

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10727

研究課題名(和文) 子宮体癌におけるDNAメチル化の網羅的解析とエピミュレーション

研究課題名(英文) Genome-wide DNA methylation analysis in endometrial cancer

研究代表者

矢野倉 恵 (YANOKURA, Megumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：20433732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】子宮体癌の中には、様々な遺伝子に異常メチル化を認める癌が存在する。そこで今回我々は、子宮体癌患者の末梢血DNAにおける異常メチル化をゲノムワイドに解析し、その特徴や原因を明らかにすることを目的とした。

【方法】倫理委員会の承認のもと、子宮体癌患者25名の癌部DNAを解析し、メチル-high群とメチル(-)群に分類した。各群の末梢血DNAにおける遺伝子プロモーター領域のメチル化率を次世代シーケンサーにて解析・比較した。

【結果】メチル-high群末梢血DNAにおいて、miR-663aのプロモーター領域のメチル化率はメチル(-)群に比し、有意に高値であった。

研究成果の概要(英文)：[Objective] Concurrent DNA methylation of multiple genes occurs in endometrial cancer. However, the features and causes of high-methylation rate endometrial cancer are not well understood. Therefore, the aim of this study was to investigate the DNA methylation status in normal tissue from patients with endometrial cancer.

[Methods] The study was approved by the Ethics Committee. The subjects were 25 patients with endometrial cancer from whom cancer tissue and peripheral blood cells (PBCs) were obtained. The 25 cancer samples were classified as Methyl-high, and Methyl-negative (Methyl(-)) by methylation-specific PCR (MSP) analysis of three genes. DNA libraries were prepared from peripheral blood DNAs from 2 Methyl-H and 2 Methyl(-) patients, and bisulfite sequencing was performed.

[Results] PBC DNA in Methyl-H cases had significant hypermethylation in the miR-663a promoter region, compared to Methyl(-) cases.

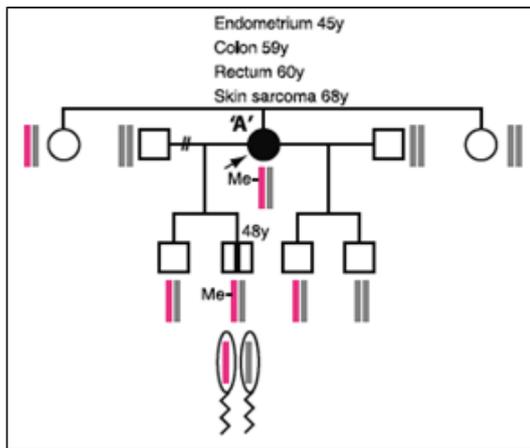
研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：epimutation 子宮体癌 miR-663a CIMP

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌の患者数は 2008 年に初めて子宮癌全体の 50%を超え、今後も増加すると考えられている (独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター「地域がん登録全国推計によるがん罹患データ (1975 年～2008 年)」より)。特に近年は若年の子宮体癌患者も増加しており、発癌メカニズムの解明やより良い治療法の開発が求められている。

若年性子宮体癌発症の原因の一つとして考えられるのが遺伝性子宮体癌である。遺伝性子宮体癌の中で最も頻度が高いのが Lynch 症候群であり、全子宮体癌の約 1%を占めると報告されている (Kouji Banno, Megumi Yanokura, et al. Current Genomics, 2009)。Lynch 症候群は常染色体優性遺伝性の疾患で、家系内に大腸癌や子宮体癌などの集積を認める。これまで、DNA 複製時のエラーを修復する DNA mismatch repair gene (MMR gene) である hMLH1, hMSH2, hMSH6 などの生殖細胞遺伝子変異によって引き起こされると考えられてきた (Peltomaki P, et al. Gastroenterology 1997)。しかし、リンチ症候群と診断された患者の約 30%には、明らかな MMR 遺伝子の病的変異が認められなかった。そこで、さらにこれら遺伝子変異の認められなかったリンチ症候群患者に関して研究が行われた結果、hMLH1 遺伝子のプロモーター領域における異常メチル化が遺伝し、Lynch 症候群が発症する可能性が示唆された (Sharma S, et al. Carcinogenesis 2010、下図参照)。



これまで、ほ乳類では DNA メチル化といったエピジェネティックな情報は配偶子形成段階および受精後初期に起こるゲノムワイドな脱メチル化により全て消去され、子孫には遺伝しないものと考えられてきた。だが近年、高脂肪食を与えられた母親マウス卵子における代謝関連遺伝子の異常メチル化が、その子マウスの卵子や肝臓でも同様に認められ (Ge ZJ, et al. Environ Health Perspect. 2014)、ほ乳類でもメチル化が遺伝する可能性が高まった。このような遺伝する DNA メ

チル化のことをエピメューテーション (epimutation) と呼び、新たな発癌機構として注目されている。

2. 研究の目的

今回我々は、遺伝性子宮体癌におけるエピメューテーションの関与を網羅的に解析し、発癌メカニズムの解明を目的とし研究を行う。これまで、Lynch 症候群におけるエピメューテーションの解析は、主な原因遺伝子である hMLH1 に限って行われてきた。しかし、そのほとんどが Lynch 症候群の中の大腸癌に関する研究であり、子宮体癌のエピメューテーションに関する報告は世界的にも現在までのところ 8 報しかなく、ほとんど研究が行われていない。

そこで、エピメューテーション保因子宮体癌患者と非保因子宮体癌患者の正常細胞における遺伝子プロモーター領域の異常メチル化を網羅的に解析・比較することで、遺伝性子宮体癌におけるエピメューテーションの特徴を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) エピジェネティック発癌患者の選別

これまでの Lynch 症候群におけるエピメューテーション研究により、特に hMLH1 のメチル化の遺伝はメンデルの法則に従わないことが報告されている (Hesson LB, et al. Curr Opin Genet Dev, 2010)。メチル化の遺伝は可逆的であり、患者本人の正常細胞 DNA の MMR 遺伝子にエピメューテーションがなくても Lynch 症候群である可能性がある。

これまで我々は散発性子宮体癌の発癌とメチル化との関わりを研究してきており、散発性子宮体癌患者 50 例に対し 3 つの主要な癌関連遺伝子のメチル化を解析したところ、2 つ以上の遺伝子にメチル化が認められた患者 (エピジェネティック発癌群) は 18% (9/50) であった。1 つ以上の遺伝子にメチル化が認められた患者は約 60%であったことを考えると、エピジェネティック発癌群はメチル化を獲得しやすい素地があり、MMR 遺伝子にエピメューテーションの認められない Lynch 症候群患者である可能性が高いと考えた。

そこで、慶應病院産婦人科において子宮体癌と診断された患者から、同意を得た上で子宮体癌組織を得る。サンプルより DNA を抽出し、hMLH1, APC, E-cadherin 遺伝子のプロモーター領域における異常メチル化を MSP (Methylation specific PCR) 法にて解析し、2 つ以上の遺伝子にメチル化が認められた患者をエピジェネティック発癌群として選別する。また、1 つもメチル化が認められなかった患者をコントロール群とする。

(2) 遺伝子プロモーター領域メチル化の網羅的解析

エピジェネティック発癌群およびコント

ロール群患者の末梢血から抽出した核酸を用いて、プロモーター領域のメチル化解析を、それぞれ Miseq にて行い、エピミューテーションの特徴を明らかにする。

(3) エピミューテーション保因者の選別

慶應病院産婦人科において子宮体癌と診断された患者から、同意を得た上で末梢血を得る。末梢血から DNA を抽出し、MMR 遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化を MSP 法にて解析する。

MMR 遺伝子は Lynch 症候群の原因遺伝子と考えられており、Lynch 症候群の確定診断としての遺伝子検査にも用いられている。

(4) Lynch 症候群患者における遺伝子異常解析

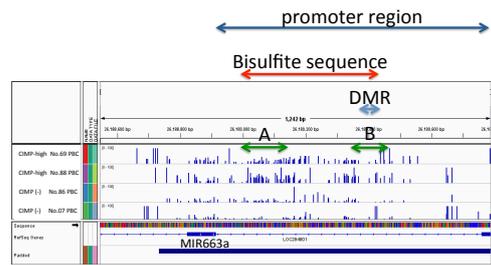
慶應病院産婦人科において子宮体癌と診断された患者に対し、家計調査および新アムステルダムクライテリア等の診断基準を用いた Lynch 症候群の一次スクリーニングを行う。一次スクリーニング陽性患者については MMR タンパクの発現解析および遺伝子変異解析を行う。

4. 研究成果

(1) 106 人の子宮体癌患者のうち癌部組織および末梢血の両方が研究に使用可能であった 25 人より書面による同意を得た上で各サンプルより DNA および RNA を抽出した。まず子宮体癌組織における MLH1, APC, E-cadherin 遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化を MSP 法にて解析した。MSP 解析の結果、2 以上の遺伝子に異常メチル化を認めた症例をメチル-high、1 つの遺伝子に異常メチル化を認めた症例をメチル-low、1 つも異常メチル化を認めなかった症例をメチル(-)とした。その結果、25 例中 2 例がメチル-high、7 例がメチル-low、16 例がメチル(-)であった。

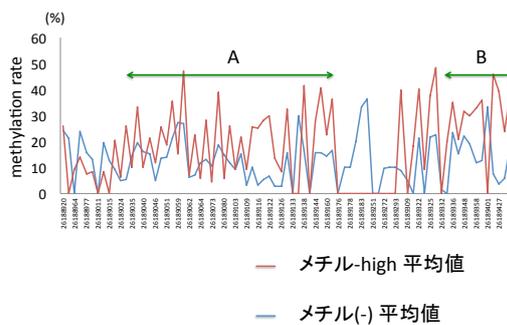
(2) エピジェネティック発癌のメカニズム解明のため、メチル-high 子宮体癌患者 (エピジェネティック発癌群) 2 例とメチル(-) 子宮体癌患者 (コントロール群) 2 例の末梢血 DNA を用いて Methyl-seq 用 library を作成し、CpG アイランドを中心とした 370 万個の CpG について targeted bisulfite sequence を行った。エピジェネティック発癌群とコントロール群間における DMC (Differentially methylated CpG) および DMR (Differentially methylated region) を解析した結果、DMC と DMR に共通して同定されたのは miR-663a プロモーター領域のみであった (Fig. 1)。miR-663a のプロモーター領域は、ヒト成人正常組織では低メチル化領域と報告されていることから、メチル-high 症例に見られるメチル化は異常メチル化と推測された。

Fig.1



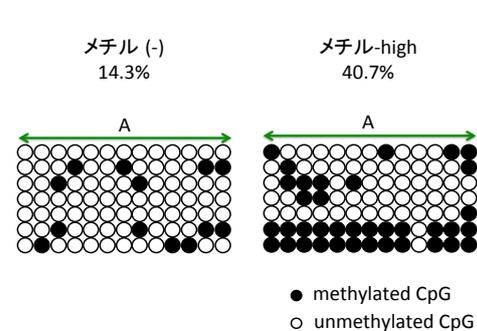
さらに、miR-663a プロモーター領域のうちメチル-High 群のメチル化がメチル(-)群に比し高い傾向を示した領域 A (Fig. 2) について、バイサルファイトシーケンスを行い Methyl-seq のバリデーションを行った。

Fig.2



その結果、メチル-high の末梢血 DNA のメチル化率が高いことが確認された (Fig. 3)。また、この領域は同一患者の癌部において 72.2%メチル化されていることから、癌化と深く関わっている可能性が示唆された。

Fig.3



さらに、semi-quantitative RT-PCR の結果、メチル-high 群の末梢血における miR-663a の発現は、他の群に比べ低いことが明らかになった。また、遺伝子に同時多発的に異常メチル化を示す CIMP (CpG Island Methylator

Phenotype) 陽性大腸癌では DNMT 群の発現が亢進しているとの報告があることから、エピジェネティック発癌群およびコントロール群の子宮体癌部における DNMT1, 3a, 3b の発現を RT-qPCR にて解析した。その結果、子宮体癌部では DNMT1 および DNMT3b の発現がエピジェネティック発癌群の方が高いことが明らかとなった。これらの結果から、DNMT 群の発現亢進がエピジェネティック発癌群子宮体癌の phenotype に寄与している可能性が示唆された。今後、miR-663a の発現消失が子宮体癌の発癌に寄与するかどうか functional assay 等による解析を行いたい。

今回、子宮と同じ中胚葉由来ということから末梢血を正常組織として使用し、miR-663a プロモーター領域の異常メチル化を同定した。今後、このエピメチレーションが de novo か遺伝性か血縁者の解析を行いたい。また、miR-663a のメチル化をターゲットとしたエピジェネティック発癌群子宮体癌の予測・予防への応用など、さらなる検討をしたい。

(3) 子宮体癌患者 106 人より書面による同意を得た上で、末梢血を採取し DNA を抽出した。リンチ症候群の原因遺伝子である MLH1, MSH2, MSH6 のプロモーター領域の異常メチル化を MSP 法にて解析した。106 例全例で全ての遺伝子のメチル化解析は可能であったが、エピメチレーションは検出されなかった。

(4) 106 例に遺伝性子宮体癌患者がいるか医師による診療を行った。リンチ症候群の一次スクリーニングである改定アムステルダム基準および改定ベセスダガイドラインに基づく家系調査の結果、106 例中 2 例が一次スクリーニング陽性であった。その 2 症例に対し、子宮体癌部における MMR 遺伝子の発現を免疫染色にて解析した (二次スクリーニング)。その結果、1 例で MLH1 タンパクの発現消失を、もう 1 例で MSH6 タンパクの発現消失を認めた。MSH6 タンパクの発現消失を認めた症例に対し、末梢血 DNA の MSH6 エクソンシークエンスを行った結果、exon4 に CGA (Arginine) から TGA (Stop) への nonsense mutation を認めたため、本症例はリンチ症候群と診断された。

これらの結果から、全子宮体癌に対する遺伝性子宮体癌の割合は 1.9% (2/106 例) であり、その原因は MMR 遺伝子の mutation であることが明らかになった。さらに、今回同定した MSH6 のナンセンス変異は、これまでに報告がない新規の遺伝子異常であった。また、リンチ症候群の大腸癌では MSH6 の遺伝子変異は MLH1 や MSH2 に比べ低いことが明らかになっており、大腸癌と子宮体癌では発癌メカニズムが異なることが示唆された。

本研究ではエピメチレーションが原因の遺伝性子宮体癌患者が同定できず、頻度および発癌メカニズムの解明には至らなかった。

たが、今後、症例数を増やし検討したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

すべて査読あり

(1) Megumi Yanokura, Kouji Banno, Masataka Adachi, Daisuke Aoki, Kuniya Abe. Genome-wide DNA methylation sequencing revealed that miR-663a is a novel epimutation candidate in CIMP-high endometrial cancer.

International journal of Oncology. 50: 1934-1946, 2017

(2) Masataka Adachi, Kouji Banno, Kenta Masuda, Megumi Yanokura, Moito Iijima, Takashi Takeda, Haruko Kunitomi, Yusuke Kobayashi, Wataru Yamagami, Akira Hirasawa, Kaori Kameyama, Koukichi Sugano, Daisuke Aoki.

Carcinoma of the lower uterine segment diagnosed with Lynch syndrome based on MSH6 germline mutation: A case report.

J Obstet Gynaecol Res. 43(2):416-420, 2017.

doi:10.1111/jog.13202.

(3) Takashi Takeda, Kouji Banno*, Megumi Yanokura, Masataka Adachi, Moito Iijima, Haruko Kunitomi, Kanako Nakamura, Miho Iida, Yuya Nogami, Kiyoko Umene, Kenta Masuda, Yusuke Kobayashi, Wataru Yamagami, Akira Hirasawa, Eiichiro Tominaga, Nobuyuki Susumu, Daisuke Aoki.

Methylation analysis of DNA mismatch repair genes using DNA derived from peripheral blood of patients with endometrial cancer: epimutation in endometrial carcinogenesis.

Genes. 7(10), 86; 2016

doi:10.3390/genes7100086

[学会発表] (計 1 件)

(1) 矢野倉 恵

Genome-wide DNA methylation sequencing revealed that miR-663a is a novel epimutation candidate in CIMP-high endometrial cancer

第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2017

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野倉 恵 (YANOKURA, Megumi)
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助
教
研究者番号：20433732

(2) 研究分担者

阪埜 浩司 (BANNO, Kouji)
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授
研究者番号：70265875