

令和元年5月22日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05412

研究課題名(和文) DNAメチル化異常特性に基づいた胃癌層別化と発癌分子基盤の同定

研究課題名(英文) Stratification of gastric cancer and identification of molecular mechanism of gastric tumorigenesis based on aberrant DNA methylation profile

研究代表者

金田 篤志 (Kaneda, Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10313024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：臨床胃癌標本を網羅的なDNAメチル化解析により複数の分子サブタイプに分類し、エクソン変異解析により各胃癌サブタイプに特徴的な遺伝子変異を明らかにした。高メチル化胃癌サブタイプ2群については、同定した遺伝子変異とDNAメチル化異常のシナジーにより発癌する分子機構を明らかにした。さらに胃上皮細胞にDNA異常メチル化が誘導される機構として、EBウイルス感染が4週間以内にメチル化誘導すること、そしてTET2発現低下が原因の1つであることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌は我が国において生涯のうちに1/2の者が罹患し1/3の者の死因となる疾患であり、網羅的解析により癌の原因を明らかにすることは学術的にも、また新たな治療方法を構築して社会的に貢献する意味でも大変重要である。その中でも胃癌は重要な癌死要因の1つであり、胃癌における分子異常を詳細に同定し、その中から胃発癌に重要な分子異常を同定したこと、またどのようにその分子異常が蓄積したのかその原因の一端を明らかにしたことは、発癌機構を理解する上で学術的にも、また今後新たな胃癌治療法を確立する上でも、意義のある成果をあげた。

研究成果の概要(英文)：We conducted genome-wide DNA methylation analysis of clinical gastric cancer samples to classify gastric cancer into several molecular subtypes, and we also conducted exon-sequencing analysis to identify genetic mutations specifically observed in each subtype. As for high-methylation gastric cancer subtypes, we clarified molecular mechanisms of gastric cancer through synergy of genetic mutations and aberrant DNA methylation. Moreover, we analyzed the mechanisms to induce aberrant epigenomic aberrations in gastric epithelial cells. We infected Epstein-Barr virus to gastric epithelial cells in vitro, and showed that EBV infection induced extensive DNA hypermethylation within four weeks genomewidely, and repression of TET2 was one of the molecular mechanisms for DNA methylation induction.

研究分野：消化器外科、エピジェネティクス

キーワード：がん エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

胃癌は本邦において毎年10万人以上が罹患し約5万人が命を落とす重要疾患の一つであり、その本態としての発癌分子基盤を解明することは予後を改善するための喫緊の課題である。胃癌の発症にはヘリコバクターピロリ菌(ピロリ菌)とEpstein-Barrウイルス(EBV)という二つの病原体の関与が知られる。胃癌の背景粘膜の95%以上にはピロリ菌感染が確認され、さらにEBV陽性胃癌は胃癌全体の7~15%を占める(Tokunagaら, *Am J Pathol* 1993)。また必ずしもピロリ菌感染を伴わず胃酸の逆流などを原因として発症する食道胃接合部癌も近年増加傾向にある。

胃発癌の分子基盤を解明するため、申請者は世界でいち早く網羅的DNAメチル化解析によるメチル化標的遺伝子の大量同定に成功し、胃癌には高メチル化・低メチル化群が存在し、エピゲノム異常の関与が大きい癌腫の1つであることを示した[申請者ら, *Cancer Res* 2002]。エピゲノム異常は、正常細胞に蓄積することで発癌リスクを上昇させ[申請者ら, *Science* 2005]、その標的治療により特異的に腫瘍発症リスクを下げることも可能であることから[申請者ら, *PNAS* 2007] 発癌に関わる重要なドライバー因子と考えられる。そこで癌症例をエピゲノム特性に基づき層別化し、各サブタイプにおいて特異的な発癌分子機構を同定すべきと考え、胃癌・大腸癌などの消化器癌を対象に層別化研究を進めてきた。

エピゲノム異常の中でも特に遺伝子プロモーター領域におけるDNAの異常高メチル化は遺伝子発現を強力に抑制し、癌抑制遺伝子の主要な不活化機構である。胃癌臨床検体を用いたDNAメチル化の網羅的解析では、胃癌症例は『低』『高』『超高』からなる3つのDNAメチル化形質に層別化され、さらにそれらにクラスターされない『超低』を含めた計4つのサブグループが存在することを報告した[申請者ら, *Cancer Res* 2011]。そのうちゲノム広範囲に極端な超高メチル化形質を示す一群がEBV陽性胃癌と100%合致した。これらの表現型は最近報告された全ゲノム包括的解析でも再確認されており(TCGA, *Nature*, 2014)、申請者らの先見的な業績が浮き彫りになる形となった。

さらに胃上皮細胞にEBVを*in vitro*感染させることでゲノム広範囲に新規DNAメチル化が誘導され、EBV陽性胃癌と同様の超高DNAメチル化形質が獲得されることも世界に先駆けて明らかにした。これまでDNA異常高メチル化の誘導因子として加齢や慢性炎症などが知られていたが、これらは生体内での緩徐な変化のためメチル化誘導機序の解析に大きな障壁となっていた。申請者らの成果は、ウイルス感染という生理的な外的ストレスによりゲノム広範囲なDNA異常高メチル化を短期間かつ高い再現性で誘導させるという世界でも稀有なモデルを樹立した点で学術的にも意義深く、先駆的な立場を基軸に据え、このモデルを使ったエピゲノム異常誘導機構の解析や発癌分子基盤解析を行うことを考えた。

2. 研究の目的

胃癌に対して、エピゲノム特性を用いた層別化に基づき発癌分子基盤を解明することを目的とする。エピゲノム異常の蓄積は発癌の原因として作用し、癌症例はそのエピゲノム異常特性を用いて異なる分子サブタイプに層別化することが可能である。胃癌もDNAメチル化異常特性の異なるサブタイプに分類され、例えば超高DNAメチル化群はEpstein-Barrウイルス(EBV)感染がメチル化異常の原因であることを申請者らは証明している。本研究では、食道胃接合部癌を含む200症例の胃癌症例についてDNAメチル化情報・エクソン変異情報の網羅的解析に基づき各サブタイプの分子異常を詳細に解明する。さらに*in vitro*のEBV感染によるDNAメチル化誘導モデルと胃上皮3D培養技術を用いて、EBV陽性胃癌を中心に胃癌サブタイプの発癌分子基盤を解明する。

3. 研究の方法

臨床胃癌標本についてInfiniumビーズアレイを用いてDNAメチル化を網羅的に解析し層別化する。各胃癌サブタイプにおいてエクソン網羅的解析を行い、特徴的な遺伝子変異を同定する。重要なドライバー変異候補については、例えば高・超高メチル化群で認めた癌遺伝子変異を導入した細胞に対して、shRNAライブラリーを用いた網羅的ノックダウン解析を行い、細胞増殖を獲得させるshRNAを同定する。DNAメチル化の蓄積については、特にEBV陽性超高メチル化群について、胃上皮細胞への*in vitro*のEBV感染モデルを用いてそのメチル化標的領域と蓄積の分子機序を解明する。shRNA標的およびメチル化標的で共に得られた遺伝子は、その不活化と特異的な遺伝子変異のシナジーにより発癌していると考えられ、機能解析により発癌分子機構を解明する。

4. 研究成果

臨床胃癌標本を用いて、ゲノム・エピゲノム網羅的解析を行った。

(1) 臨床標本の網羅的解析と新たな発癌機構同定

網羅的 DNA メチル化解析により、胃癌は複数の DNA メチル化サブタイプに層別化された (図 1)。最も異常高メチル化を示す超高メチル化群は全て EBV 陽性胃癌であり、逆に EBV 胃癌で超高メチル化を示さない症例は存在しなかった。高メチル化胃癌は、MLH1 メチル化を伴う MSI-H 胃癌と、MLH1 メチル化を伴わない MSI-L の高メチル化胃癌の 2 群を含んだ。低メチル化胃癌は、萎縮性胃炎の粘膜と同様の異常メチル化蓄積を示す低メチル化群と、炎症のない正常胃粘膜と同様にほとんど異常メチル化を示さない超低メチル化群を含んだ。

各臨床胃癌標本においてさらに HaloPlex キャプチャーシーケンスにてドライバー変異 125 遺伝子のエクソン変異解析を行い、EBV 陽性超高メチル化胃癌、MSI 高メチル化胃癌、低メチル化胃癌、それぞれの各サブタイプに特徴的にみられる遺伝子変異を同定した。特に、高メチル化を呈する 2 群 (EBV 群、MSI 群) は特徴的な遺伝子変異像を呈し、これら 2 群でのみ認める癌遺伝子変異が存在した。これら 2 群では、癌遺伝子変異が早期細胞老化を誘導しうるが、異常高メチル化による遺伝子不活化により細胞老化を回避している可能性があると考えられる。癌遺伝子変異による早期細胞老化モデルにおいて shRNA ライブラリーを用いた網羅的探索を行った (図 2)。すなわち、早期細胞老化に重要な遺伝子が shRNA でノックダウンされた場合、その細胞のみ老化を回避し細胞増殖を続けるため、回収した細胞中のゲノム DNA に存在する shRNA 配列を次世代シーケンサーを用いて大量シーケンスし、濃縮して認める shRNA 配列を同定した。その結果、細胞老化に重要な遺伝子のうち、高メチル化胃癌で異常メチル化により不活化される 3 遺伝子、変異により高頻度に変異される TGFβシグナルの 2 遺伝子、計 5 遺伝子を同定した。高メチル化を呈する胃癌サブタイプ 2 群においては、これら癌遺伝子の活性化変異や、細胞老化に重要な遺伝子の DNA メチル化ないし変異による不活化が、協調して発癌に寄与していると考えられた [Matsusaka, Mano ら、再投稿中]。

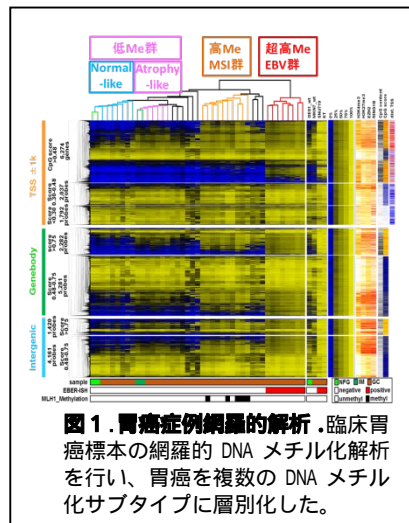


図 1. 胃癌症例網羅的解析. 臨床胃癌標本の網羅的 DNA メチル化解析を行い、胃癌を複数の DNA メチル化サブタイプに層別化した。

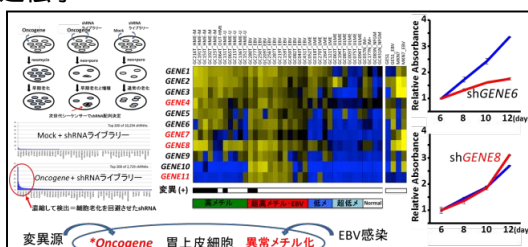


図 2. 不活化遺伝子の網羅的機能解析. 癌遺伝子変異による早期細胞老化を誘導する in vitro モデルで shRNA ライブラリーを用いた網羅的ノックダウンによるスクリーニングを行い、高メチル化胃癌において細胞老化を回避させる遺伝子を同定した。

(2) 胃上皮細胞に誘導されるエピゲノム異常の原因解明

胃上皮細胞にエピゲノム異常が誘導される原因の詳細を解明するため、EBウイルス陽性の超高メチル化胃癌に着目し、胃上皮細胞にEBウイルスを in vitro 感染するモデルを用いて、時系列的に DNA メチル化解析を行った。約 7,000 個もの遺伝子プロモーター領域に異常メチル化が誘導され、実際の臨床 EBV 胃癌に認められる異常メチル化を感染後 4 週間以内に示した。約 3,500 個の遺伝子は、転写開始点近傍も含めてプロモーター領域全体が完全にメチル化され発現抑制される一方、残りの半数はプロモーター周囲のみのメチル化にとどまり、発現抑制はなかった (図 3)。メチル化に抵抗しているプロモーターには何らかのメチル化抵抗因子が存在し、抵抗因子の消失がプロモーター領域全体に完全にメチル化が入ることにつながると考えられた [Matsusaka ら、J Pathol, 2017]。

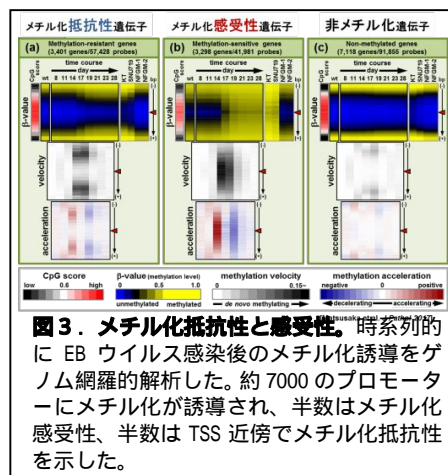


図 3. メチル化抵抗性と感受性. 時系列的に EB ウイルス感染後のメチル化誘導をゲノム網羅的解析した。約 7000 のプロモーターにメチル化が誘導され、半数はメチル化感受性、半数は TSS 近傍でメチル化抵抗性を示した。

消失するメチル化抵抗因子候補を同定する目的で、ウイルス感染前後の遺伝子発現を RNA-seq にて網羅的に解析した。ウイルス感染後はどの細胞においても、DNA 脱メチル化酵素 TET ファミリーの低下が認められた。特に TET2 が、mRNA レベルにおいても蛋白レベルにおいても顕著な発現低下を認めた。ウイルス因子の一部、および TET2 を標的とするヒト miRNA の発現上昇が TET2 の発現が低下させる原因であることも同定した。MeDIP-seq および hMeDIP-seq により、TET2 が標的とするヒドロキシメチル化部位、および EBV 感染後の異常 DNA メチル化部位を網羅的に解析し、それらの領域が非常に良くオーバーラップすること、また TET2 をノックダウンした細胞に EBV 感染した場合には異常メチル化の獲得が加速することから、DNA 脱メチル化酵素 TET2 がメチル化抵抗因子として働き、EB ウイルス感染後に TET2 が発現低下することが、TET2 が標的としているプロモーター領域に DNA 異常メチル化

が誘導される原因となっていることを報告した[Nambaら、*Oncotarget* 2016]。

ウイルス感染が誘導するエピゲノム異常として、DNAメチル化以外にヒストン修飾変化をChIP-seq法を用いて網羅的に解析した。DNAメチル化抵抗性を示すプロモーター領域では、ヒストン活性化マークが維持、あるいは新たに獲得されていた。逆にDNAメチル化感受性を示すプロモーター領域では、ヒストン活性化マークが消失していた[Funataら、*Oncotarget* 2017]。メチル化誘導に対する抵抗機構として、TET2とならび、ヒストン修飾状態を活性化させる因子の存在が示唆された。ダイナミックなヒストン修飾変化はエンハンサー領域にも及び、むしろ重要遺伝子群はプロモーター領域よりもエンハンサー領域のヒストン修飾変化によって発現制御されていた。不活化される遺伝子群は有意に上皮細胞分化や細胞増殖抑制に関連する遺伝子群を含み、逆に活性化される遺伝子群は有意に細胞増殖促進に関連する遺伝子群を含んでいた。エピゲノムランドマークがEBV感染により顕著に変化し、胃上皮細胞は増殖抑制や上皮分化と言った特性を失い、未分化性や細胞増殖性の高い細胞へと運命変化していた(図4)[Okabeら、*Sci Rep* 2017]。

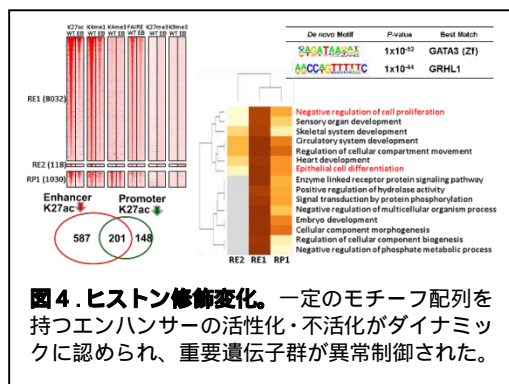


図4. ヒストン修飾変化。一定のモチーフ配列を持つエンハンサーの活性化・不活化がダイナミックに認められ、重要遺伝子群が異常制御された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 29 件)

1. Fukayama M, Kunita A, Kaneda A. Gastritis-Infection-Cancer Sequence of Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer. *Adv Exp Med Biol* 1045:437-457, 2018. doi: 10.1007/978-981-10-7230-7_20. 査読有
2. Takane K, Akagi K, Fukuyo M, Yagi K, Takayama T, Kaneda A. DNA methylation epigenotype and clinical features of NRAS-mutation(+) colorectal cancer. *Cancer Med*, 6:1023-1035, 2017. doi: 10.1002/cam4.1061. 査読有
3. Hasegawa N, Oshima M, Sashida G, Matsui H, Koide S, Saraya A, Wang C, Muto T, Takane K, Kaneda A, Shimoda K, Nakaseko C, Yokote K, Iwama A. Impact of combinatorial dysfunctions of Tet2 and Ezh2 on the epigenome in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, 31:861-871, 2017. doi: 10.1038/leu.2016.268. 査読有
4. Matsusaka K, Funata S, Fukuyo M, Seto Y, Aburatani H, Fukayama M, Kaneda A. Epstein-Barr virus infection induces genome-wide de novo DNA methylation in non-neoplastic gastric epithelial cells. *J Pathol*, 242:391-399, 2017. doi: 10.1002/path.4909. 査読有
5. Okabe A, Funata S, Matsusaka K, Namba H, Fukuyo M, Rahmutulla B, Oshima M, Iwama A, Fukayama M, Kaneda A. Regulation of tumour related genes by dynamic epigenetic alteration at enhancer regions in gastric epithelial cells infected by Epstein-Barr virus. *Sci Rep*, 7: 7924, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-08370-7. 査読有
6. Funata S, Matsusaka K, Yamanaka R, Yamamoto S, Okabe A, Fukuyo M, Aburatani H, Fukayama M, Kaneda A. Histone modification alteration coordinated with acquisition of promoter DNA methylation during Epstein-Barr virus infection. *Oncotarget*, 8:55265-55279, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.19423. 査読有
7. Matsusaka K, Ishikawa S, Nakayama A, Ushiku T, Nishimoto A, Urabe M, Kaneko N, Kunita A, Kaneda A, Aburatani H, Fujishiro M, Seto Y, Fukayama M. Tumor Content Chart-Assisted HER2/CEP17 Digital PCR Analysis of Gastric Cancer Biopsy Specimens. *PLoS One*, 11:e0154430, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0154430. 査読有
8. Sakai E, Fukuyo M, Matsusaka K, Ohata K, Doi N, Takane K, Matsuhashi N, Fukushima J, Nakajima A, Kaneda A. TP53 mutation at early stage of colorectal cancer progression from two types of laterally spreading tumors. *Cancer Sci*, 107:820-7, 2016. doi: 10.1111/cas.12930. 査読有
9. Takane K, Matsusaka K, Ota S, Fukuyo M, Yue Y, Nishimura M, Abe H, Sakai E, Matsushita K, Miyauchi H, Fukayama M, Aburatani H, Nakatani Y, Takayama T, Matsubara H, Akagi K, Kaneda A. Two subtypes of colorectal tumor with distinct molecular features in familial adenomatous polyposis. *Oncotarget*, 7:84003-16, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.11510. 査読有
10. Namba-Fukuyo H, Funata S, Matsusaka K, Fukuyo M, Rahmutulla B, Mano Y, Fukayama M, Aburatani H, Kaneda A. TET2 functions as a resistance factor against DNA methylation acquisition during Epstein-Barr virus infection. *Oncotarget*, 7:81512-26, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.13130. 査読有
11. Matsusaka K, Ushiku T, Urabe M, Fukuyo M, Abe H, Ishikawa S, Seto Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kaneda A, Fukayama M. Coupling CDH17 and CLDN18 Markers for Comprehensive Membrane-targeted Detection of Human Gastric Cancer. *Oncotarget*, 7:64168-81, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.11638. 査読有
12. Sakai E, Fukuyo M, Ohata K, Matsusaka K, Doi N, Mano Y, Takane K, Abe H, Yagi K, Matsuhashi

N, Fukushima J, Fukayama M, Akagi K, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. Genetic and epigenetic aberrations occurring in colorectal tumors associated with serrated pathway. *Int J Cancer* 138: 1634-44, 2016. doi: 10.1002/ijc.29903. 査読有

〔学会発表〕(計 39 件)

1. 金田篤志. がんエピジェネティクスの重要性と研究の現状. 日本唾液腺学会第 63 回学術集会 2018/12/8 文京学院大学本郷キャンパス (東京都・東京) (招待講演)
2. 金田篤志. 胃がんの遺伝子分類～層別化治療への入り口～. 除菌時代について考える会 2018/11/24 武田薬品工業株式会社グローバル本社 (東京都・東京) (招待講演)
3. 金田篤志. ウイルス感染がダイナミックに誘導するプロモーターおよびエンハンサー領域の発癌性エピゲノム変化. 第 29 回日本消化器癌発生学会総会. 2018/11/16 都市センターホテル (東京都・東京) (シンポジウム)
4. Atsushi Kaneda. Genetic and Epigenetic features of highly methylated subgroups of gastric cancer. The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2018/9/27 Osaka International Convention Center/Rihga Royal Hotel Osaka (大阪府・大阪) (招待講演)
5. 金田篤志. 胃癌のエピゲノム異常と発癌分子機構への関与. 第 79 回病理診断学講座 Seminar in Diagnostic Pathology 2018/9/6 岩手医科大学医学部 (岩手県・盛岡) (招待講演)
6. Atsushi Kaneda. Epigenomic aberrations to induce gastrointestinal cancer. 第 5 回千葉県遺伝医療研究会. 2017.11.24 むのはな同窓会館 (千葉県・千葉市) (招待講演)
7. Kaneda A. Development of novel therapeutic strategy based on stratification of gastric cancer cases through comprehensive analysis. France Japan Epigenetics Workshop 2017. Nov 6-8, 2017. Institut Jacques Monod, Paris. (招待講演)
8. Kaneda A. Induction of epigenetic alterations in gastric epithelium and their contribution to gastric tumorigenesis International Conference on Cancer Epigenetics and Biomarkers. Oct 26-28, 2017 Osaka. (招待講演)
9. Atsushi Kaneda. Epigenomic landscape of Epstein-Barr virus associated gastric cancer. 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2017/9/28 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) (招待講演)
10. 金田篤志. 胃発がんにおける可塑的なエピゲノム変化. 第 5 回がん代謝研究会. 2017/7/14 北海道大学医学部学友会館 (北海道・札幌) (招待講演)
11. 金田篤志. 消化管発がんにおけるエピゲノム異常のインパクト. 第 17 回日本抗加齢医学総会シンポジウム「加齢に伴う発がん過程におけるがん幹細胞とエピゲノム異常のインパクト」. 2017/6/2 東京国際フォーラム (東京都・東京) (招待講演)
12. 金田篤志. ゲノム情報・ゲノム修飾情報とがん医療. 千葉県医師会医学会 第 17 回学術大会 2016. 11. 3. 招待講演 ホテルポートプラザちば (千葉県・千葉市)
13. 金田篤志. Critical DNA hypermethylation in gastrointestinal cancer and its region-specific inhibition by small-molecule compounds. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016. 10. 8 - 10 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
14. 金田篤志. がんの層別化とゲノム情報. 千葉県におけるゲノム医療実現に向けて 2016. 10. 4 招待講演 ホテルグリーンタワー幕張 (千葉県・千葉市)
15. 金田篤志. エピゲノム異常の大腸発癌過程におけるインパクト. 第 53 回日本臨床分子医学会 2016. 4. 16 招待講演 有楽町フォーラム (東京都・東京)

〔図書〕(計 5 件)

1. Atsushi Kaneda & Yu-ichi Tsukada (Eds). Humana Press. DNA and Histone Methylation as Cancer Targets. 2017. Pages: 1-622.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moloncol/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。