

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22134002

研究課題名（和文）がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析と治療標的分子シーズの探索

研究課題名（英文）Integrative omics analysis to explore molecular targets and biomarkers for personalized medicine in cancer

研究代表者

稲澤 譲治（Inazawa, Johji）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：30193551

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 214,400,000円

研究成果の概要（和文）：がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析と治療標的分子シーズの探索を目的に、がん幹細胞、EMT制御異常、浸潤・転移などのin vitro/in vivo実験モデル系を確立した。バイオバンク事業を推進しバイオリソースを収集・整備した。これら基盤のもとで得られたマルチオミクス情報をもとに、がん悪性特性の分子機序を解明した。その結果、がん抑制性miRNAを含む治療標的や診断バイオマーカーの候補の複数を同定した。これらの成果は難治がん分子病態の理解やがん個別化医療への応用に期待できる。

研究成果の概要（英文）：Integrative omics analysis was performed to explore molecular targets and biomarkers for personalized medicine in cancer. Several experimental models in vitro/ in vivo were established to uncover malignant properties including epithelial-mesenchymal transition (EMT), and invasion and/or metastasis. Bioresource infrastructure was prepared, and human bioresources have been collected and preserved to facilitate multi-omics data analysis in cancer. Consequently, novel and promising targets and biomarkers including tumor suppressor microRNAs were identified, facilitating the understanding of molecular pathogenesis of intractable cancer.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：がん ゲノム エピゲノム システム生物学 分子標的治療 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

がん治療を困難にしている転移や術後再発、ならびにこれらの病態と密接に関連するがん幹細胞やEMT制御異常などのがん細胞に特有の性質(がんの悪性特性)は、がんの病態において時空間的に連続的であるにもかかわらず、従来、その生物学的な解析は独立した位相でとらえる傾向にあった。このため、これらの特性に共通あるいは特異的な分子機序に関する知見が未だ乏しく明確にはなっていない。このことから、がんの悪性特性の分子機構の理解とこれに基づく難治がん克服のための分子シーズの同定は喫緊の課題であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、がん幹細胞、EMT制御異常、がん転移の3つの重要な現象について、*in vitro/in vivo*実験モデル系を独自に確立し、がんのゲノム・エピゲノムハイスループット解析系や機能的スクリーニング系で得たオミクスデータをもとに、細胞分化、EMT、浸潤・転移の3次元に拡張させてがん細胞のシステム変化(ネットワーク)のプロファイリングを行い、がんの悪性特性の分子機構の理解とこれに基づく難治がん克服のための分子シーズの探索と同定を目的とした。このようながん細胞システムの理解は、細胞の自己再生・増殖、浸潤・転移、薬剤耐性・細胞休止(dormancy)、がん幹細胞性などの分子機構のシステムとしての理解につながるだけでなく、それらががん細胞システムの背後にあるがん細胞の脆弱性の理解に至り、結果、従来のアプローチでは不可能であった難治がん克服の新たな治療戦略情報を導き出すことができる。

## 3. 研究の方法

### (1) *in vitro/in vivo*スクリーニング・検証モデル系の確立

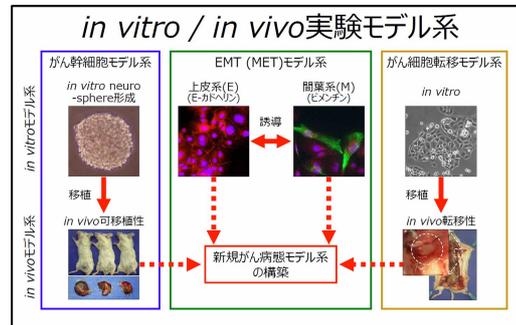
EMT 実験モデル: 口腔がん、食道がん、胃がん、大腸がん細胞株におけるE-カドヘリンとビメンチンの発現の可視化細胞株モデルを作成しEMT 可塑性検出細胞株モデルを構築した。

がん転移 実験モデル: 免疫不全マウスでの*in vivo* selectionにより複数のがん種で高転移性亜株を樹立し、親株/亜株間でオミクス解析を行った。これにより悪性特性関連遺伝子の同定を試みた。

がん幹細胞モデル: 外科摘出腫瘍よりsphere形成を指標にがん幹細胞特性保持の細胞を分離保存するとともに、各種がん細胞株でプラチナ製剤などの抗がん薬剤耐性株を樹立し、治療標的候補分子と耐性獲得の分子機構の解明に用いた。

### (2) 網羅的スクリーニング解析

各種*in vitro/in vivo*スクリーニングモデル系を対象として以下の研究項目を実施した。



ゲノム構造異常解析: アレイCGH解析を行い、詳細なゲノムコピー数解析を実施する。選出された候補がん遺伝子の〔コピー数/発現量〕の比較により候補がん関連遺伝子を抽出した。また抽出された候補遺伝子群については詳細な機能的解析を行い、臨床・病理学的因子との関連を解析した。

DNAメチル化異常解析: MeDIP法や次世代型シーケンサーを用いたChIPシーケンスなどによるプロモーター領域のメチル化異常の網羅的探索を実施して新規がん抑制遺伝子候補を探索した。

クロマチン構造異常解析:、がん部/非がん部においてChIPシーケンス等でゲノムワイドDNAメチル化解析を行った。

発現異常解析: 各種のがん細胞株、臨床検体を対象にDNAチップによる網羅的発現解析を行った。発現異常を認めるがん関連候補遺伝子群については機能を解析し、臨床・病理学的因子との関連を調べた。

### (3) miRNA機能的スクリーニング

各種のがん細胞株に対して、二本鎖合成RNA(dsRNA)ライブラリーを遺伝子導入し、がん関連候補遺伝子群の*in vitro*機能的スクリーニングを行った。

### (4) システム生物学的解析 (宮野悟博士と共同研究)

*in vitro/in vivo*実験モデル系の各種解析で得られた膨大なOmicデータを基に、ネットワーク解析を行った。

### (5) インターラクトーム解析 (石川俊平博士と共同研究)

免疫不全マウス皮下移植ヒトがん細胞株の原発/転移腫瘍/ホストマウス間での網羅的遺伝子発現データに基づくインターラクトーム解析を行った。

### (6) メタボローム解析 (曾我朋義博士と共同研究)

親株/高転移亜株間で*in vitro/in vivo*メタボローム解析を行った。

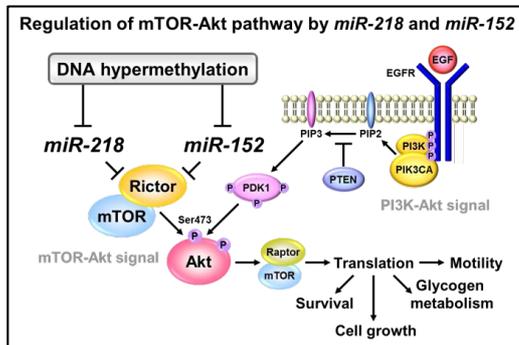
### (7) がん関連バイオリソースの収集

東京医科歯科大学疾患バイオリソース研究センターが設置され、同大・医学部附属病院、歯学部附属病院においてバイオバンク事業を開始してバイオリソースを収集した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規がん抑制遺伝子型 miRNA の同定

がん特異的 DNA メチル化異常によるがん抑制遺伝子型 miRNA のサイレンシングの重要性を世界に先駆けて報告した。miRNA ライブラリーを用いた機能的スクリーニングにより、新規がん抑制遺伝子型 miRNA (TS-miRNA) の miR-152 と miR-218 を同定した。さらに、これら miRNA が Rictor を共通の標的とし、これら miRNA が Rictor を抑制することで TOR-Akt シグナル経路が負に制御されることを明らかにした。(Tsuruta et al., *Can Res* 2011, Uesugi et al., *Can Res* 2011) また、口腔がんの TS-miRNA として miR-596 とその標的分子 LGALS3BP を同定し、miR-596 のがん治療の核酸医薬としての有用性を示した。(Endo, et al. *Carcinogenesis* 2013)



肝細胞がん(HCC)細胞株で miRNA の機能的スクリーニングと網羅的発現解析から、HCC のがん抑制遺伝子型 miR-497 を同定した。つづき、次世代シーケンサーを用いた Ago2 ChIP-seq を含む Omics データ解析から、miR-497 が細胞周期を正に制御する複数のがん遺伝子群を標的とすることを明らかにした。(Furuta, et al. *PLOS ONE* 2013)

##### (2) EMT 制御 miRNA の同定

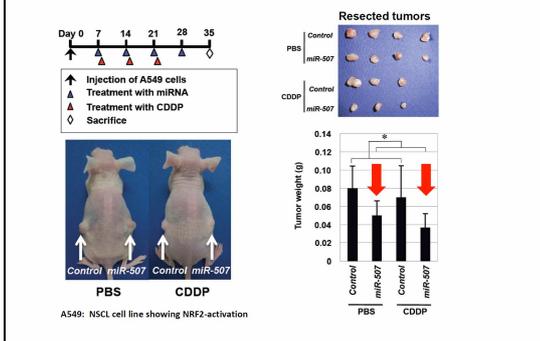
EMT/MET 可塑性を有する膀胱がん細胞株での E-カドヘリン・プロモーター活性を指標とした miRNA 機能的スクリーニングを行い、新規 EMT 抑制性 miRNA である miR-655 を同定し、その標的遺伝子が ZEB1、TGFB2 をあることを明らかにした。さらに、miR-655 発現が食道扁平上皮がんの予後予測マーカーとして有効であることを明らかにした。(Harazono, et al. *PLOS ONE* 2013)

##### (3) 抗酸化ストレス応答転写因子 NRF2 標的 miRNA の同定

抗酸化ストレス応答転写因子 NRF2 の恒常的活性化はがんの悪性化に寄与することが知られている。NRF2 転写活性を指標とした miRNA ライブラリースクリーニングにより、NRF2 の転写活性を直接的に負に制御する 4

種の miRNA (miR-507, -634, -450a, -129-5p) を同定した。さらに、マウス担がんモデルにおいて、miR-507 投与による抗腫瘍効果が認められ、miRNA のがん核酸治療薬としての概念実証(POC)が確認された。また、NRF2、KEAP1 の遺伝子変異の有無、および上記の miRNA の発現低下をスコア化して食道扁平上皮がんの予後予測のバイオマーカーとしての有用性を検討したところ、予後予測バイオマーカーとして利用できることが示された。(Yamamoto S et al., *Molec Cancer Res* 2014)

##### Tumor suppressive effect of miR-507 in vivo



##### (4) オートファジー・リソゾーム機能の変調と発がん

ユビキチンリガーゼ ITCH は甲状腺未分化がん遺伝子増幅により活性化されるがん遺伝子機能を明らかにしていたが、今回、リソゾーム関連遺伝子 LAPT5 が ITCH の基質となり、LAPT5 タンパク質量を負に制御することを同定した。また、神経芽腫細胞での ITCH 発現抑制は、LAPT5 陽性小胞の蓄積を介した細胞死誘導を促進した (Ishihara et al. *J Biol. Chem.* 2011)。

オートファジー関連遺伝子であるヒト LC3 遺伝子ファミリーにおいて、既知の LC3B 以外に LC3Av1 もまたオートファジー活性に関与することを明らかにした。さらに、LC3Av1 は様々ながん種由来細胞株および食道がん臨床検体において、DNA メチル化異常により、高頻度に不活性化していることを明らかにした (Bai et al. *Oncogene* 2012)

##### (4) がん関連バイオリソースの収集

バイオバンク事業は順調に推進され 2013 年 11 月～2015 年 3 月で、約 800 症例の臨床情報不随バイオリソースが収集された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 27 件)・全て査読有り

1. Iwadate R, Inoue J, Tsuda H, Takano H, Furuya K, Hirasawa A, Aoki D, Inazawa J: High expression of p62 protein is associated with poor prognosis and

- aggressive phenotypes in endometrial cancer. *Am J Pathol.* in press
2. Yamamoto S, Inoue J, Kawano T, Kozaki K, Omura K, Inazawa J: The impact of miRNA-based molecular diagnostics and treatment of NRF2-stabilized tumors. *Mol Cancer Res.* 12:58-68. 2014
  3. Iwadate R, Inoue J, Tsuda H, Takano M, Furuya K, Hirasawa A, Aoki D, Inazawa J. High Expression of SQSTM1/p62 Protein Is Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Acta Histochem Cytochem.* 47: 295-301. 2014
  4. Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Brodsky AL, Noji H, Kitamura K, Eto T, Takahashi T, Masuko M, Matsumoto T, Wano Y, Shichishima T, Shibayama H, Hase M, Li L, Johnson K, Lazarowski A, Tamburini P, Inazawa J, Kinoshita T, Kanakura Y: Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N Engl J Med.* 370:632-9. 2014
  5. Hosoda F, Arai Y, Okada N, Shimizu H, Miyamoto M, Kitagawa N, Katai H, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Ohki M, Shibata T: Integrated genomic and functional analyses reveal glyoxalase I as a novel metabolic oncogene in human gastric cancer. *Oncogene* 34:1196-206. 2014
  6. Endo H, Muramatsu T, Furuta M, Uzawa N, Pimkhaokham A, Amagasa T, Inazawa J, Kozaki K: Potential of tumor-suppressive miR-596 targeting LGALS3BP as a therapeutic agent in oral cancer. *Carcinogenesis* 34:560-9. 2013
  7. Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K, Tanaka S, Arai S, Shimamura T, Niida A, Miyano S, Inazawa J: The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 8:e60155. 2013
  8. Harazono Y, Muramatsu T, Endo H, Uzawa N, Kawano T, Harada K, Inazawa J, Kozaki K: miR-655 is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2. *PLoS One* 8:e62757. 2013
  9. Low SK, Takahashi A, Ashikawa K, Inazawa J, Miki Y, Kubo M, Nakamura Y, Katagiri T: Genome-wide association study of breast cancer in the Japanese population. *PLoS One* 8:e76463. 2013
  10. Kurasawa Y, Kozaki K, Pimkhaokham A, Muramatsu T, Ono H, Ishihara T, Uzawa N, Imoto I, Amagasa T, Inazawa J: Stabilization of phenotypic plasticity through mesenchymal-specific DNA hypermethylation in cancer cells. *Oncogene* 31:1963-74. 2012
  11. Ooi A, Inokuchi M, Harada S, Inazawa J, Tajiri R, Sawada-Kitamura S, Ikeda H, Kawashima H, Dobashi Y: Gene amplification of ESR1 in breast cancers - Fact or fiction? A fluorescence in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification study. *J Pathol.* 227:8-16. 2012
  12. Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J: A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene* 31:4397-408. 2012
  13. Ono H, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Matsui T, Kurasawa Y, Muramatsu T, Sugihara K, Inazawa J: SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation. *Oncogene* 31:4923-34. 2012
  14. Akamatsu S, Takata R, Haiman CA, Takahashi A, Inoue T, Kubo M, Furihata M, Kamatani N, Inazawa J, Chen GK, Le Marchand L, Kolonel LN, Katoh T, Yamano Y, Yamakado M, Takahashi H, Yamada H, Egawa S, Fujioka T, Henderson BE, Habuchi T, Ogawa O, Nakamura Y, Nakagawa H: Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese. *Nat Genet.* 44:426-9. 2012
  15. Matsumura S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Muramatsu T, Furuta M, Tanaka S, Sakamoto M, Arai S, Inazawa J: Integrative array-based approach identifies MZB1 as a frequently methylated putative tumor-suppressor in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 18:3541-3551. 2012

16. Miyawaki Y, Kawachi H, Ooi A, Eishi Y, Kawano T, Inazawa J, \*Imoto I: Genomic copy-number alterations of MYC and FHIT genes are associated with survival in esophageal squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci.* 103:1558-66. 2012
17. Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Haruki S, Sudol M, Shimada Y, Tsuda H, Kawano T, Inazawa J: YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis* 32:389-98. 2011
18. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y: Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis* 32:462-9. 2011
19. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol Med.* 3:320-33. 2011
20. Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, Omura K, Inazawa J: The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer Res.* 71:5765-78. 2011
21. Tsuruta T, Kozaki K, Uesugi A, Furuta M, Hirasawa A, Imoto I, Susumu N, Aoki D, Inazawa J: miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res.* 71:6450-62. 2011
22. Ishihara T, Inoue J, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J: HECT-type ubiquitin ligase ITCH targets lysosomal-associated protein multi-spanning transmembrane 5 (LAPTM5) and prevents LAPTM5-mediated cell death. *J Biol Chem.* 286:44086-94. 2011
23. Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Hosoda F, Gotoh M, Tsuta K, Asamura H, Matsuno Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S: DEK oncoprotein regulates transcriptional modifiers and sustains tumor initiation activity in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung. *Oncogene* 29:4671-81. 2010
24. Takata R, Akamatsu S, Kubo M, Takahashi A, Hosono N, Kawaguchi T, Tsunoda T, Inazawa J, Kamatani N, Ogawa O, Fujioka T, Nakamura Y, Nakagawa H: Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population. *Nat Genet.* 42:751-4. 2010
25. Miki D, Kubo M, Takahashi A, Yoon KA, Kim J, Lee GK, Zo JI, Lee JS, Hosono N, Morizono T, Tsunoda T, Kamatani N, Chayama K, Takahashi T, Inazawa J, Nakamura Y, Daigo Y: Variation in TP63 is associated with lung adenocarcinoma susceptibility in Japanese and Korean populations. *Nat Genet.* 42:893-6. 2010
26. Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J: miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 31:766-76. 2010
27. 1. Haruki S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J: Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis* 31:1027-36. 2010

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

1. 発明の名称：核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法  
 発明者：稲澤譲治・井本逸勢  
 権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社  
 出願番号：10164051.4  
 出願日：2010/5/27  
 国内外の別：国内

取得状況（計3件）

1. 発明の名称：癌の検出方法および癌抑制剤

発明者：稲澤讓治・小崎健一・井本逸勢  
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社  
登録番号：特許第 8183223 号  
登録日：2012/5/22  
出願番号：12/964.464、  
出願日：2010/12/9  
国内外の別：国内

2. 発明の名称：卵巣癌の検出方法

発明者：稲澤讓治・井本逸勢・菊池良子  
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社  
登録番号：特許第 5645089 号  
登録日：2014/11/14  
出願番号：特願 2012-209426  
出願日：2012/9/24  
国内外の別：国内

3. 発明の名称：卵巣癌の検出方法、及び抑制方法（US 分割）

発明者：稲澤讓治・井本逸勢・菊池良子  
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社  
登録番号：特許第 8741641 号  
登録日：2014/6/3  
出願番号：13/659.834  
出願日：2012/10/24  
国内外の別：国外 US

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/cgen/framepage.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲澤 讓治 ( INAZAWA, Johji )  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
研究者番号：30193551

(2) 分担研究者

井上 純 ( INOUE, Jun )  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師  
研究者番号：50568326

(3) 分担研究者

谷本 幸介 ( TANIMOTO, Kosuke )  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教  
研究者番号：60611613

(4) 分担研究者

小崎 健一 ( KOZAKI, Ken-ichi )  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：50270715