

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07457

研究課題名(和文) マイクロサテライト不安定性胃癌におけるゲノム・エピゲノム異常の相互作用と本態解明

研究課題名(英文) Clarification of genome/epigenome interaction in microsatellite instable gastric cancer

研究代表者

松坂 恵介 (Matsusaka, Keisuke)

千葉大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40610150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌臨床検体におけるDNAメチル化の網羅的解析と遺伝子変異解析により、マイクロサテライト不安定性(MSI)陽性胃癌には高DNAメチル化形質と高変異型形質が確認された。遺伝子変異にはRASの活性型変異とTGF $\beta$ 経路の不活化変異が認められた。一方、TP53に遺伝子変異は認められなかった。RAS活性型モデルを導入した線維芽細胞に対するshRNAを用いた網羅的スクリーニングにより、TP53非依存的な早期細胞老化に寄与する候補遺伝子の抽出に成功した。TP53野生型癌細胞に抗腫瘍効果を発揮する化合物を同定し、野生型TP53を利用した治療戦略の可能性を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSI陽性胃癌は多くの遺伝子にDNAメチル化と変異を伴っていることから、これまで機能的な意義づけが十分にされていなかった。本解析によりDNAメチル化と遺伝子変異による相乗効果が確認され、TP53変異とは独立した早期細胞老化に寄与する遺伝子の同定に成功した。また、野生型TP53を有する癌細胞の解析により、TP53下流の経路は保たれており、野生型TP53を利用した治療戦略が構築できる可能性が得られた。これは胃癌のみならず多種多様な腫瘍にも応用可能である潜在性を有しており、今後の展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Microsatellite instability (MSI)-positive gastric cancer (GC) showed high DNA methylation epigenotype and highly mutated phenotype via the comprehensive DNA methylation analysis and target-exome sequencing analysis. The gene mutation in MSI-positive GC was found in RAS-related genes and TGF $\beta$  signaling pathway-related genes, whereas TP53 had no mutation. The genes contributing to premature senescence in a TP53-independent manner were successfully extracted by genome-wide screening using the shRNA library. We identified chemical compounds to exert antitumor effects in TP53 wild-type cancer cells. This result suggested the possibility of novel therapeutic strategies using wild-type TP53.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス 胃癌 遺伝子変異 早期細胞老化 TP53

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌は分子基盤に基づいていくつかのサブグループに分類される。その中でも DNA メチル化と遺伝子変異が高度に蓄積した一群である DNA ミスマッチ修復機構の破綻を伴ったマイクロサテライト不安定性(MSI)陽性胃癌に着目した。MSI 陽性胃癌は多数の遺伝子異常が蓄積しているが、特に DNA メチル化と遺伝子変異の相互作用については不明な点が多い。また、MSI 陽性胃癌は *TP53* に変異を伴うことが少ないが、その意義についてはよく分かっていない。

## 2. 研究の目的

MSI 陽性胃癌の本態解明を目的とし、MSI 陽性胃癌に共通した遺伝子異常を抽出し、特に遺伝子変異と DNA メチル化との相互作用について検討する。具体的には RAS 誘導性早期細胞老化モデルを用い、shRNA ライブラリーにて早期細胞老化に寄与する遺伝子の抽出とその機能解析を行う。また、また、野生型 *TP53* の意義づけと、野生型 *TP53* を利用した新規治療戦略の構築を小分子化合物を用いて展開する。

## 3. 研究の方法

### (1) 胃癌における DNA メチル化・遺伝子変異解析

網羅的 DNA メチル化解析:胃癌臨床検体 39 例に対して、Infinium 450k (Illumina 社)を用い、DNA メチル化の解析を行う。-value を用いて 2 方向性階層的クラスター解析を行う。そこから DNA メチル化形質に基づいた DNA メチル化形質(epigenotype)を決定する。

パイロシーケンス法:epigenotype を特徴づける DNA メチル化マーカー遺伝子を抽出する。パイロシーケンス法のプライマーを設計し、胃癌臨床検体 48 例に対して DNA メチル化解析を行い、epigenotype を決定する。

遺伝子変異解析:epigenotype を決定した胃癌症例に対して HaloPlex target enrichment system (Agilent 社)にて 113 個の癌関連遺伝子の遺伝子変異を解析する。

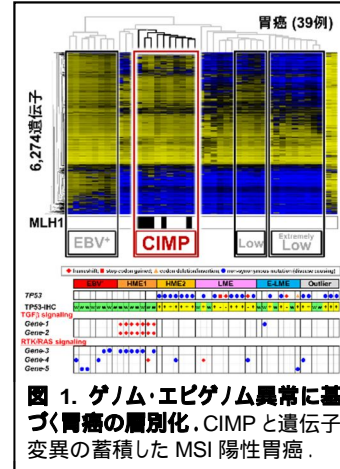
### (2) *TP53* 非依存的な RAS 誘導性早期細胞老化回避機構の解明

shRNA ライブラリーを用いたスクリーニング:タモキシフェンによる活性化 RAS 誘導システムを構築した線維芽細胞(WI-39・IMR-90)を用いる。全遺伝子を標的とした shRNA ライブラリー導入下に活性化 RAS を誘導し、細胞老化を回避した細胞から DNA を抽出、次世代シーケンサーにより shRNA 標的配列を決定する。抽出した遺伝子と、胃癌臨床検体のゲノム・エピゲノム解析により不活化を受けている遺伝子を比較し、候補遺伝子を選択する。候補遺伝子の shRNA を作製し、陽性対照 sh*TP53*、陰性対照 shNON (non-target)を置き、発現抑制による細胞老化回避時の RNA を抽出する。遺伝子発現を次世代シーケンサーを用いた RNA-seq にて網羅的に解析し、sh*TP53* と候補因子との遺伝子発現を比較検討し、*TP53* とは異なる発現様式を検証する。

化合物を用いた *TP53* 経路の検証:*TP53* 非依存的な経路を証明するためには、MSI 陽性胃癌細胞において *TP53* の下流経路が保たれていることを証明する必要がある。*TP53* が野生型の癌細胞に *TP53* 依存的なアポトーシスを誘導する化合物を見出し、化合物投与後の遺伝子発現を RNA-seq により解析し、*TP53* 関連遺伝子の発現が変動する場合は下流経路の保存の傍証と判断する。

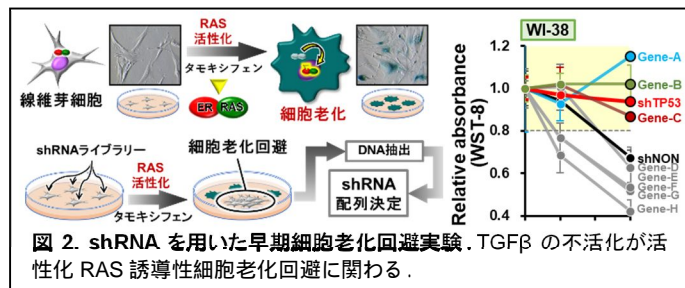
#### 4. 研究成果

(1) Infinium 450k を用いた DNA メチル化の網羅的解析の結果、胃癌は大きく 4 つの DNA メチル化形質(epigenotype)に分類されることが示された(図 1)。際立って DNA メチル化の亢進した一群(Extremely high-methylation epigenotype (E-HME))は例外なく Epstein-Barr virus (EBV)感染を伴った EBV 陽性胃癌であることが再確認された。プロモーター以外に Gene body 領域、Itergenic 領域についても同様の解析を行ったが、EBV 陽性胃癌は同様に E-HME 形質を示した。E-HME は EBV 陽性胃癌由来の細胞株 SNU710 と xenograft である KT でも確認され、周囲間質のリンパ球などの変化ではなく腫瘍細胞そのものによる形質であることが示された。EBV 陽性胃癌以外で高メチル化形質を示す一群(high-methylation epigenotype (HME))はマイクロサテライト不安定性(Microsatellite Instability (MSI))陽性胃癌と陰性胃癌とが含まれていた。非腫瘍性胃粘膜上皮と同程度の極めて DNA メチル化の少ない一群(Extremely low-methylation epigenotype (E-LME))は他のサブグループと比較して予後が悪いことが示された。



(2) 遺伝子解析の結果、MSI 陽性胃癌に高頻度に RAS の活性化型変異が確認された。また、EBV 陽性胃癌の一部にも同様に RAS 変異が認められた。一方、これら高 DNA メチル化形質を示す MSI 陽性胃癌と EBV 陽性胃癌に TP53 変異は確認されなかった。TP53 はアポトーシス抑制とともに早期細胞老化誘導機構にも中心的な役割を果たしており、RAS 変異と野生型 TP53 の共存から、TP53 とは独立した早期細胞老化回避機構が存在する可能性が示唆された。

(3) タモキシフェンによる活性化 RAS 誘導システムを構築した線維芽細胞 (WI-39・IMR-90) に対して shRNA ライブラリー感染下での早期細胞老化を回避した細胞から DNA を抽出し、Miseq にて shRNA の標的配列を同定、スクリーニング



した。結果、9 個の候補遺伝子が見出された(図 2)。陽性コントロールとして TP53・CDKN2A (p16)を置いて、個別に WI-39・IMR-90 に対して早期細胞老化の回避を確認したところ、2 つの遺伝子が確認された。

(4) 早期細胞老化に関わっていると考えられる候補遺伝子に対する shRNA 作用時における遺伝子発現を RNA-seq 法にて解析した。その結果、候補遺伝子は TP53 とは異なる遺伝子発現パターンを呈しており、TP53 とは独立した早期細胞老化機構の存在がうかがわれた。

(5) TP53 野生型の胃癌細胞株に対して抗腫瘍効果を発揮する化合物について検討した結果、TP53 野生型細胞に対してはアポトーシスを誘導するのに対して、TP53 変異型細胞に対しては効果が乏しかった。RNA-seq 法にて遺伝子発現を解析したところ、TP53 野生型細胞ではアポトーシス経路の遺伝子発現に変化が認められる一方、TP53 変異型細胞では発現変化が乏しかった。以上の結果より、TP53 野生型細胞における TP53 下流経路は保たれており、何らかの機序で TP53 の機能が抑制されている可能性が考慮された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurokawa Tomoya, Nakagawa Takuya, Matsusaka Keisuke, Fukuyo Masaki, Mima Masato, Misawa Kiyoshi, Rahmutulla Bahityar, Ikeda Jun ichiro, Hanazawa Toyoyuki, Okamoto Yoshitaka, Kaneda Atsushi	4. 巻 111
2. 論文標題 Establishment of epigenetic markers to predict irradiation efficacy against oropharyngeal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1407 ~ 1416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14338	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 Nakagawa Takuya, Matsusaka Keisuke, Misawa Kiyoshi, Ota Satoshi, Fukuyo Masaki, Rahmutulla Bahityar, Kunii Naoki, Sakurai Daiju, Hanazawa Toyoyuki, Matsubara Hisahiro, Okamoto Yoshitaka, Kaneda Atsushi	4. 巻 146
2. 論文標題 Stratification of HPV associated and HPV negative oropharyngeal squamous cell carcinomas based on DNA methylation epigenotypes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2460 ~ 2474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32890	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 Asakawa Yuta, Okabe Atsushi, Fukuyo Masaki, Li Wenzhe, Ikeda Eriko, Mano Yasunobu, Funata Sayaka, Namba Hiroe, Fujii Takahiro, Kita Kazuko, Matsusaka Keisuke, Kaneda Atsushi	4. 巻 111
2. 論文標題 Epstein Barr virus positive gastric cancer involves enhancer activation through activating transcription factor 3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1818 ~ 1828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14370	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 Sata Yuki, Nakajima Takahiro, Fukuyo Masaki, Matsusaka Keisuke, Hata Atsushi, Morimoto Junichi, Rahmutulla Bahityar, Ito Yuki, Suzuki Hidemi, Yoshino Ichiro, Kaneda Atsushi	4. 巻 111
2. 論文標題 High expression of CXCL14 is a biomarker of lung adenocarcinoma with micropapillary pattern	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2588 ~ 2597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14456	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 Okabe Atsushi, Huang Kie Kyon, Matsusaka Keisuke, Fukuyo Masaki, Xing Manjie, Ong Xuewen, Hoshii Takayuki, Usui Genki, Seki Motoaki, Mano Yasunobu, Rahmutulla Bahityar, Kanda Teru, Suzuki Takayoshi, Rha Sun Young, Ushiku Tetsuo, Fukayama Masashi, Tan Patrick, Kaneda Atsushi	4. 巻 52
2. 論文標題 Cross-species chromatin interactions drive transcriptional rewiring in Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 919 ~ 930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-020-0665-7	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 Fukayama M, Abe H, Kunita A, Shinozaki-Ushiku A, Matsusaka K, Ushiku T, Kaneda A.	4. 巻 476
2. 論文標題 Thirty years of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Arch	6. 最初と最後の頁 353-365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-019-02724-4	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 Hata A, Nakajima T, Matsusaka K, Fukuyo M, Morimoto J, Yamamoto T, Sakairi Y, Rahmutulla B, Ota S, Wada H, Suzuki H, Matsubara H, Yoshino I, Kaneda A.	4. 巻 146
2. 論文標題 A low DNA methylation epigenotype in lung squamous cell carcinoma and its association with idiopathic pulmonary fibrosis and poorer prognosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Cancer	6. 最初と最後の頁 388-399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32532	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 Hata Atsushi, Suzuki Hidemi, Nakajima Takahiro, Fujiwara Taiki, Shiina Yuki, Kaiho Taisuke, Toyoda Takahide, Inage Terunaga, Ito Takamasa, Sakairi Yuichi, Tamura Hajime, Wada Hironobu, Yamada Yoshito, Chiyo Masako, Matsusaka Keisuke, et.al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Differential gene analysis during the development of obliterative bronchiolitis in a murine orthotopic lung transplantation model: A comprehensive transcriptome-based analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0232884	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 Yamamoto Yosuke, Matsusaka Keisuke, Fukuyo Masaki, Rahmutulla Bahityar, Matsue Hiroyuki, Kaneda Atsushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Higher methylation subtype of malignant melanoma and its correlation with thicker progression and worse prognosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 7194 ~ 7204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3127	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 Muroyama Yuki, Tamiya Hiroyuki, Tanaka Goh, Tanaka Wakae, Huang Alexander C., Oldridge Derek A., Matsusaka Keisuke, Takazawa Yutaka, Jo Taisuke, Ushiku Tetsuo, Nagase Takahide	4. 巻 13
2. 論文標題 Alpha-Fetoprotein-Producing Lung Hepatoid Adenocarcinoma with Brain Metastasis Treated with S-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case Reports in Oncology	6. 最初と最後の頁 1552 ~ 1559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000511763	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 Usui Genki, Matsusaka Keisuke, Mano Yasunobu, Urabe Masayuki, Funata Sayaka, Fukayama Masashi, Ushiku Tetsuo, Kaneda Atsushi	4. 巻 102
2. 論文標題 DNA Methylation and Genetic Aberrations in Gastric Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 25 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000511243	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 Hata Atsushi, Nakajima Takahiro, Matsusaka Keisuke, Fukuyo Masaki, Nakayama Manabu, Morimoto Junichi, Ito Yuki, Yamamoto Takayoshi, Sakairi Yuichi, Rahmutulla Bahityar, Ota Satoshi, Wada Hironobu, Suzuki Hidemi, Iwata Takekazu, Matsubara Hisahiro, Ohara Osamu, Yoshino Ichiro, Kaneda Atsushi	4. 巻 148
2. 論文標題 Genetic alterations in squamous cell lung cancer associated with idiopathic pulmonary fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 3008 ~ 3018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33499	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 Maimaiti Maihulan, Sakamoto Shinichi, Sugiura Masahiro, Kanesaka Manato, Fujimoto Ayumi, Matsusaka Keisuke, Xu Minhui, Ando Keisuke, Saito Shinpei, Wakai Ken, Imamura Yusuke, Nakayama Keiichi, Kanai Yoshikatsu, Kaneda Atsushi, Ikehara Yuzuru, Ikeda Jun-Ichiro, Anzai Naohiko, Ichikawa Tomohiko	4. 巻 11
2. 論文標題 The heavy chain of 4F2 antigen promote prostate cancer progression via SKP-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-90748-9	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 Li Wenzhe, Okabe Atsushi, Usui Genki, Fukuyo Masaki, Matsusaka Keisuke, Rahmutulla Bahityar, Mano Yasunobu, Hoshii Takayuki, Funata Sayaka, Hiura Nobuhiro, Fukayama Masashi, Tan Patrick, Ushiku Tetsuo, Kaneda Atsushi	4. 巻 112
2. 論文標題 Activation of EHF via STAT3 phosphorylation by LMP2A in Epstein Barr virus-positive gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3349 ~ 3362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14978	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 Kimura Kenji, Tsukamoto Shokichi, Miyazaki Kanji, Kawajiri-Manako Chika, Ishii Arata, Rahmutulla Bahityar, Fukuyo Masaki, Oshima-Hasegawa Nagisa, Mitsukawa Shio, Takeda Yusuke, Mimura Naoya, Takeuchi Masahiro, Ohwada Chikako, Iseki Tohru, Matsusaka Keisuke, et.al.	4. 巻 101-102
2. 論文標題 Identification of clonal immunoglobulin light-chain gene rearrangements in AL amyloidosis using next-generation sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 34 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2021.08.001	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 Kouchi Yusuke, Yamashita Kazushi, Harada Sakurako, Shinomiya Yoshiki, Mishima Takashi, Takano Shigetsugu, Matsusaka Keisuke, Nasu Katsuhiro, Ikeda Jun ichiro, Ohtsuka Masayuki, Kishimoto Takashi	4. 巻 71
2. 論文標題 Solid serous neoplasm of the pancreas with locally aggressive behaviors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 795 ~ 797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13163	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 Tokunaga Mamoru, Okimoto Kenichiro, Akizue Naoki, Ishikawa Kentaro, Hirotsu Yosuke, Amemiya Kenji, Ota Masayuki, Matsusaka Keisuke, Nishimura Motoi, Matsushita Kazuyuki, Ishikawa Tsubasa, et.al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic profiles of Barrett 's esophagus and esophageal adenocarcinoma in Japanese patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97249-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------