

平成 21 年 5 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590761

研究課題名（和文）肝疾患における遺伝子プロモーターのメチル化不安定性の解析とその臨床応用

研究課題名（英文）Analysis of epigenetic instability of liver disease at promoter of cancer-related gene and their clinical implication

研究代表者

西田 直生志 (NISHIDA NAOSHI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60281755

研究成果の概要：

ヒト肝臓で異常メチル化が報告されている 19 種類の遺伝子座位に関して、正常肝、各種の慢性肝炎組織、肝臓の前癌病変、肝臓組織のメチル化レベルを定量し、肝臓癌の初期に重要と思われる 7 種類の遺伝子座位を選び出した。これらの遺伝子座位のメチル化は前癌病変で肝臓と同程度のレベルのメチル化が認められ、また高発癌母地であるウイルス性肝炎組織でも低レベルながらメチル化が認められたが、発癌リスクの少ない PBC の組織ではメチル化が認められなかった。またインターフェロン治療による肝炎ウイルスの消失後、数年の経過でそのメチル化も改善（消失）していた。従って、これらの遺伝子メチル化は肝臓癌の初期に重要であり、その消失は発癌リスクの低下につながると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓病、肝臓癌、癌抑制遺伝子、エピジネティクス、慢性肝炎

1. 研究開始当初の背景

本邦において、ウイルス性慢性肝炎は肝臓の主要な発癌母地であり、特に C 型肝炎ウイルス(HCV)キャリアーは 200 万人以上と推定されている。さらに、近年、非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis: NASH)も肝臓の発癌母地として注目されており、NASH の危険因子とみなされる肥満、

脂肪肝、糖尿病を持つ人口が本邦でも急増していることより、今後も肝疾患患者のなかで、肝臓癌リスクの高い群を絞り込み、発癌を効果的に予防することは重要である

肝臓癌過程においては、癌遺伝子/癌抑制遺伝子の突然変異、染色体コピー数の変化(染色体不安定性)、遺伝子プロモーターの異常メチル化(メチル化不安定性)などが癌化に寄与すると考えられている。この中で、メチル

化不安定性は癌化の初期段階で認められることより、メチル化の変化を検出することは、肝癌リスクを評価する上で有力な手段と成り得る。さらに、遺伝子メチル化は点突然変異や染色体/遺伝子コピー数の変化などの遺伝子構造の変化とは異なり、可逆的な変化であるため肝癌の予防にも応用可能である

本研究の申請者は、肝癌でメチル化の異常が報告されている 21 座位 (18 種の遺伝子のプロモーター及び 3 種の MINT 座位: *methylation in tumor*) のメチル化レベルを、肝癌組織を用いて詳細に検討、定量し、癌部において有意にメチル化レベルの高い 19 座位を抽出した。一方、ウイルス感染や慢性炎症は遺伝子の異常メチル化のリスクとなることが知られている。従って、ウイルス性慢性肝炎は背景に出現する本邦の肝癌では、HCV 感染とそれに伴う慢性炎症がそれぞれ単独に、あるいは協調してメチル化不安定性を誘導し肝発癌に寄与することが想定される。また、ウイルス陰性の慢性肝炎でも自己免疫性肝炎(AIH)や原発性胆汁性肝硬変(PBC)は肝癌のリスクは低いのに対して、NASHやヘモクロマトーシスは肝癌の高リスク群であり、慢性肝炎のメチル化のプロファイリングは疾患毎に異なると予想される。そこで、各種の慢性肝疾患におけるメチル化のプロファイリングを知ることは、将来の発癌を予測するうえで必須の情報であると考えられるため、本研究を開始した。

2. 研究の目的

1) 各種の慢性肝臓疾患組織におけるメチル化のプロファイリング:

慢性肝疾患は発癌リスクの高い病態 (ウイルス性肝炎) とリスクの低い病態 (AIHやPBC) に大別できる。肝癌で認められる遺伝子座位の高レベルのメチル化は、その周辺の非癌部組織でも低レベルに認められるものが多いとの報告があり、これらの座位のメチル化は癌化に寄与することが予想される。そこで本研究では、慢性肝疾患の中で、発癌にリスクの高い病態とリスクの低い病態でメチル化のプロファイリングがどのように異なっているかを明らかにする。

2) 前癌病変におけるメチル化の程度の検討:

前述のようにHCV陽性肝癌患者の非癌部では、同年齢の組織学的正常肝と比較して、(癌化に関わるとされる) 遺伝子座位でのメチル化のレベルは有意に高いものが多く認められた。そこでこれらのメチル化は癌化早期のイベントであると予想できるが、これを明確に証明するため、肝癌の前癌病変と考

えられる、*dysplastic nodule*、大型再生結節、及び高分化肝癌を用いて、各遺伝子座位でのメチル化のレベルが上昇しているかどうかを検討する。

3) 慢性ウイルス性肝炎治療前後のメチル化の変化:

現在、約半数の慢性C型肝炎はインターフェロンと抗ウイルス剤 (リバビリン) にてウイルスの消失が期待でき、そのような群では発癌リスクが大幅に低下する。そこでインターフェロン治療前後で慢性C型肝炎組織に認められるメチル化が改善するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

1) 慢性肝疾患組織の収集:

組織学的に確認された各細維化ステージの慢性肝炎組織、さらに慢性C型肝炎でインターフェロン治療前後の肝組織のパラフィンブロックを収集する。パラフィンブロックの大部分は既存のアーカイブを利用する。

2) 肝癌前癌病変の収集:

組織学的に確認された*dysplasia*、高分化肝癌、中-低分化肝癌のパラフィンブロックを収集する。パラフィンブロックの大部分は既存のアーカイブが利用可能であり、足りない部分は新たに凍結肝組織を収集する。

3) パラフィンブロックからのDNAの抽出、*bisulfite*処理とメチル化の定量:

各パラフィンブロックよりDNAを抽出し (TAKARA DEXPATを使用)、COBRAを用いて19座位のメチル化を定量する。具体的にはDNAの*bisulfite*処理を施行後、CpGを含まない領域に設定したプライマーで目的とする領域を増幅した後 (すなわちメチル化がある*allele*も、ない*allele*も増幅される)、適当な制限酵素でPCR産物を切断する (メチル化がない*allele*はシトシンがチミンに変換されるため制限酵素部位がなくなり切断されない)。その後アガロース電気泳動にて、制限酵素で切断された*allele*の割合 (メチル化を受けている*allele*の割合) を定量する。

4) メチル化の定量値を用いたデータの解析:

慢性肝疾患の内、発癌リスクの高い病態 (ウイルス性肝炎) とリスクの低い病態 (AIH, PBC) の間でメチル化プロファイルにどのような差があるかを検討する。この2群の慢性肝疾患において、メチル化レベルに差がみとめられた座位は肝発癌に密接に関連している可能性が高い。同様に、慢性C型肝炎の肝組織において、インターフェロン治療前後でのこ

これらのCpG座位メチル化プロファイルの差を解析する。

肝癌の前癌病変でのメチル化プロファイルを検討する。これらの情報から、どの遺伝子座位のメチル化の変化が肝癌発生のリスクの予測に有為であるかを検討する。これは肝癌発生のリスクを予測するメチル化DNAチップの開発に必須の情報となる。

3. 研究成果

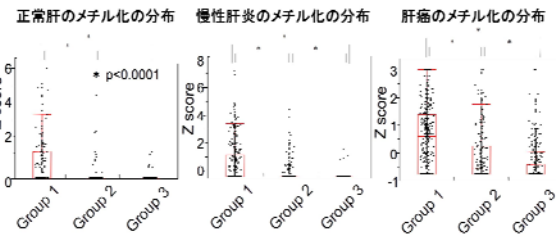
まず組織学的な正常肝、慢性肝疾患組織、肝癌の各ステージの肝組織を用い、以下の表1に示す CpG 座位のメチル化レベルを定量した。

表 1

遺伝子座位	位置	機能
CDH1	16q22	Cell adhesion
APC	5q21-q22	Regulator of Wnt path.
SFRP 2	4q31.3-32.1	Regulator of Wnt path.
SOCS1	16q13.13	Suppressor of JAK/STAT path.
RUNX3	1p36.12-36.11	Regulator of TGF- β path.
CASP8	2q33-q34	Apoptosis
GSTP1	11q13	Glutathione transferase, metabolism
RASSF1A	3p21.3	Suppressor of Ras path. regulation of APC/C
RASSF2	20pter-p12.2	Suppressor of Ras path.
p16	9p21	Cell cycle inhibitor, Regulator of Rb path.
DCC	18q21.3	Netrin receptor
CACNA1G	17q22	T type calcium channel/Ca dependent signaling, cell death
COX2	1q25.2-q25.3	prostaglandin synthesis
HIC1	17p13.3-13.2	Maintain p53 path./suppressor of SIRT1
Reprimo	2q23.3	P53 dependent G2 arrest
RIZ1	1p36.21	Binding to Rb
MINT1	5q13	MINT locus
MINT2	2p16	MINT locus
MINT31	17q21	MINT locus

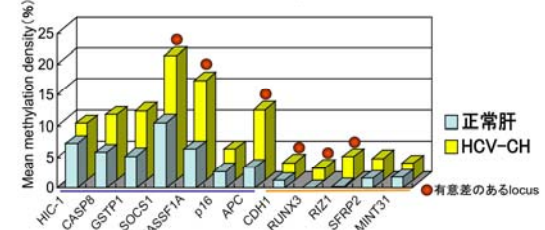
それらのメチル化の状態より、前述の遺伝子座位を3グループ (Group-1, -2, -3) に分類した。すなわち正常肝、非癌部肝組織、肝癌でいずれもメチル化が認められる CpG 座位を Group-1 座位 (APC, HIC-1, RASSF1A, GSTP1, CASP8, SOCS-1, p16)、正常肝ではメチル化が認められないが、非癌部肝組織、肝癌でメチル化が認められる座位を Group-2 (RIZ1, RUNX3, CDH1, MINT31, SFRP2)、肝癌で特異的にメチル化を受けている座位を Group-3 (MINT1, MINT2, COX2, CACNA1G, RASSF2, Reprimo, DCC) と分類した (図1)。

図1



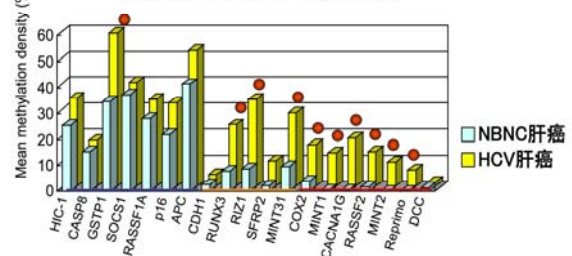
非癌部肝組織では、正常肝と比較し Group-2 のみならず Group-1 のメチル化レベルも高値であった。特に3種の Group-1 座位 (*SOCS1*, *RASSF1A*, *APC*) と3種の Group-2 座位 (*CDH1*, *RUNX3*, *RIZ1*) では HCV 陽性の非癌部において、正常肝より有意にメチル化レベルが高値であった。

図2: 正常肝とHCV陽性非癌部の間でのメチル化レベルの比較



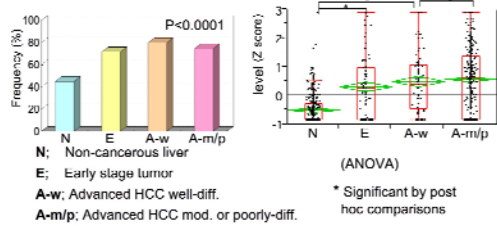
一方 HBV 陽性肝癌では 1 座位 (*SOCS1*) のみで正常肝と比較してメチル化レベルが高く、ウイルス陰性の非癌部では正常肝と比較してメチル化が高い座位は認められなかった。肝癌部ではすべての座位において高レベルのメチル化が認められたが、HCV 陽性肝癌では、陰性例と比較し Group-3 座位でのメチル化レベルが有意に高く (図3)、HCV 感染は非癌部肝組織におけるメチル化の進行に関与し、メチル化不安定性に関わると予想できた。さらに、PBC の肝組織では p16 を始めとした癌抑制遺伝子のメチル化は認められず、ウイルス陰性の肝癌は HCV 陽性肝癌と比較して低いメチル化レベルを示した。

図3: HCV陽性肝癌とウイルス陰性(NBNC)肝癌の間でのメチル化レベルの比較



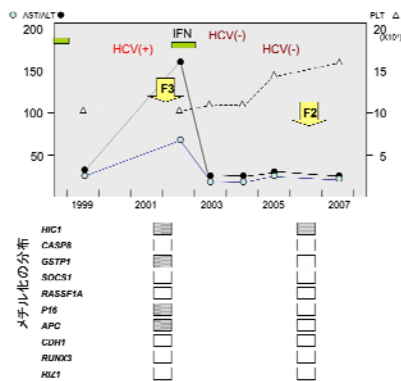
Group-1 の CpG 座位のメチル化は前癌病変である dysplastic nodule や 2cm 以下の高分化肝癌でも認められ、また前述の様にウイルス慢性肝炎の組織でも認められるため (図4) 発癌初期のイベントと考えられた。

図4 各段階の肝腫瘍におけるGroup1のCpG座位のメチル化



そこで、インターフェロンによりウイルス消失が得られた症例について、インターフェロン治療前と治療2年後の肝生検組織よりGroup-1のCpG座位のメチル化の分布の変化を検討したところ、インターフェロン治療後の肝組織においてメチル化の改善が認められた(図5)

図5 IFN治療後での遺伝子メチル化の改善



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)

- ① Naoshi Nishida, et al. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 48, 908-918, 2008年、有
- ② Naoshi Nishida, et al. Extensive methylation tightly associates with β -catenin mutations in hepatocellular carcinoma: evidence for two distinct pathways of human hepatocarcinogenesis. *Cancer Research*, 67, 4586-4594, 2007年、有
- ③ Naoshi Nishida, et al. High copy amplification of Aurora-A is associated with chromosomal instability phenotype in human colorectal cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 6, 525-533, 2007年、有

[学会発表] (計9件)

- ① 西田 直生志、肝発癌における染色体不安定性とメチル化不安定性の関わり、第

21回肝臓フォーラム(西部)、2009年3月7日、大阪

- ② 西田 直生志、肝組織における癌関連遺伝子プロモーターメチル化の定量的解析、第16回浜名湖シンポジウム シンポジウム-消化器疾患における translational Research、2008年12月20日、浜松

- ③ Naoshi Nishida、Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. APASL Meeting. 2008 Asian Hepatitis Forum: Basic Research. 2008年12月13日、Seoul, Korea

- ④ Naoshi Nishida et al.、Progression of aberrant methylation in multiple cancer-related genes in HCV-related hepatocarcinogenesis. 第67回日本癌学会総会 English Workshops 3: Hepatocellular, 2008年10月28日、名古屋

- ⑤ Naoshi Nishida et al.、Sequential progression of aberrant methylation in cancer-related genes in various stages of human hepatocarcinogenesis. 78th Digestive Disease Week (DDW): AASLD Presidential Plenary, 2008年5月18日、San Diego CA

- ⑥ 西田 直生志 他、大腸癌におけるCDC4-サイクリンE経路の破綻と染色体不安定性、第15回日本消化器関連学会週間(第49回日本消化器病学会大会)、2007年10月18日、神戸

- ⑦ 西田 直生志 他、ヒト肝細胞癌における染色体不安定性、メチル化不安定性と癌関連遺伝子変異の相関、第66回日本癌学会総会 ワークショップ9: Epigenetics、2007年10月4日、横浜

- ⑧ 西田 直生志 他、肝発癌における染色体不安定性とメチル化不安定性、第43回日本肝臓学会総会 ワークショップ5: 肝発癌の分子機序、第43回日本肝臓学会総会 ワークショップ5: 肝発癌の分子機序、2007年5月31日、東京

- ⑨ Naoshi Nishida et al.、Genetic instability and epigenetic instability in human hepatocarcinogenesis. 77th Digestive Disease Week (DDW): AASLD Topic Forum、2007年5月20日、Washington D.C

[図書] (計3件)

- ① 西田 直生志、医学書院、肝疾患に認められる遺伝子メチル化の進行とHCVの関与。消化器病学の進歩-原点から未来への情報発信、II-肝胆膵領域。第94回日本消化器病学会総会記念誌、2008年、

印刷中

- ② 西田 直生志、アークメディア、消化器疾患におけるtranslational Research;肝組織における癌関連遺伝子プロモーターメチル化の定量的解析、2008年、103-105
- ③ Naoshi Nishida、Research Media、Current Research in Cancer 1:Chromosomal instability and epigenetic instability in human hepatocacinogenesis、2007年、99-115

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 直生志 (NAOSHI NISHIDA)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60281755

(2) 研究分担者

福田 善弘 (FUKUDA YOSHIHIRO)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：50127130
西村 貴文 (NISHIMURA TAKAFUMI)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40378732

(3) 連携研究者