路に集積していることが分かった。これらの分子経路を構成する分子は、CIMP陽性腎細胞がんの治療薬創薬標的候補と考えられた。最も異常の頻度が高い分子経路の構成分子の、CIMP陽性症例における有意な発現亢進を、定量RT-PCR法で検証した。腎がん細胞株17株においてInfinium解析・MassARRAY解析・定量RT-PCR解析を実施し、CIMP陰性モデル腎がん細胞株3株・CIMP陽性モデル腎がん細胞株3株を同定した。最も異常の頻度が高い治療標的候補分子経路の上位分子の複数の阻害剤を入手し、CIMP陽性モデル腎がん細胞株において半数阻害濃度等を算出し、奏効性の検証を進めている。今後、免疫不全動物におけるCIMP陽性腎がん細胞株移植モデル等を用いて前臨床研究を進める予定である。

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、手術検体から余剰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・タンパク質発現等に比し、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胞巣型腎臓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。本研究により我々の開発したCIMP診断基準が予後診断法として有用であることを示し得たので、病院における臨床検査としての実用化研究を、本研究期間終了後も継続して推進したい。

さらに、多層的オミックス解析の結果を総合すると、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た。

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、といった個別化医療のスキームが考えられる。今後、前臨床研究をさらに進め、CIMP 診断をコンパニオン診断とし、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、医師主導治験等の提唱につなげたい。

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行い、病院における臨床検査としての実用化を目指している。CIMP 診断は、CIMP 陽性腎細胞がん症例における標的治療のコンパニオン診断となる可能性があり、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, Takahashi Y, Miyata S, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T and Kanai Y. Epigenetic clustering of lung adenocarcinomas based on DNA methylation profiles in adjacent lung tissue: its correlation with smoking history and chronic obstructive pulmonary disease. **Int J Cancer**, in press.
2. Kanai Y and Arai E. Multilayer-omics analyses of human cancers: exploration of biomarkers and drug targets based on the activities of the International Human Epigenome Consortium. **Front Genet**, 5: 24, 2014.
3. 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.

本研究費に密接に関係するもの

1. Arai E, Sakamoto H, Ichikawa H, Totsuka H, Chiku S, Gotoh M, Mori T, Nakatani T, Ohnami S, Nakagawa T, Fujimoto H, Wang L, Aburatani H, Yoshida T and Kanai Y. Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome. **Int J Cancer**, online.
2. 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.

3. Nishikawa G, Sekine S, Ogawa R, Matsubara A, Mori T, Taniguchi H, Kushima R, Hiraoka N, Tsuta K, Tsuda H and Kanai Y. Frequent GNAS mutations in low-grade appendiceal mucinous neoplasms. **Br J Cancer**, 108: 951-958, 2013.
4. Chihara Y, Kanai Y, Fujimoto H, Sugano K, Kawashima K, Liang G, Jones PA, Fujimoto K, Kuniyasu H and Hirao Y. Diagnostic markers of urothelial cancer based on DNA methylation analysis. **BMC Cancer**, 13: 275, 2013.
5. Matsubara A, Sekine S, Yoshida M, Yoshida A, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H and Kanai Y. Prevalence of MED12 mutations in uterine and extrauterine smooth muscle tumors. **Histopathology**, 62: 657-661, 2013.
6. Matsubara A, Sekine S, Kushima R, Ogawa R, Taniguchi H, Tsuda H and Kanai Y. Frequent GNAS and KRAS mutations in pyloric gland adenoma of the stomach and duodenum. **J Pathol**, 229: 579-587, 2013.
7. Yamazaki H, Mori T, Yazawa M, Maeshima A, Matsumoto F, Yoshimoto S, Ota Y, Kaneko A, Tsuda H and Kanai Y. Stem cell self-renewal factors, Bmi1 and HMGA2 expressed in head and neck squamous cell carcinoma: Clues to the tumor characteristics for diagnosis. **Lab Invest**, 93: 1331-1338, 2013.
8. Nakagawa T, Hara T, Kawahara T, Ogata Y, Nakanishi H, Komiyama M, Arai E, Kanai Y and Fujimoto H. Prognostic risk stratification of patients with urothelial carcinoma of the bladder with recurrence after radical cystectomy. **J Urol**, 189: 1275-1281, 2013.
9. Hara T, Nakanishi H, Nakagawa T, Komiyama M, Kawahara T, Manabe T, Miyake M, Arai E, Kanai Y and Fujimoto H. Ability of preoperative 3.0-Tesla magnetic resonance imaging to predict the absence of side-specific extracapsular extension of prostate cancer. **Int J Urol**, 20: 993-999, 2013.
10. Oguro S, Shimada K, Ino Y, Esaki M, Nara S, Kishi Y, Kosuge T, Kanai Y and Hiraoka N. Pancreatic intraglandular metastasis predicts poorer outcome in postoperative patients with pancreatic ductal carcinoma. **Am J Surg Pathol**, 37: 1030-1038, 2013.
11. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Oguro S, Shimada K, Kosuge T, Zavada J, Kanai Y and Hiraoka N. Arginase II expressed in cancer-associated

fibroblasts indicates tissue hypoxia and predicts poor outcome in patients with pancreatic cancer. **PLoS One**, 8: e55146, 2013.

12. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y and Hiraoka N. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. **Br J Cancer**, 108: 914-923, 2013.

2. 学会発表

1. Kanai Y. Epigenome profiling during multistage human carcinogenesis and activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). 2013 Illumina Scientific Summit, Phuket, April 2013. (invited)
2. 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/ β -catenin pathway as a key player in the development of renal cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2013, Washington, DC, April, 2013.
3. 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. AACR Annual Meeting 2013, Washington, DC, April, 2013.
4. Arai E, Miura F, Yamashita S, Shibata T, Ito T, Suzuki Y, Tian Y, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T and Kanai Y. Epigenome mapping in purified human hepatocytes. Annual Meeting and Science Days IHEC 2013, Berlin, November, 2013.
5. Yamanoi K, Arai E, Takahashi Y, Miyata S, Kushima R, Katai H, Sakamoto M and Kanai Y. Epigenetic clustering of gastric carcinoma based on DNA methylation profiles at the precancerous stage: its correlation with tumor aggressiveness and patient outcome. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. Maihama, December, 2013.
6. 新井恵吏, 坂本裕美, 尾野雅哉, 高橋順子, 宮田彩香, 藤元博行, 後藤政広, 山田哲司, 吉田輝彦, 金井弥栄. 腎細胞がんの多層的オミックス解析. Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma.

第7回日本エピジェネティクス研究会年会, 2013年5月.

7. 田迎, 新井恵吏, 後藤政広, 藤元博行, 金井弥栄. CpG アイランドメチル化形質陽性腎細胞がんの DNA メチル化診断法の開発. Epigenetic diagnosis of CpG island methylator phenotype renal cell carcinomas. 第7回日本エピジェネティクス研究会年会, 2013年5月.
8. 金井弥栄. がんにおけるエピゲノム変化の解明と病態診断への応用. シンポジウム7「エピゲノムが拓く新たな人体病理学」第102回日本病理学会総会, 2013年6月 (招待講演).
9. 新井恵吏, 坂本裕美, 尾野雅哉, 高橋順子, 宮田彩香, 藤元博行, 澁谷亜矢子, 後藤政広, 山田哲司, 吉田輝彦, 金井弥栄. 腎細胞がんの多層的オミックス解析. 第102回日本病理学会総会, 2013年6月.
10. 金井弥栄. 国際ヒトエピゲノムコンソーシアムの取り組み. Activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). モーニングレクチャー5, 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月 (招待講演).
11. 新井恵吏, 坂本裕美, 尾野雅哉, 高橋順子, 宮田彩香, 藤元博行, 澁谷亜矢子, 後藤政広, 山田哲司, 吉田輝彦, 金井弥栄. CpG アイランドメチル化形質腎細胞がんの多層的オミックス解析. Integrated Multilayer-Omics Analysis in CpG Island Methylator Phenotype-positive Renal Cell Carcinomas. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月.
12. 田迎, 新井恵吏, 後藤政広, 藤元博行, 金井弥栄. CpG アイランドメチル化形質マーカー遺伝子の DNA メチル化レベルを指標とする腎細胞がんの予後診断法の開発. Epigenetic prognostication of renal cell carcinoma patients using CpG island methylator phenotype marker genes. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

分担研究報告書

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

研究分担者 鈴木 拓 札幌医科大学分子生物学講座 教授

研究要旨

本研究ではゲノムワイドなメチル化解析を行い、がんにおける DNA メチル化の役割を明らかにすることを目的とする。本年度は大腸がんおよび前がん病変におけるゲノム・エピゲノム解析を行い、メチル化異常が前がん病変で発生すること、コピー数異常はその後のがん化の過程で獲得されることを明らかにした。大腸がん臨床例のメチル化異常およびコピー数異常に基づくクラスタリング結果が、臨床病期と良く相関することから、予後予測システムに応用しうる可能性が示された。また大腸がんにおいてシグナル脂質変換酵素遺伝子 DGKG のメチル化を同定した。DGKG メチル化は大腸腺腫および大腸がんに高頻度であり、その発現回復は大腸がん細胞の増殖、遊走、浸潤を抑制したことから、新規大腸がん抑制遺伝子候補と考えられた。

A．研究目的

本研究では、DNA メチル化の網羅的解析により発がんに関与する新規遺伝子を同定し、がん化における役割を明らかにすることを目的とする。H24 年度までの研究で、大腸がんエピゲノム解析、microRNA（以下 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・肝がん・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。本年度はエピゲノム解析データを基に、がん診断マーカーとなりうる遺伝子メチル化の同定を行った。また同定した遺伝子の機能解析および診療への応用可能性を検討した。

B．研究方法

網羅的 DNA メチル化解析を Methylated CpG island amplification microarray (MCAM) 法によって行った。ゲノムコピー数異常をアレイ CGH 法によって解析した。各遺伝子の DNA メチル化は bisulfite sequencing および bisulfite pyrosequencing により検討した。遺伝子および noncoding RNA 発現を real-time RT-PCR 法により解析した。ヒストン修飾は、クロマチン免疫沈降 (ChIP) した産物をシーケンス (ChIP-seq) することで解析した。遺伝子機能をコロニー形成アッセイ、マトリゲル浸潤アッセイにより解析した。

（倫理面への配慮）

平成 17 年厚生労働省告示第 255 号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、倫理面に充分配慮して研究を進める。手術材料の残余の組織などの研究利用につき、患者に説明し文書で同意を得、連結可能匿名

化して解析を行い、患者のプライバシーを遵守し、札幌医科大学の倫理委員会の承認を得て使用した。

C．研究結果

(1) 大腸発がん過程におけるゲノム・エピゲノム異常獲得の解析

一般にメチル化異常は発がん過程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。大腸前がん病変からがんに至るまでのゲノム・エピゲノム異常を明らかにするため、大腸腺腫、粘膜内がん、大腸がん組織を対象に解析を行った。その結果、多くのメチル化は腺腫の段階で発生し、CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) も腺腫においてしばしば認められた。一方、増幅・欠失などのコピー数異常は腺腫ではほとんど認められず、粘膜内がん以降に獲得されることが示された。また、大腸がんを CIMP とコピー数異常によってクラスタリング解析した結果、臨床ステージ分類および転移との相関が認められた。このことからメチル化異常とコピー数異常とを組み合わせることが、大腸がんの臨床予後予測に有用であることが示唆された。

(2) 大腸がんの網羅的 DNA メチル化解析と新規がん関連遺伝子メチル化の同定

大腸がん細胞においてエピジェネティックに不活化し、かつ臨床例においても高頻度にメチル化する遺伝子を同定するため、エピゲノムの統合解析を行った。大腸がん細胞 HCT116 において脱メチル化処理によって発現回復する遺伝子を cDNA アレイおよびヒストン修飾 (H3K4me3) データから割り出し、腺管分離法で分離した大腸がん臨床例の DNA メチル化を

MCAM 法で解析した。それらを統合した結果、大腸がんにおいてメチル化する遺伝子 219 個を同定した。Gene Ontology 解析からそれらの遺伝子は発生、分化に強く関連することがわかった。その中で我々は、シグナル脂質変換酵素遺伝子 DGKG に着目した。DGKG は PKC を介した細胞シグナルや、RAC を介した細胞運動能への関与が知られている。DGKG は大腸腺腫および大腸がんの 50 ~ 60%においてメチル化していた。また DGKG 発現により大腸がん細胞の増殖、遊走、浸潤の抑制効果が認められた。これらの結果から、DGKG が新規のがん抑制遺伝子であること、そして DGKG 遺伝子メチル化が大腸がんマーカーとして有用である可能性が示された。

(3) 大腸がんメチル化形質と相関する遺伝子異常の同定

がんにおける DNA メチル化異常の原因はいまだ不明な点が多い。大腸がんにおけるメチル化異常に関与する分子メカニズムを解明するため、CIMP 陽性大腸がんと CIMP 陰性大腸がんを対象に全エクソシーケンシング解析を行った。その結果、CIMP 陽性の大腸癌において高頻度に、クロマチン再構成因子である CHD7 および CHD8 の遺伝子変異を見いだした。またバイオインフォマティクス解析の結果、正常ヒト幹細胞において CHD7 の標的となる遺伝子は、大腸がんにおいてメチル化する傾向が示されたことから、これらの遺伝子変異が異常メチル化の成立に関わっている可能性が示された。

D . 考察

エピゲノム解析を通して、がんにおいてメチル化異常を来す遺伝子を複数同定した。大腸がんおよび前がん病変のゲノム・エピゲノム解析を行った結果、メチル化異常は前がん病変から発生していること、ゲノムコピー数異常は前がん病変からがん細胞への過程において獲得されることを明らかにした。メチル化異常とコピー数異常を組み合わせることで、がんの転移や予後を予測しうる可能性が示された。

DGKG 遺伝子メチル化は、大腸腺腫および大腸がんにおいて高頻度にメチル化しており、大腸がんの早期診断マーカー候補と考えられる。また DGK ファミリー蛋白はシグナル脂質変換酵素であり、セカンドメッセンジャーとして多様な生理的シグナル伝達に関わっているとされる。DGKG のがん細胞における役割はいまだ不明な点が多いが、DGKG の腫瘍抑制メカニズムをさらに明らかにすることで、新たな治療標的の同定につながることを期待される。

がんのメチル化異常発生メカニズムはいまだ不明であるが、我々は CIMP 陽性大腸がんにおいてクロマチン再構成因子をコードする CHD7 および CHD8 の変異を同定した。DNA メチル化異常への直接の関与は不明であるが、幹細胞における CHD7 標的とがん細胞に

おけるメチル化遺伝子がオーバーラップする点は興味深く、今後さらに検討が必要と考えられた。

E . 結論

大腸がんにおけるエピゲノム解析を行い、新規診断マーカー候補となる遺伝子メチル化を複数同定した。DGKG 遺伝子は新規大腸がん関連遺伝子であり、そのメチル化は診断マーカーとして有用性が示された。DGKG の関与するシグナル経路が、新たながん治療標的となりうる可能性が示唆された。また、大腸がんメチル化異常と相関する可能性のある遺伝子変異を同定した。

F . 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

1. Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Noshio K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, Suzuki H and Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. **J Gastroenterol**, online.
2. 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.
3. 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.
4. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E and Kai M. Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. **Front Genet**, 4: 258, 2013.

本研究費に密接に関係するもの

1. Tahara T, Yamamoto E, Madireddi P, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano HO, Sugai T, Kondo Y, Toyota M, Issa JP and Estécio MR. Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators. **Gastroenterology**, 146: 530-538, 2014.
2. Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano HO, Sugai T, An B, Shureiqi I, Toyota M, Kondo Y, Estécio MR

and Issa JP. Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. **Cancer Res**, 74: 1311-1318, 2014.

3. Noshio K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, Naito T, Sukawa Y, Mikami M, Sumioka W, Yamamoto E, Kurokawa S, Adachi Y, Takahashi H, Okuda H, Kusumi T, Hosokawa M, Fujita M, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Suzuki H, Yamamoto H and Shinomura Y. Association of MicroRNA-31 with BRAF mutation, Colorectal-Cancer Survival and Serrated pathway. **Carcinogenesis**, 35: 776-783, 2014.
4. Honda S, Okada T, Miyagi H, Minato M, Suzuki H and Taketomi A. Spontaneous rupture of an advanced pancreatoblastoma: aberrant RASSF1A methylation and CTNNB1 mutation as molecular genetic markers. **J Pediatr Surg**, 48: e29-32, 2013.
5. Morita R, Hirohashi Y, Suzuki H, Takahashi A, Tamura Y, Kanaseki T, Asanuma H, Inoda S, Kondo T, Hashino S, Hasegawa T, Tokino T, Toyota M, Asaka M, Torigoe T and Sato N. DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers. **Exp Mol Pathol**, 94: 322-329, 2013.
6. Ohashi T, Idogawa M, Sasaki Y, Suzuki H and Tokino T. AKR1B10, a transcriptional target of p53, is Downregulated in Colorectal Cancers Associated with Poor Prognosis. **Mol Cancer Res**, 11: 1554-1163, 2013.

2. 学会発表

1. 鈴木 拓. がんエピゲノム解析による病態解明と診断応用. 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月.
2. 鈴木 拓, 山本英一郎, 丸山玲緒, 鈴木 亮, 清水 崇, 原田 拓, 山野泰穂, 野島正寛, 高塚伸太郎, 新沼 猛, 甲斐正広, 篠村恭久, 今井浩三. マイ

クロ RNA 遺伝子のエピジェネティクス異常と臨床応用. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月.

3. 丸山玲緒, 山本英一郎, 桑川昂平, 津矢田明泰, 鈴木 亮, 芦田仁己, 佐藤亜紀子, 甲斐正広, 山野泰穂, 菅井 有, 篠村恭久, 時野隆至, 鈴木 拓. 消化器癌において重要な役割を果たす長鎖 ncRNA の網羅的同定の試み. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月.
4. 原田 拓, 山本英一郎, 野島正寛, 丸山玲緒, 佐藤亜紀子, 甲斐正広, 山野泰穂, 鈴木 拓. 腸管洗浄液のメチル化検出による大腸癌診断法の開発. 第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2013 年 10 月.
5. 丸山玲緒, 山本英一郎, 桑川昂平, 津矢田明泰, 鈴木 亮, 芦田仁己, 甲斐正広, 佐藤亜紀子, 新沼 猛, 山野泰穂, 菅井 有, 篠村恭久, 時野隆至, 鈴木 拓. 消化器癌の発生や進展に関する長鎖 ncRNA の量的・質的異常の探索と臨床応用への試み. 第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2013 年 10 月.
6. 鈴木 拓. microRNA 遺伝子のエピジェネティクス異常によるがん診断. 日本がん分子標的治療学会第 9 回トランスレーショナルワークショップ, 2014 年 1 月.
7. 鈴木 拓. 消化器癌のマイクロ RNA 異常とその臨床応用. エピジェネティック療法研究会第 6 回講演会, 2014 年 2 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

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

研究分担者 伊東文生 聖マリアンナ医科大学消化器・肝臓内科 教授

研究要旨

早期胃癌は内視鏡による低侵襲な治療が広く行われてきているが、内視鏡治療後の遺残や再発を発見するための定量的な診断ツールは存在しない。我々は異常 DNA メチル化が胃発癌の過程において早期に高頻度に存在することを報告し、胃洗浄廃液を用いた DNA メチル化解析が胃癌発見において有用であることを報告した（欧州特許成立）。今回、Methylated CpG island amplification Microarray (MCAM) 解析にて選出した BARHL2 遺伝子が早期胃癌の内視鏡治療マーカーとして有用であるかに関して、機能解析とともに検討した。BARHL2 遺伝子 DNA メチル化は、胃発癌早期において重要であることが示唆された。我々のストラテジーでは、このように同定された遺伝子は、直ちに有望なバイオマーカー候補となりうる。胃洗浄液を用いたエピジェネティック解析は、今までにない視点からの診断法であるだけでなく、胃癌の分子病態解明にも有用である。進行中の前向き多施設共同試験「内視鏡胃洗浄廃液を用いた胃癌内視鏡治療後異時再発の予測診断への応用」における DNA メチル化解析により、治療直後にそのメチル化レベルが有意な低下を示した遺伝子に関して、1年後のメチル化が上昇している症例が存在したことは興味深い。今後、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。

A．研究目的

早期胃癌内視鏡治療前後 6 症例 12 検体の胃洗浄廃液から抽出した DNA の網羅的メチル化解析にて有意に治療前後で差を認めた 18 の候補アレイプローブ（11 遺伝子）のうち HOX ドメインを有する転写因子である BARHL2 遺伝子の機能解析および分子マーカーとしての有用性を明らかにする。併せて、前向き多施設共同試験における DNA メチル化解析を継続する。

B．研究方法

1．胃癌細胞株を対象に、バイサルファイトパイロシーケンス法にて BARHL2 遺伝子の DNA メチル化レベルを解析した。リアルタイム PCR で BARHL2 発現を解析した。脱メチル化剤処理による再発現実験を行った。遺伝子導入を行い、コロニーフォーメーションアッセイを行った。

2．胃癌組織の tissue microarray および胃腺腫組織を対象に抗 BARHL2 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。早期胃癌内視鏡治療前後の 64 症例 128 検体の胃洗浄廃液 DNA を対象に、バイサルファイトパイロシーケンス法にて BARHL2 遺伝子の DNA メチル化レベルを検討した。

3．平成 23 年 4 月より聖マリアンナ医科大学、北

海道大学をはじめとする 10 施設により、前向き多施設共同試験「内視鏡胃洗浄廃液を用いた胃癌内視鏡治療後異時再発の予測診断への応用」が進行している。本試験における検体から DNA を抽出しパイロシーケンスで DNA メチル化を解析した。

（倫理面への配慮）

研究に必要な検体は通常破棄される胃洗浄廃液であり、大学施設生命倫理委員会への承諾を行った後、患者様への十分なインフォームドコンセントのもと同意を得た症例にのみ実施されるものである。また、試料については、連結可能匿名化を行い、医療情報管理を厳重に行うこととする。

C．研究結果

1．BARHL2 遺伝子に関し、バイサルファイトパイロシーケンス法のプライマーを設計し、解析した。BARHL2 メチル化レベルは、MKN1 (56%)、MKN7 (75%)、MKN45 (96%)、MKN74 (34%)、NUGC3 (13%)、KatoIII (16%)、AZ521 (92%) であった。メチル化レベルの高い MKN7、MKN45 で BARHL2 発現低下を認め、DNA メチル化レベルと発現レベルの逆相関を認めた。MKN7、MKN45 の脱メチル化剤処理により BARHL2 の再発現を認めた。さらに、MKN45 に対する BARHL2 の遺伝子導入により、コロニーフォーメーション能の抑制を認

めた。

2. 胃癌組織における BARHL2 発現を免疫蛍光染色により解析した。胃炎および腺腫組織においては、核に発現を認めた。一方、胃癌組織では、高頻度で、発現低下、消失を認めた。検出セット(64 症例、128 検体)における BARHL1 メチル化解析で、症例の約 8 割が治療前において、BARHL2 遺伝子高メチル化を示し、治療後にそのメチル化レベルが有意な低下を示した ($p < 0.0001$)。

3. 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ている。DNA メチル化解析を継続した。興味深いことに、治療直後にそのメチル化レベルが有意な低下を示した遺伝子に関して、1 年後の解析において、メチル化が上昇している症例が存在した。

D. 考察

MCAM 法を用いて、早期胃癌内視鏡治療前後 6 症例 12 検体の胃洗浄廃液から抽出した DNA のメチル化解析にて有意に治療前後で差を認めた 18 の候補アレイプローブ(11 遺伝子)のうち BARHL2 の解析を行った。

BARHL2 遺伝子 DNA メチル化は、胃発癌早期において重要であることが示唆された。我々の戦略では、このように同定された遺伝子は、直ちに有望なバイオマーカー候補となりうる。

次世代シーケンスや各種オミクス解析法が著しく進歩しても、解析対象となる検体の選択が重要である。早期胃癌内視鏡治療前後の胃洗浄廃液サンプルを比較解析することは、背景粘膜等様々な要因によるバイアスを受けない極めて有用な方法であることが示唆された。

進行中の前向き多施設共同試験における DNA メチル化解析(MINT25、SOX17、miR34b/c)により、治療直後にそのメチル化レベルが有意な低下を示した遺伝子に関して、1 年後のメチル化が上昇している症例が存在したことは興味深い。今後の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。

E. 結論

胃洗浄液を用いたエピジェネティック解析は、今までにない視点からの診断法であるだけでなく、胃癌の分子病態解明にも有用である。通常廃棄される

廃液を利用する侵襲度の非常に低い新たな検査法として非常に有望であり、前向き多施設臨床試験(3 年目)において有望な成果が得られつつある。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞はないが強く関連がある論文

1. Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, Itoh F, Tsugawa K and Ohta T. Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. **Genes Cells**, 18: 1120-1130, 2013.

2. 学会発表

1. 大石嘉恭, 渡邊嘉行, 平石哲也, 前畑忠輝, 伊東文生. 早期胃癌分子診断応用における Sox17 遺伝子高メチル化の有用性. 第 50 回日本臨床分子医学会学術集会, 2013 年 4 月.

2. 細谷浩介, 渡邊嘉行, 及川律子, 森田 亮, 吉田良仁, 前畑忠輝, 松本伸行, 山本博幸, 伊東文生. 早期胃癌の分子診断応用における BARHL2 遺伝子高メチル化の有用性. 第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2013 年 10 月

3. 前畑忠輝, 渡邊嘉行, 及川律子, 吉田良仁, 森田亮, 細谷浩介, 松本伸行, 山本博幸, 伊東文生. 早期胃癌の分子診断応用における BARHL2 遺伝子高メチル化の有用性. 第 64 回日本電気泳動学会総会, 2013 年 11 月

G. 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

がん細胞における DNA メチル化異常の起源解明

研究分担者 山田泰広 京都大学 iPS 細胞研究所 教授

研究要旨

本研究では iPS 細胞作製技術を応用することで、がん細胞の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いる。昨年度までの研究において、ドキシサイクリン投与により山中 4 因子が誘導可能である「初期化可能マウス」を作製し、*Apc*^{Min} マウス大腸腫瘍細胞由来の初期化細胞を得た(reprogrammed tumor cells; RT 細胞)。本年度は¹ 初期化可能マウスの解析を行うとともに、² 大腸腫瘍由来 RT 細胞を用いた解析を行った。

¹ 初期化可能マウスに不完全な細胞初期化を誘導すると小児がん類似腫瘍が形成されることを示した。小児がん類似腫瘍細胞は、完全初期化により非腫瘍性細胞へと分化させることが可能であった。遺伝子変異に依存しないエピゲノム異常による発がん経路が存在することが明らかとなった。

² 大腸腫瘍由来 RT 細胞を、様々な細胞へと分化を誘導した。RT 細胞を大腸上皮に分化させると、再度腫瘍性増殖能を獲得することが分かった。しかし、胎盤や肝臓など別の細胞種に分化させると腫瘍性増殖能を失うことを示した。¹ ² の結果は、発がんおよびがん細胞の維持における細胞分化状態、およびエピゲノム状態の重要性を示す結果であると考えられる。

A . 研究目的

DNA メチル化異常に代表されるエピゲノム異常は多くのがんを観察され、発がんに促進的な役割を果たしていることが示唆されている。しかし、がん細胞におけるエピゲノム異常の原因や発がんにおける意義については、未だ不明な点が多く、より効果的な治療方法の開発には、がん細胞におけるエピゲノム異常の起源、役割を解明する必要がある。

iPS 細胞 (iPSC) 作製に必要な初期化因子の発現は、遺伝子配列情報に変化を及ぼさないもののエピゲノム状態の改変を誘導し、多能性幹細胞樹立に至る。本研究では iPSC 作製技術をエピゲノム変化を積極的に誘導するツールとして捉え、腫瘍細胞のゲノム異常をそのままに、エピジェネティック修飾状態に強制的な変化を誘導することで、がん細胞の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た。

昨年度までの研究により、ドキシサイクリン投与により細胞初期化 4 因子が誘導可能である「初期化可能マウス」を作製した。初期化可能マウスを家族性大腸腺腫症のモデルマウスである *Apc*^{Min/+} (*Apc* Min) マウスと交配することで、大腸腫瘍細胞から *Nanog* 遺伝子を発現する初期化細胞を得ることが出来た(reprogrammed tumor cells; RT 細胞)。

本年度は、¹ 初期化可能マウスの解析を行うとともに、² 大腸腫瘍由来 RT 細胞を用いた解析を行うこ

とで、がん細胞におけるエピゲノム異常の起源、役割を検討した。

B . 研究方法

¹ 初期化可能マウスを用いたがんエピゲノム研究

ドキシサイクリンによる遺伝子発現系を利用して細胞初期化因子を発現コントロールできる初期化可能マウスを用いた。ドキシサイクリン投与調節により生体内での細胞初期化を途中で停止させ、初期化失敗細胞の病理組織学的解析および分子生物学的解析を行った。不完全な初期化により生じたがん細胞は、再度、細胞初期化因子を再発現させることで、完全初期化を試みた。樹立されたがん細胞由来 iPS 細胞を用いて、胚盤胞へのマイクロインジェクションを行い、偽妊娠マウス子宮に移植することでキメラマウス作製を試みた。

² 大腸腫瘍由来 RT 細胞を用いたがんエピゲノム研究

大腸腫瘍由来 *Nanog* 発現 RT 細胞を分化誘導に用いた。大腸腫瘍由来 RT 細胞を用いて、試験管内および生体内での分化誘導を試みた。*Apc* 遺伝子の欠損が細胞分化能に影響を与えることを考慮し、野生型 *Apc* 遺伝子を用いて欠損した *Apc* 機能をレスキューし、分化を誘導した。分化誘導後にレスキューした *Apc* 遺伝子を再破壊して、大腸腫瘍細胞と同じ遺伝子異常を持つ様々な分化細胞を作出した。異なる種類の

分化細胞における大腸腫瘍細胞遺伝子異常の振る舞いを分子病理学的に検討した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、動物実験実施機関(京都大学iPS細胞研究所)の動物実験委員会の承認を得た。動物愛護の精神に配慮し、3Rに努めて実験を施行した。

C. 研究結果

1 初期化可能マウスを用いたがんエピゲノム研究

初期化可能マウスにドキシサイクリンを約4週間投与すると、様々な臓器に腫瘍形成が認められた。それらは多能性幹細胞を含む奇形腫であり、生体マウス内でiPS細胞を作製することに成功した。次に生体内初期化を途中で中止したところ、奇形腫とは異なる腫瘍の形成を引き起こすことが分かった。不完全な細胞初期化における腫瘍は、小児がんに類似することが分かった。DNAメチル化状態を検討すると、それらの腫瘍細胞では多能性幹細胞と部分的に類似したDNAメチル化パターンを示すことが明らかとなった。一方で、腫瘍細胞では、多能性幹細胞におけるポリコーン標的遺伝子が抑制されていなかった。多能性獲得に向かう不完全なエピゲノムの改変が小児がん類似病変の形成、維持に関与していることが示唆された。同時に細胞脱分化がDNAメチル化異常の原因となりうることが示唆された。興味深いことに、不完全な初期化によるがん細胞は、完全初期化により、iPS細胞へと変化し、非腫瘍性の細胞へと分化可能であることが確認された。

2 大腸腫瘍由来RT細胞を用いたがんエピゲノム研究

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、組織学的に周囲の胎盤組織と区別不可能であり、細胞増殖能を評価する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一切寄与しないことが分かった。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。大腸腫瘍細胞における*Apc*遺伝子の欠損が分化異常の原因となっている可能性を考慮し、*Apc*遺伝子機能をレスキューすることでキメラマウスの作製に成功した。キメラマウスにおいてレスキューした*Apc*遺伝子を再破壊した結果、腸管上皮においては速やかに腫瘍が発生することを確認した。しかしながら、肝臓など他の種類の細胞種では、*Apc*遺伝子の再破壊後も明らかな腫瘍性変化は確認できなかった。

D. 考察

初期化可能マウスを用いて不完全な細胞初期化が小児がんに類似した発がんを引き起こすことを明らかにした。さらにこのマウスに発生したがん細胞を完全初期化することでiPS細胞が樹立可能であり、がん細胞由来iPS細胞が非腫瘍性の細胞に分化することを示した。これら一連のプロセスには遺伝子配列の変化は起こらないことを考えると、不完全な初期化による発がん過程は遺伝子変異により引き起こされるのではなく、エピジェネティクス修飾状態の変化による発がんであることが示唆された。小児がんなど一部のがんでは同様の発がんメカニズムが働いている可能性が考えられた。同時にそのようながんでは、エピゲノム制御への介入が有効な治療法となりうることを示唆された。

大腸腫瘍細胞から樹立されたRT細胞は、大腸上皮以外に分化転換させると、その腫瘍性増殖能を失うことが明らかとなった。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を失うことが示された。分化状態はエピジェネティクス修飾状態の変化により制御されていることから、この結果は、エピゲノム制御が、遺伝子に傷を持ったがん細胞においても、その性質決定に重要な役割を果たしていることを示すものと考えられる。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。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。

E. 結論

我々の細胞初期化技術を用いた研究結果により、発がん過程やがん細胞の維持においてエピゲノム制御機構が重要な役割を果たすことが明らかとなった。エピジェネティック修飾状態を標的としたがん治療の重要性が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

- Ohnishi K†, Semi K†, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K and Yamada Y. □ Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. □ † These authors are equally contributed to this work. *Cell*, 156: 663-677, 2014.
- 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.

3. 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.

2.学会発表

1. Yamada Y. Dissecting cancer biology by studying induced pluripotency. Gordon Research Conference. Galveston, TX, March, 2014.

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌（本研究費に謝辞のあるもの）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoda Y, <u>Ushijima T</u> , et al.	Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer.	Gastric Cancer			online
Okochi-Takada E, <u>Ushijima T</u> , et al.	ANGPTL4 is a secreted tumor-suppressor that inhibits angiogenesis.	Oncogene			online
Takahashi T, <u>Ushijima T</u> , et al.	Estimation of the fraction of cancer cells in a tumor DNA sample using DNA methylation.	PLoS One	8	e82302	2013
Shigematsu Y, <u>Ushijima T</u> , et al.	Interleukin-1b induced by <i>Helicobacter pylori</i> infection enhances mouse gastric carcinogenesis.	Cancer Lett	340	141-147	2013
Zhu Y, <u>Ushijima T</u> , et al.	Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression.	J Clin Invest	123	2935-2947	2013
Asada K, <u>Ushijima T</u> , et al.	Clinical application of the CpG island methylator phenotype to prognostic diagnosis in neuroblastomas.	J Hum Genet	58	428-433	2013
Hattori N, <u>Ushijima T</u> , et al.	Visualization of multivalent histone modification in a single cell reveals highly concerted epigenetic changes on differentiation of embryonic stem cells.	Nucleic Acids Res	41	7231-7239	2013
Asada K, <u>Ushijima T</u> , et al.	Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas.	Jpn J Clin Oncol	43	641-645	2013
Asada K, <u>Ushijima T</u> , et al.	<i>FHL1</i> 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
Kim JG, <u>Ushijima T</u> , et al.	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
Niwa T, <u>Ushijima T</u> , et al.	Prevention of <i>Helicobacter pylori</i> -induced gastric cancers in gerbils by a DNA demethylating agent.	Cancer Prev Res	6	263-270	2013
Sato T, <u>Kanai Y</u> , et al.	Epigenetic clustering of lung adenocarcinomas based on DNA methylation profiles in adjacent lung tissue: its correlation with smoking history and chronic obstructive pulmonary disease.	Int J Cancer			in press

<u>Kanai Y</u> and Arai E.	Multilayer-omics analyses of human cancers: exploration of biomarkers and drug targets based on the activities of the International Human Epigenome Consortium.	Front Genet	5	24	2014
Sato T, <u>Kanai Y</u> , et al.	DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma.	PLoS One	8	e59444	2013
Suzuki R, <u>Suzuki H</u> , et al.	Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk.	J Gastroenterol			online
Sawada T, <u>Suzuki H</u> , et al.	Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization.	Genes Chromosomes Cancer	52	140-149	2013
Shimizu T, <u>Suzuki H</u> , et al.	Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer.	Eur Urol	63	1091-1100	2013
<u>Suzuki H</u> , et al.	Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer.	Front Genet	4	258	2013
Ohnishi K, Semi K, <u>Yamada Y</u> , et al.	□Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation.	Cell	156	663-677	2014
Hirata A, <u>Ushijima T</u> , <u>Yamada Y</u> , et al.	Dose-dependent roles for canonical Wnt signaling in <i>de novo</i> crypt formation and cell cycle properties of the colonic epithelium.	Development	140	66-75	2013
Yamada K, <u>Yamada Y</u> , et al.	<i>EWS/ATF1</i> expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice.	J Clin Invest	123	600-610	2013
Yamada M, <u>Ushijima T</u> , et al.	Hereditary diffuse gastric cancer in a Japanese family with a large deletion involving <i>CDH1</i> .	Gastric Cancer			online
Imaoka T, <u>Ushijima T</u> , et al.	Molecular characterization of cancer reveals interactions between ionizing radiation and chemicals on rat mammary carcinogenesis.	Int J Cancer	134	1529-1538	2014
Yoshida T, <u>Ushijima T</u> , et al.	Cancer development based on chronic active gastritis and resulting gastric atrophy as assessed by serum levels of pepsinogen and <i>Helicobacter pylori</i> antibody titer.	Int J Cancer	134	1445-1457	2014
Suzuki T, <u>Ushijima T</u> , et al.	Genome-wide analysis of DNA methylation changes induced by gestational arsenic exposure in liver tumors.	Cancer Sci	104	1575-1585	2013
Ito Y, <u>Ushijima T</u> , et al.	EGFR L2 domain mutation is not correlated with resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients.	J Cancer Res Clin Oncol	139	1391-1396	2013
Yoshida T, <u>Ushijima T</u> , et al.	Altered mucosal DNA methylation in parallel with highly active <i>Helicobacter pylori</i> -related gastritis.	Gastric Cancer	16	488-497	2013
Imai S, <u>Ushijima T</u> , et al.	Epigenetic transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 3 contributes to long-lasting neuropathic pain.	Brain	136	828-843	2013
Arai E, <u>Kanai Y</u> , et al.	Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome.	Int J Cancer			online

Saito Y, <u>Kanai Y</u> , et al.	The tumor suppressor microRNA-29c is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells.	Int J Cancer	132	1751-1760	2013
Nishikawa G, <u>Kanai Y</u> , et al.	Frequent GNAS mutations in low-grade appendiceal mucinous neoplasms.	Br J Cancer	108	951-958	2013
Chihara Y, <u>Kanai Y</u> , et al.	Diagnostic markers of urothelial cancer based on DNA methylation analysis.	BMC Cancer	13	275	2013
Matsubara A, <u>Kanai Y</u> , et al.	Prevalence of MED12 mutations in uterine and extrauterine smooth muscle tumors.	Histopathology	62	657-661	2013
Matsubara A, <u>Kanai Y</u> , et al.	Frequent GNAS and KRAS mutations in pyloric gland adenoma of the stomach and duodenum.	J Pathol	229	579-587	2013
Yamazaki H, <u>Kanai Y</u> , et al.	Stem cell self-renewal factors, Bmi1 and HMGA2 expressed in head and neck squamous cell carcinoma: Clues to the tumor characteristics for diagnosis.	Lab Invest	93	1331-1338	2013
Nakagawa T, <u>Kanai Y</u> , et al.	Prognostic risk stratification of patients with urothelial carcinoma of the bladder with recurrence after radical cystectomy.	J Urol	189	1275-1281	2013
Hara T, <u>Kanai Y</u> , et al.	Ability of preoperative 3.0-Tesla magnetic resonance imaging to predict the absence of side-specific extracapsular extension of prostate cancer.	Int J Urol	20	993-999	2013
Oguro S, <u>Kanai Y</u> , et al.	Pancreatic intraglandular metastasis predicts poorer outcome in postoperative patients with pancreatic ductal carcinoma.	Am J Surg Pathol	37	1030-1038	2013
Ino Y, <u>Kanai Y</u> , et al.	Arginase II expressed in cancer-associated fibroblasts indicates tissue hypoxia and predicts poor outcome in patients with pancreatic cancer.	PLoS One	8	e55146	2013
Ino Y, <u>Kanai Y</u> , et al.	Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer.	Br J Cancer	108	914-923	2013
Tahara T, <u>Suzuki H</u> , et al.	Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators.	Gastroenterology	146	530-538	2014
Tahara T, <u>Suzuki H</u> , et al.	Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma.	Cancer Res	74	1311-1318	2014
Nosho K, <u>Suzuki H</u> , et al.	Association of MicroRNA-31 with BRAF mutation, Colorectal-Cancer Survival and Serrated pathway.	Carcinogenesis	35	776-783	2014
Honda S, <u>Suzuki H</u> , et al.	Spontaneous rupture of an advanced pancreatoblastoma: aberrant RASSF1A methylation and CTNNB1 mutation as molecular genetic markers.	J Pediatr Surg	48	e29-32	2013
Morita R, <u>Suzuki H</u> , et al.	DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers.	Exp Mol Pathol	94	322-329	2013
Ohashi T, <u>Suzuki H</u> , et al.	AKR1B10, a transcriptional target of p53, is Downregulated in Colorectal Cancers Associated with Poor Prognosis.	Mol Cancer Res	11	1554-1163	2013
Watanabe Y, <u>Itoh F</u> , et al.	Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy.	Genes Cells	18	1120-1130	2013