

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09387

研究課題名(和文) 大腸発がんに関わるスーパーエンハンサー領域の同定とその臨床応用

研究課題名(英文) Identification of enhancer regions associated with carcinogenesis of colorectal cancer

研究代表者

原田 拓 (Harada, Taku)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60468030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸発がんに関わる重要なエンハンサー領域を同定し、そのエピゲノム異常を明らかにすることを目的とした。発がん高リスク症例の正常第腸粘膜の網羅的メチル化解析を施行し、特徴的なメチル化異常をきたすエンハンサー領域を同定した。多数の癌遺伝子を含む領域であり、このエンハンサー領域のメチル異常がこれらの癌遺伝子の発現を誘導している可能性が示唆された。多数例の解析においてもこの領域のメチル化は発がん高リスク症例と関連しており、発癌リスク予測のマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がん死を減らすためには、予防、早期発見が重要である。発癌リスクにより層別化し効率的に大腸内視鏡検査を施行し、前癌病変、早期大腸癌を同定し、内視鏡的に切除することは極めて重要である。本研究では疫学的に発がんハイリスクと考えられている症例において、癌遺伝子の発現上昇と関連するメチル化異常を同定した。メチル異常により、発がんリスクを層別化することが可能となれば大腸内視鏡検査を効率的に施行し、また大腸がんの予防、早期発見に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify enhancer regions, epigenetic alterations of which are associated with carcinogenesis of colorectal cancer (CRC). Our genome-wide methylation analysis of normal colon mucosa reveal one enhancer region increased DNA methylation level in normal colon of high risk patient of CRC. Several oncogenes were located in this region and aberrant DNA methylation was associated with expression of these genes. Our result suggest that DNA methylation of enhancer regions were useful for predicting carcinogenesis of CRC.

研究分野：消化器がん

キーワード：大腸がん メチル化 がん遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸がんの発生には、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピゲノム制御機構の破綻が重要であることが明らかとなっている。近年、スーパーエンハンサーの概念が提唱され、がん化に関わるスーパーエンハンサーの存在や、プロモドメイン阻害剤 (BET 阻害剤) によるエンハンサーを標的とした新規がん治療法の開発が注目されている。エンハンサー領域はヒストン H3 リジン 27 のアセチル化 (H3K27ac) でマークされていることが知られているが、最近、大腸がん細胞株 HCT116 を用いた解析から、スーパーエンハンサー領域では H3K27ac と DNA メチル化 (シトシンメチル化) が共存した bivalent な状態にあることが、エンハンサー機能の活性化に必要であることが報告された (Charlet et al. Mol Cell, 2016)。しかし大腸がん臨床検体におけるスーパーエンハンサー領域のエピゲノム解析は報告がなく、診断・治療への応用可能性はまだ明らかではない。

申請者らはこれまで消化器腫瘍の臨床検体を用いたゲノム・エピゲノム解析を多数行ってきた。臨床病理像との詳細な対比を行い、大腸発がん初期にエピゲノム異常が重要な役割を担うことを報告した (Am J Pathol, 2012; Am J Gastroenterol, 2012; Oncotarget, 2016)。また胃粘膜では、DNA メチル化異常の蓄積が発がん素地の形成 (epigenetic field defect) につながることでよく知られている。申請者らは胃がんリスク予測マーカーとして有用な遺伝子を同定し (Cancer Prev Res, 2012; J Gastroenterol, 2014)、その一つである miR-34b/c のメチル化はエスアールエル社から胃がんリスク診断項目として実用化されている。しかし、大腸においてそのような背景粘膜の DNA メチル化と発がんリスクとの相関ははまだ知られていない。

そこで申請者らは大腸発がんフィールド形成に関わるエピゲノム異常の探索を行い、背景正常大腸粘膜におけるヒストン H3K27 トリメチル化 (H3K27me3) が大腸腫瘍の DNA メチル化異常の pre-mark となっており、大腸がん発がんリスクを予測する分子マーカーとなり得ることを明らかにしつつある (平成 27 ~ 28 年度若手研究 B)。診断マーカーとしての実用化を目指して、微量な臨床検体からのクロマチン免疫沈降法の最適化やハイスループット化など、ヒストン解析技術のリファインに取り組んでいる。

上記のようにエピゲノム異常は大腸発がんのきわめて早期から発生し、がん化に寄与していること、そしてがん予防や超早期診断に応用しうることが示されている。しかし大腸発がん過程、特に早期の段階におけるエンハンサーの役割は明らかではない。今回我々は、大腸発がんにおいて腫瘍特異的なスーパーエンハンサーが重要な役割を担う可能性に着目した。がんおよび前がん病変の臨床検体を解析することで、腫瘍特異的なエンハンサー領域のヒストン修飾と DNA メチル化を明らかにすることができれば、大腸がんの診断マーカーおよび治療標的としての臨床応用が期待できると考え、本研究を着想するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、大腸がん発生に関わるスーパーエンハンサー領域のエピゲノム異常を明らかにし、診断マーカーおよび治療標的として臨床応用することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### 解析対象の採取および分離

下部消化管内視鏡による生検・切除、あるいは外科的に切除された大腸がん組織・前がん病変およびそれらの背景正常大腸粘膜から腺管分離法を用いて上皮細胞を分離する (Genes Chromosomes Cancer, 2013)。一部をただちにクロスリンクしてクロマチン免疫沈降 (ChIP) に用い、残りからゲノム DNA、RNA を抽出する。

#### 網羅的 DNA メチル化・遺伝子発現解析

DNA メチル化を Infinium MethylationEpic BeadChip、遺伝子発現を SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ (Agilent) を用いて解析することにより、エンハンサー領域の DNA メチル化データと遺伝子発現データを得る。

#### バイオインフォマティクス解析と候補遺伝子の抽出

TCGA、ENCODE などの公開データベースから、正常組織および大腸がんのヒストン修飾データ、DNA メチル化データ、遺伝子発現データを得る。さらに申請者らがこれまで行った臨床検体の H3K4 トリメチル化 (me3)、H3K27me3、DNA メチル化の解析データを併せ、本研究で得られたデータと統合解析する。健常者正常大腸粘膜 腫瘍背景正常大腸粘膜 前がん病変 大腸がんにおいてエピゲノムが変動する領域をリストアップする。これにより大腸腫瘍および背景正常大腸に特徴的なスーパーエンハンサー領域と、それにより制御される標的遺伝子を抽出する。

#### 多数の臨床検体を用いた検証

同定したエンハンサー領域のヒストン H3K27ac および DNA メチル化と、発がんとの関わりを検証する。多数の臨床検体を対象に ChIP-qPCR およびバイサルファイトパイロシーケンスを行う。臨床病理学的因子との相関を解析する。

#### 4. 研究成果

大腸がん高リスク群として大腸鋸歯状病変が多発する Serrated polyposis syndrome (SPS) が知られており、SPS 症例は 5 年間のフォローアップ期間中に約 35% が大腸がんを発症すると報告されている (Boparai et al. Gut, 2010)。このことから、SPS 症例に対しては 1~2 年ごとの内視鏡サーベイランスが推奨されている。さらに SPS 診断基準を満たさないが、鋸歯状病変を有する症例 (非 SPS) もまた大腸がんリスクが高いと報告されている (Egoavil et al. Gastroenterology, 2017)。

我々はまず、当施設における SPS、非 SPS 症例の臨床病理学像について検討した。2015 年 1 月から 2016 年 12 月までの期間に全大腸内視鏡検査を施行した 6546 症例のうち、SPS 群は 166 症例 (2.54%)、非 SPS 群は 1142 症例 (17.4%) であり、鋸歯状病変を有する症例は全体の 20.0% であった。大腸癌の担癌率は、SPS 群で 29.5% であった。一方、非 SPS 群の担癌率は 23.4% であり、両群の担癌率には統計学的な有意差を認めなかった。SPS 群、非 SPS 群共に担がん率は鋸歯状病変を有しない患者群 (17.5%, 909/5184) と比べて有意に高かった。さらに、急速に発育進展したと考えられる、いわゆるインターバル大腸がんのうち約 40% は鋸歯状病変を有していた。これらの結果は、SPS と非 SPS の両方において鋸歯状病変は大腸がんリスクと強く相関することを示している。

次に我々は、多発鋸歯状病変の背景粘膜に特徴的な DNA メチル化異常を探索した。非 SPS と鋸歯状病変を有しない患者の正常大腸粘膜を用いて網羅的メチル化解析を施行した。Infinium Methylation BeadChip を用いて解析、比較検討した。がん促進的に働くことや、胆汁酸代謝に関わることが報告されている遺伝子 A のイントロン領域の異常メチル化が非 SPS で認めることを明らかとした。H3K27 アセチル化の ChIP シークエンスと統合したところ、大腸がん細胞において同領域に H3K27 アセチル化のピークを認めエンハンサー領域であることが確認された。またこの遺伝子座は様々ながんにおいて増幅や過剰発現が報告されており、またがん遺伝子 B の発現に關与していることが明らかとなった。

多数検体を用いた検証を行なった。このエンハンサー領域の DNA メチル化を大腸腫瘍および背景粘膜で解析した。その結果、SPS 症例 (BRAF 変異 / CIMP 陽性) は非 SPS 症例と比較してメチル化が有意に上昇していた。さらに SPS 症例と非 SPS 症例の正常大腸粘膜における、がん遺伝子 B の発現解析結果。メチル化と発現の逆相関を認めた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Harada Taku, Yamamoto Eiichiro, Yamano Hiro-o, et al.	4. 巻 53
2. 論文標題 Surface microstructures are associated with mutational intratumoral heterogeneity in colorectal tumors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1241 ~ 1252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-018-1481-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoki Hironori, Yamamoto Eiichiro, Yamano Hiro-o, Sugai Tamotsu, Kimura Tomoaki, Tanaka Yoshihito, Matsushita Hiro-o, Yoshikawa Kenjiro, Takagi Ryo, Harada Eiji, Nakaoka Michiko, Yoshida Yuko, Harada Taku, et al.	4. 巻 63
2. 論文標題 Subtypes of the Type II Pit Pattern Reflect Distinct Molecular Subclasses in the Serrated Neoplastic Pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 1920 ~ 1928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10620-018-5016-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kai M, Yamamoto E, Sato A, Yamano HO, Niinuma T, Kitajima H, Harada T, Aoki H, Maruyama R, Toyota M, Hatahira T, Nakase H, Sugai T, Yamashita T, Toyota M, Suzuki H.	4. 巻 56
2. 論文標題 Epigenetic silencing of diacylglycerol kinase gamma in colorectal cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Carcinog.	6. 最初と最後の頁 1743-1752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mc.22631.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niinuma T, Kai M, Kitajima H, Yamamoto E, Harada T, Maruyama R, Nobuoka T, Nishida T, Kanda T, Hasegawa T, Tokino T, Sugai T, Shinomura Y, Nakase H, Suzuki H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Downregulation of miR-186 is associated with metastatic recurrence of gastrointestinal stromal tumors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 5703-5710.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.6911.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoki H, Yamamoto E, Takasawa A, Niinuma T, Yamano H0, Harada T, Matsushita H0, Yoshikawa K, Takagi R, Harada E, Tanaka Y, Yoshida Y, Aoyama T, Eizuka M, Yorozu A, Kitajima H, Kai M, Sawada N, Sugai T, Nakase H, Suzuki H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Epigenetic silencing of SMOC1 in traditional serrated adenoma and colorectal cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 4707-4721.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.23523.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoki H, Yamamoto E, Yamano H0, Sugai T, Kimura T, Tanaka Y, Matsushita H0, Yoshikawa K, Takagi R, Harada E, Nakaoka M, Yoshida Y, Harada T, Sudo G, Eizuka M, Yorozu A, Kitajima H, Niinuma T, Kai M, Nojima M, Suzuki H, Nakase H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Subtypes of the Type II Pit Pattern Reflect Distinct Molecular Subclasses in the Serrated Neoplastic Pathway.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dig Dis Sci.	6. 最初と最後の頁 Epub ahead
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-018-5016-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山本 英一郎  (Yamamoto Eiichiro)  (60567915)	札幌医科大学・医学部・講師   (20101)	