

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005～2009  
 課題番号：17013073  
 研究課題名（和文） がんの発生と進展における DNA メチル化およびヒストン修飾異常の役割  
 研究課題名（英文） Role of DNA methylation and altered histone modification in development and progression of cancer  
 研究代表者  
 豊田 実 (TOYOTA MINORU)  
 札幌医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：70270676

## 研究成果の概要（和文）：

DNA メチル化やヒストン修飾異常の解析が進みつつあるが、腫瘍の種類によっては、エピジェネティックな異常により不活化を受ける標的遺伝子の情報は十分ではない。本研究では、がんにおける DNA メチル化やヒストン修飾異常について網羅的に解析し、発がんの分子機構を明らかにすることを目的とする。マイクロアレイを用いて、脱メチル化により発現誘導される遺伝子の解析を行い、多数の新規がん抑制遺伝子候補を同定した。DNA メチル化は、抗がん剤予測のマーカーとしても有用である。さらに、網羅的エピゲノム解析による、DNA メチル化、ヒストン修飾と機能性 RNA の関連に関する解析を行い、ヒストン H3K4 のピークが未知の non-coding RNA のエピジェネティックな異常を解析するための分子マーカーとして有用であることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Numerous evidences have suggested that DNA methylation and histone modification play a role in tumorigenesis. However, information about target of epigenetic alterations is not enough. Here, we performed genome wide microarray analysis to identify novel targets of DNA methylation. DNA methylation can also be useful to predict sensitivity of tumors to anti-cancer drugs. We also found that histone H3K4 methylation can be a good molecular marker to identify non-coding RNA silenced by epigenetic changes in cancer.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,400,000	0	9,400,000
2006年度	9,400,000	0	9,400,000
2007年度	9,400,000	0	9,400,000
2008年度	9,400,000	0	9,400,000
2009年度	9,400,000	0	9,400,000
総計	47,000,000	0	47,000,000

## 研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：エピジェネティクス、メチル化、ヒストン、遺伝子発現、クロマチン

### 1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化やヒストン修飾異常の解析が進みつつあるが、腫瘍の種類によっては、エピジェネティックな異常により不活化を受ける標的遺伝子の情報は十分ではない。特に、エピジェネティックな異常で不活化される遺伝子の機能については解析されていないことが多い。また、これまで、マイクロアレイを用いたゲノム網羅的エピゲノム解析を行ってきたが、non-coding RNA に対するプローブがないため、既存のアレイではゲノムのカバー率が不十分であった。これらの背景を踏まえ、より網羅的・統合的なエピゲノム解析と機能解析を行うことが必要と考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、がんにおける DNA メチル化やヒストン修飾異常について網羅的に解析し、発がんの分子機構を明らかにすることを目的とする。また、メチル化により不活化されている遺伝子の機能解析、抗がん剤感受性や抵抗性における役割についても解析する。さらに、エピゲノム情報を統合的に解析し、DNA メチル化、ヒストン修飾と機能性 RNA の関連について明らかにする。

### 3. 研究の方法

腫瘍細胞株を DNA メチル化阻害剤、5-aza-2'-deoxycytidine を用いて処理し、マイクロアレイを用いて発現が誘導される遺伝子を網羅的に解析した。遺伝子の機能解析には、アデノウイルスベクターを用いた腫瘍増殖抑制能の解析、ルシフェラーゼアッセイによる転写活性化能の解析を行った。薬剤感受性に関しては、MTX8 アッセイを用いた。網羅的エピゲノム解析には、ChIP on ChIP 法や、次世代シーケンサーを用いた ChIP シーケンシング法を用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 各種腫瘍において異常メチル化されている遺伝子の網羅的解析

DNA メチル化の標的遺伝子は腫瘍によって、特性があると考えられる。われわれは、DNA メチル化異常の情報が比較的少ない、乳癌、多発性骨髄腫において、microarray を用いて、脱メチル化により発現誘導される遺伝子の解析を行った(図 1)。その結果、これらの腫瘍で DNA メチル化により不活化されている新規遺伝子を同定出来た。乳癌において、NTN4 遺伝子のメチル化は高頻度かつ癌特性が高く、診断のマーカーとして有用な可能性が示

唆された。

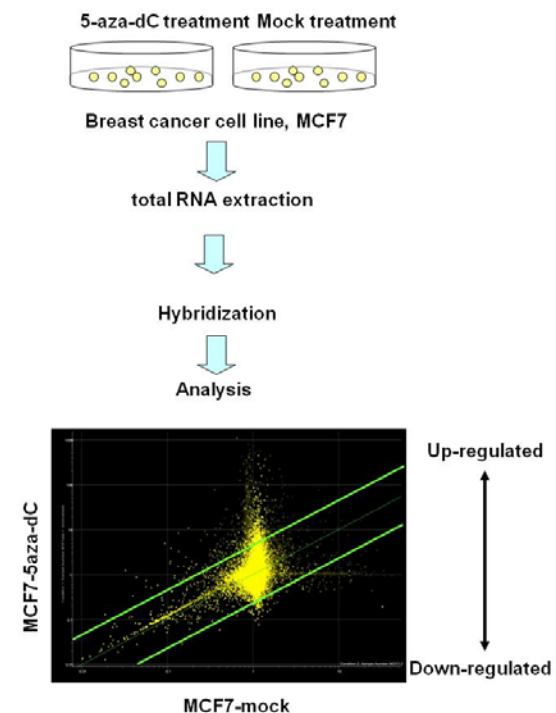


図 1. 乳癌細胞株 MCF7 を DNA メチル化阻害剤で処理し、5 倍以上発現が誘導される遺伝子を 288 個同定した。

#### (2) エピジェネティック異常により不活化されている遺伝子の機能解析

大腸癌や胃癌において DNA メチル化により不活化されるユビキチンリガーゼ CHFR の機能解析を行った。CHFR を大腸癌細胞株に遺伝子導入することにより、NF- $\kappa$ B に関連する遺伝子の発現抑制を認めた。CHFR により NF- $\kappa$ B の標的遺伝子の一つ、IL-8 の発現は転写レベルで抑制された。また、CHFR 変異体の解析から NF- $\kappa$ B の抑制はユビキチンリガーゼ活性に非依存性であることを明らかにした。CHFR を大腸癌のマウス Xenograft にアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入すると、腫瘍細胞の増殖を抑制した。また、CHFR の遺伝子導入により、腫瘍血管の造成が抑制されていた。以上の結果から、CHFR は細胞周期チェックポイント遺伝子としてだけではなく、NF- $\kappa$ B 抑制を介して抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

#### (3) 多発性骨髄腫で異常メチル化されている遺伝子をマイクロアレイでスクリーニングし、デキサメサゾン誘導性アポトーシスに関連する RASD1 遺伝子が、異常メチル化により

不活化されていることを明らかにした。RASD1 が異常メチル化により不活化されている腫瘍細胞を、DNA メチル化阻害剤で処理し、RASD1 の発現を誘導することで、腫瘍細胞のデキサメサゾン感受性が回復した。また、再発性の多発性骨髄腫症例では、RASD1 のメチル化レベルが初発時に比べて上昇しており、RASD1 遺伝子は、デキサメサゾン感受性に関与し、薬剤感受性を予測する分子マーカーとして有用である可能性が示唆された。

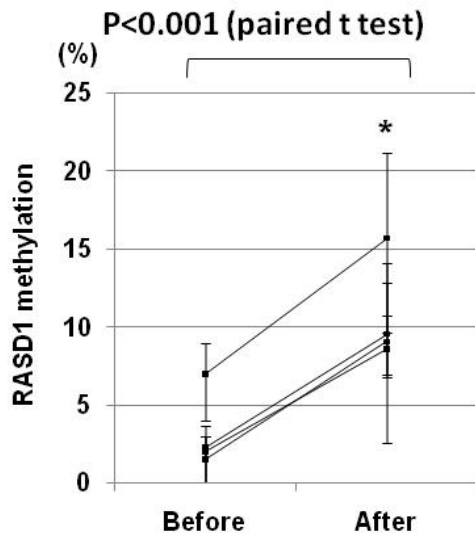


図 2. 多発性骨髄腫再発症例における RASD1 のメチル化  
再発例では、初発例よりも RASD1 のメチル化レベルが上昇しており、デキサメサゾン抵抗性の原因の一つと考えられる。

#### (4)網羅的エピゲノム解析による、DNA メチル化、ヒストン修飾と機能性 RNA の関連に関する解析

DNMT1、DNMT3 および Dicer をノックアウトした大腸癌細胞を用いて、ChIP on ChIP 法により DNA メチル化およびヒストン修飾に関して網羅的解析を行った。その結果、ICAM1 をはじめとする一部の遺伝子の DNA メチル化の維持に、RNA 干渉が関与することを明らかにした。また、DNA メチル化非依存性、ヒストン H3K27 メチル化依存性の遺伝子サイレンシングに Dicer が関与することを示した。以上の結果より、癌のエピジェネティクス異常に関与する内因性の double strand RNA が存在することが示唆された。

また、抗ヒストン H3K4Me3 抗体でクロマチン免疫沈降した DNA を次世代シーケンサーで解析することにより、約 25,000 の新しい遺伝子転写開始点を同定した。その情報を用いて、DNA メチル化により不活化される新規 microRNA や機能性 RNA を同定した。

#### 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 52 件)

1. Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, Akashi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Sugai T, Shen L, Issa JPJ, Shinomura Y, Tokino T, Toyota M. IGFBP7 is p53 responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. *Carcinogenesis*, 31: 342-349, 2010. 査読有り.
2. Nojima M, Maruyama R, Yasui H, Suzuki H, Maruyama Y, Tarasawa I, Sasaki Y, Asaoku H, Sakai H, Hayashi T, Mori M, Imai K, Tokino T, Ishida T, Toyota M, Shinomura Y. Genomic Screening for Genes Silenced by DNA Methylation Revealed an Association between RASD1 Inactivation and Dexamethasone Resistance in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*, 15 : 4356-4364, 2009. 査読有り.
3. Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Shinomura Y, Tokino T, Imai K. Cancer Epigenomics : Implications of DNA methylation in personalized therapy. *Cancer Sci*, 100 : 787-791, 2009. 査読有り.
4. Tomita M, Toyota M, Ishikawa C, Nakazato T, Okudaira T, Matsuda T, Uchihara J, Taira N, Ohshiro K, Senba M, Tanaka Y, Ohshima K, Saya H, Tokino T, Mori N. Overexpression of Aurora a by loss of CHFR gene expression increases the growth of HTLV-1-infected T cells through enhanced NF-κB activity. *Int J Cancer*, 124 : 2607-2615, 2009. 査読有り.
5. Watanabe, Y, Kim, HS, Castoro, RJ, Chyng, W, Estecio, MR, Kondo, K, Guo, Y, Ahmed, SS, Toyota, M, Itoh, F, Suk, KT, Cho, MY, Shen, L, Jelinek, J and Issa, JP. Sensitive and specific detection of early gastric cancer using DNA methylation analysis of gastric washing. *Gastroenterol*, 136: 2149-2158, 2009. 査読有り.
6. Kashima L, Toyota M, Mita H, Suzuki H, Idogawa M, Ogi K, Sasaki Y, , Tokino T. CHFR, a potent tumor suppressor, downregulates interleukin-8 via inhibition of NF-κB. *Oncogene*, 28: 2643-2653, 2009. 査読有り.

7. Samuel MS, Suzuki H, Buchert M, Putoczki TL, Tebbutt NC, Lundgren-May T, Christou A, Inglese M, Toyota M, Heath JK, Ward RL, Waring PM, Ernst M. Elevated Dnmt3a activity promotes polyposis in ApcMin mice by relaxing extracellular restraints on Wnt signaling. *Gastroenterol*, 137: 902-913, 2009. 査読有り.
8. Goto Y, Shinjo K, Kondo Y, Shen L, Toyota M, Suzuki H, Gao Y, An B, Fujii M, Murakami H, Osada H, Taniguchi T, Usami N, Kondo M, Hasegawa Y, Shimokata K, Matsuo K, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Issa JP, Sekido Y. Characteristic epigenetic profiles of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res*, 69 : 9073-9082, 2009. 査読有り.
9. Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and BTG4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res*, 68: 4123-4132, 2008. 査読有り.
10. Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, Dohi T. DNA hypermethylation contributes incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer. *Gastroenterol*, 135: 142-151, 2008. 査読有り.
11. Ting A, Suzuki H, Cope L, Schuebel K, Lee B, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Baylin SB. A requirement for DICER to maintain full promoter CpG Island hypermethylation in human cancer cells. *Cancer Res*, 68: 2570-2575, 2008. 査読有り.
12. Sasaki Y, Ohshima Y, Koyama R, Maruyama R, Akashi H, Mita H, Toyota M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Identification of flotillin-2, a major protein on lipid rafts, as a novel target of the p53 family members. *Mol Cancer Res*, 6: 395-406, 2008. 査読有り.
13. Maruyama R, Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Yamamoto E, Nojima M, Fujikane T, Sasaki Y, Yamashita T, Watanabe Y, Hiratsuka Y, Hirata K, Itoh F, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Cytoplasmic RASSF2A is a proapoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 29: 1312-1318, 2008. 査読有り.
14. Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Suzuki H, Mita H, Toyota M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. The histone deacetylase inhibitor FK288 enhances adenovirus-mediated p53 family gene therapy in cancer models. *Mol Cancer Ther*, 7: 779-787, 2008. 査読有り.
15. Yamamoto E, Toyota M, Suzuki H, Kondo Y, Imai K, Sanomura T, Murayama Y, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Ashida M, Fujii K, Sasaki Y, Hayashi N, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in helicobacter pylori-related enlarged fold gastritis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17: 2555-2564, 2008. 査読有り.
16. Suzuki H, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M, DNA methylation and cancer pathways in gastrointestinal tumors. *Pharmacogenomics*, 9 : 1917-1928, 2008. 査読有り.
17. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez N, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR, Issa JJJ. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies colon cancer corresponding to three different subclasses of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 18654-18659, 2007. 査読有り.
18. Nishikawa N, Toyota M, Suzuki H, Homma T, Fujikane T, Ohmura T, Nishidate T, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Sonoda T, Sasaki Y, Urano T, Imai K, Hirata K, Tokino T. Gene amplification and overexpression of PRDM14 in breast cancer. *Cancer Res*, 67: 9649-9657, 2007. 査読有り.
19. Schuebel KE, Chen E, Cope Lm, Glockner SC, Suzuki H, Yi JM, Chan TA, Van Neste L, Van Criekinge W, van den Bosch S, van Engeland M, Ting AH, Jair K, Yu W, Toyota M, Imai K, Ahuja N, Herman JG, Baylin SB. Comparing the DNA hypermethylation with gene mutations in human colorectal cancer. *Plos Genet*. 3: 1709-1723, 2007. 査読有り.
20. Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Maruyama R, Kusano M, Nishikawa N, Watanabe Y, Sasaki Y, Abe T, Yamamoto E, Tarasawa I, Sonoda T, Mori M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Identification of DFNA5 as a target of

- epigenetic inactivation in gastric cancer. *Cancer Sci*, 98: 88-95, 2007. 査読有り.
21. Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, Tokino T, Mori M, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene*, 26: 4699-4713, 2007. 査読有り.
  22. Watanabe Y, Toyota M, Kondo Y, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Sasaki Y, Sekido Y, Hiratsuka H, Shinomura Y, Imai K, Itoh F, Tokino T. Expression profiling of PRDM family genes identified PRDM5 as a target of epigenetic silencing in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 13: 4786-4794, 2007. 査読有り.
  23. Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, Takagi H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M, Sonoda T, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors., *Carcinogenesis*, 28: 2459-2466, 2007. 査読有り.
  24. Ohshima Y, Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Toyota M, Yamashita T, Wada T, Nagoya S, Kawaguchi S, Yamashita T, Tokino T. Antitumor effect of adenovirus-mediated p53 family gene transfer on osteosarcoma cell lines. *Cancer Biol Ther*, 6: 1058-1066, 2007. 査読有り.
  25. Okuda H, Toyota M, Ishida W, Furihata M, Tsuchiya M, Kamada T, Tokino T, Shuin T. HOXB13 is epigenetically inactivated in human renal cell carcinoma and may be a tumor suppressor gene. *Oncogene*, 25, 1733-1742, 2006. 査読有り.
  26. Kusano M, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Aoki F, Fujita M, Hosokawa M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Genetic, epigenetic and clinicopathological features of gastric cancers with CpG island methylator phenotype and an association with Epstein-Barr virus. *Cancer*, 106, 1467-1479, 2006. 査読有り.
  27. Maruyama R, Aoki F, Toyota M, Sasaki Y, Akashi H, Mita H, Suzuki H, Akino K, Ohe-Toyota M, Maruyama Y, Tatsumi H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Comparative genome analysis identified the vitamin D receptor gene as a direct target of p53-mediated transcriptional activation. *Cancer Res*, 66: 4574-4583. 2006. 査読有り.
  28. Murai M, Toyota M, Suzuki H, Satoh A, Akino K, Mita H, Tokino T, Imai K. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 11: 1021-1027, 2005. 査読有り.
  29. Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M, Issa JP, Hinoda Y, Imai K, Tokino T. The RAS effector RASSF2 is a novel tumor suppressor in colorectal cancer. *Gastroenterol*, 129: 156-169, 2005. 査読有り.
  30. Abe T, Toyota M, Suzuki H, Murai M, Akino K, Ueno M, Nojima M, Yawata A, Miyakawa H, Suga T, Ito H, Endo T, Tokino T, Hinoda Y, Imai K. Upregulation of BNIP3 by 5-aza-2'-deoxycytidine sensitizes pancreatic cancer cells to hypoxia-mediated cell death. *J Gastroenterol* 40: 504-510, 2005. 査読有り.
  31. Toyota M, Issa JP. Epigenetic changes in solid and hematopoietic tumors. *Semin. Oncol.* 32: 521-530, 2005. 査読有り.
- [学会発表] (計 45 件)
1. Toyota M, CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. The 14th Korean-Japan Cancer Research Workshop. December 18-19, 2009, Kanazawa.
  2. Toyota M, Suzuki H, Yamamoto E, Kamimae S, Nijima M, Shinomura Y, Imai K. Colorectal cancer epigenome and clinical implication. First Guangzhou Symposium of Cancer Epigenetics and Kick-off Meeting of A3 Foresight Program and 973 Project, Nov 20-22, 2009, Guangzhou, China.
  3. Toyota M. Colorectal cancer epigenetics. 37th Meeting of International Society for Oncology and Biomarkers. Amsterdam, Netherlands, Sept, 27-30, 2009.
  4. Toyota M, Imai K. The role of epigenetic changes in cancer immunotherapy. US-Japan Workshop on Immunological Molecular Markers in

- Oncology, March 23-24, 2009, Hawaii, USA.
5. Toyota M, Imai K. Epigenetic gene silencing and microRNA in human colon cancer. Symposium, 36th Congress of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Oct 5-9, 2008, Tokyo.
  6. Toyota M, Imai K. The role of DNA methylation changes in signaling pathway. AACR Special Conference on Cancer Research: Cancer Epigenetics, May 28-31, 2008, Boston, USA.
  7. Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Tokino T, Imai K. Epigenetic silencing of genes involved in signaling pathway. Symposium, The 7th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Jan 21-25 2007, Hawaii, USA.
  8. Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Imai K. DNA methylation changes in cancer: application to diagnosis and therapy. Symposium, 34th Congress of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Sept 16-20, 2006, Pasadena, USA.

〔図書〕(計5件)

1. Suzuki H, Toyota M, Kondo Y, Shinomura Y. Inflammation-related aberrant patterns of DNA methylation: detection and role in epigenetic deregulation of cancer cell transcriptome. Methods in Mol. Biol: Inflammation and cancer. 250: pp55-pp69, Edited by Kozlov SV, Humana Press, NY, USA, 2009.
2. Toyota M, Kashima L, Tokino T. CHFR as a potential anticancer target. Cancer Drug Discovery and Development Checkpoint Response in Cancer Therapy. pp163-176, Edited by Dai W, Humana Press, NJ, USA, 2008. Total pages 314.
3. Toyota M, Suzuki H, Maruyama R, Tarasawa I, Yamamoto E, Tokino T, Imai K, Shinomura Y. The role and clinical implication of DNA methylation in gastrointestinal cancer. Recent Advances in Gastrointestinal Carcinogenesis. pp115-123, Edited by Bamba H and Ota S, Transworld Research Network, Kerala, India, 2006.

〔産業財産権〕

○出願状況(計4件)

名称: 癌の検出方法および検出用キット、ならびに癌治療剤.

発明者: 豊田 実

権利者: 札幌医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-121671

出願年月日: 2008年5月7日出願

国内外の別: 国内

名称: 乳癌および卵巣癌の治療薬、検出方法ならびに検出用キット

発明者: 豊田 実

権利者: 札幌医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2006-263232

取得年月日: 2006年9月27日出願

国内外の別: 国内

名称: 胃粘膜洗浄液を利用した疾患関連マーカー検出法.

発明者: 豊田 実

権利者: 札幌医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2006-134878

取得年月日: 2006年5月12日出願

国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: 新規遺伝子 ACMG1 のメチル化を指標とする胃癌の診断方法.

発明者: 豊田 実、株式会社ジェネティックラボ

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 4426549 号

取得年月日: 2009年12月18日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 実 (TOYOTA MINORU)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70270676

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し