

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2008～2012

課題番号：20229005

研究課題名（和文） High throughput sequencerによる癌のエピゲノム解析

研究課題名（英文） Epigenome analysis of cancer

研究代表者

西川 伸一 (NISHIKAWA SHINICHI)

独立行政法人理化学研究所・幹細胞研究グループ・グループディレクター

研究者番号：60127115

研究成果の概要（和文）：

研究成果

MDS に脱メチル化剤が大きな期待を集めているが、作用機序については不明だ。本研究では、最終的に4人の患者さんの骨髄から得た CD34 陽性ブラスト細胞について、治療前後経時的にゲノムワイドにメチロームと遺伝子発現を解析した。まず、正常、DCMD1, RAEB2 と悪性度が進むに連れて、プロモーター領域のメチル化が上昇する傾向を見る事が出来た。また、メチル化の変化が見られた遺伝子でも、極めて限られた転写調節領域が特異的に、転写のメカニズムと連携してメチル化が行われている事がわかった。この遺伝子リストには白血病に深く関わる多くの遺伝子が存在していた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to specify the effect of de-methylating agents on myelodysplastic syndrome (MDS) patients. So far, we have constructed promoter methylomes from 4 MDS patients (2 with RCMD and 2 with RAEB-2), as well as that from two healthy donors (commercial products). Samples from the two different subtypes clustered together, and it seems likely that DNA methylation analysis could serve as a useful diagnostic. We found an enormous over-representation of transcription factors within sets of identified genes differentially methylated between the two tumor types. Most other genes identified could also be considered to have regulatory functions with many genes encoding proteins involved in signal transduction, as well as a number of microRNA genes. We also looked at biological process associated with these gene sets. For most analyses we found an even more enormous over-representation of genes associated with various developmental processes, with many genes involved in nervous system development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	28,700,000	8,610,000	37,310,000
2009年度	32,000,000	9,600,000	41,600,000
2010年度	32,000,000	9,600,000	41,600,000
2011年度	28,000,000	8,400,000	36,400,000
2012年度	28,000,000	8,400,000	36,400,000
総計	148,700,000	44,610,000	193,310,000

研究分野：医歯化学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：骨髄異形性症候群、5AZ治療、メチローム、白血病

1. 研究開始当初の背景

これまでも発生再生科学総合研究センター（CDB）では周辺の臨床施設との共同研究を通して、直接医学研究に貢献することを心がけてきた。2007年、次世代シーケンサーの導入を決め、様々な動物のゲノムを解析する施設が整った。これを機に、ヒトゲノム解析についても周辺の医療施設の必要に答えられるのではないかと呼びかけたところ、先端医療財団の永井、神戸大学医学部、松井、伊藤の血液腫瘍を専門とする第一線の医師から、高齢化とともに増加が懸念される骨髄異形性症候群（MDS）のエピゲノム解析が出来ないかという打診を受けた。特に、当時明らかになりつつあったMDSにDNAメチル化阻害剤の有効性を日本でも確かめるための治験に併せて、治療によりどのようにメチル化が変化し、どの遺伝子の変化が実際の治療につながるのかを明らかにすることは、臨床のみならず、血液発生の研究に携わってきた私自身の研究にも資すると考え、共同で基盤Sを申請することを決めた。ただ、同じ解析を他の腫瘍でも行う目的で、神戸大学皮膚科の錦織にも呼びかけ、計画を作成した。

2. 研究の目的

ガンにepigenetic過程が関わることは、今や当然のこととされているが、これを標的にした治療が明らかに有効であることが化学的に証明された例はほとんどなく、MDSは中でも最もはっきりした疾患である。ただ、MDSに有効性が確認されているDNAメチル化阻害剤は特定のメチル化部位を阻害するわけではなく、原理的に染色体上の全てのメチル基に対して同じ効果を持つと予想できる。従って、なぜこの薬剤がMDSに効果があるのか理解するためには、治療前後で遺伝子発現と、全ゲノムレベルのメチル化DNAについて比べる必要があった。幸い、日本でもメチル化阻害剤の治験が2008-2009年に始まることと決定されたところだったので、この治験にあわせて、実際の患者さんについてメチローム解析を行い、この薬剤の作用機序を明らかにし、MDSの発症と、白血病化に関わる遺伝子を道程することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

研究方法については、当初の計画から大きな変更を余儀なくされたので詳しく述べる。元々この計画は、CDBに次世代シークエ

ンサーを導入することから、その力を周りの医療機関にも早く利用していただけるよう考えてきたものだった。しかし医療機関から提案されたのはメチローム解析であり、exome解析、遺伝子発現解析とは異なり、ただ配列を早く読めばよいというものではなかった。実際モデルシステムを用いて、メチローム解析を次世代シーケンサーで初めて見ると、結果をゲノム上にマップすることが極めて難しいことがわかった。このため、新たに様々な方法を比べ、最終的にCHARMと呼ばれる方法を、様々なゲノムアレーと組み合わせる方法に変更した。また、2010年ぐらいからサービスが始まった、infiniumと呼ばれる方法も加えてメチロームを様々なレベルで調べた。

研究計画のフローは以下のものであった。

- 1) モデル細胞を用いて、治療に使われる量のメチル化阻害剤が実際のDNAメチル化パターンにどのような影響を与えるか、ゲノムワイドに調べる。患者さんのサンプルを使う解析では、治療前後で同じ腫瘍細胞が調べられるという保証がないため、細胞株で何が起こるかを確かめることは、実際の患者さんの解析のためにも極めて重要である。
- 2) 治験が始まった時点で、メチル化阻害剤投与前と、投与中の患者さんのCD34陽性プラスト細胞について様々なレベルのメチローム解析を行い、病型や治療により、メチロームがいかに変化するかを明らかにする。
- 3) 分析から見つかりと予想される、メチル化パターンが大きく変化する遺伝子の発現とメチル化パターンを多くの患者さんのサンプルを用いて調べ、MDSの発症や、進行に関わる遺伝子を明らかにする。

しかしこの治験を利用してメチル化阻害剤の効果を確認するという当初のスキームは決定的な変更を余儀なくされた。メチル化阻害剤には、ビダーザ（アザシチジン：日本製薬）と、デシタビン（ヤンセンファーマ）があり、生化学的には後者がよりDNAメチル化阻害剤としては特異的であることがわかってきた。開始当時は、ビダーザの治験はほぼ終わっており、保険収載へ向けた申請が行われているところで、この薬剤について調べるには2011年まで待つ必要があった。一方、デシタビンは2009年の後半には治験

が始まる事が予想されており、また先端医療財団、神戸大学医学部毅の提案もこの薬剤の治験想定したものであった。念のため、治験を主導される長崎大学の朝長教授、またジャンセンファーマの担当者とも議論をした。その上で、名古屋大学の上田教授を始め、治験を予定している先生方にも集まってもらい、患者さんのリクルートなどについて話し合った。

しかし、治験の開始は遅れ、最後に2010年開発中止がジャンセンファーマ側で決まり、完全に計画遂行が不可能になった。当時は本計画自体の中止も考えたが、幸い2011年4月からビダーザの健保収載が認可されたことを聞き、遅れは覚悟で治験ではなく、実際の治療過程で患者さんのリクルートを行うことに決めた。そのため、元々被爆者の方を中心にMDS患者さんの数が多い長崎大学原爆医学研究所内科に提携先を急遽移し、このスキームで新たに倫理委員会などの申請を行い、ようやく2011年秋から、呼びかけに応じた患者さんのリクルートが始まった。

その後、全体で5例の患者さんの参加を得ることが出来、4例については、ビダーザ治療中にCD34陽性細胞プラストについて、出来るだけ長期の解析を行った。残念ながら、1例の患者さんは治療開始後すぐに亡くなられ、結局確実な結果が得られたのは4となった。

以上が計画変更等の経過であるが、リクルートが始まってからは、予定通りメチロームと遺伝子発現について検討した。

4. 研究成果

結果は、モデル細胞についての治療実験の結果と、実際の患者さんを使った結果に大きく分かれる。

1) モデル細胞株についての結果。

- a) ビダーザもデシタピンも、治療に使う濃度で実際にDNAの脱メチル化を起こした。
- b) 両薬剤で特に脱メチル化の程度に差を認めなかった。この意味で、実際の臨床例でなぜデシタピンの効果が得られなかったのか理解できない。
- c) 脱メチル化は全ての遺伝子領域で平均的に起ってはならず、起こりやすい場所とそうでない場所に分かれた。ただ、薬剤の作用機序から考えると、選択制が生まれる事は考えにくい。ただ、脱メチル化が起こっても、細胞内ではde novoにメチル化が進んでおり、これは転写状態とリンクする可能性が高い。従って、この差が生まれる原因は、de novoメチル化のされ方の差を反映していると考えている。
- d) high density CpG アレーを用いた検討では、

脱メチル化と遺伝子の発現が明確に相関するケースは少なく、我々のデータでは100種類程度であった。

- e) 薬剤処理により、実際に脱メチル化とともに、遺伝子発現量が上昇した遺伝子のうちのトップ30は **TNF, JUN, CXCR4, IMAGE-3838859, CLC, CCL4, TyroBP, APOC2, HLA-DPA, HLA-DRA, HLA-DPB, MTAP44, TRPM4, SERPINA1, IL1B, S100P, SGK, BTG2, CRIP1, UCHL1, IFI16, ~~cccl3~~, LGALS3~~3~~ b, IFIT2, IFITM1, AF1q, IL8, IFIT1, KLHDC7B, MX1** であった。ここでリストされた遺伝子は、実際の臨床例の検討によりリストする予定の遺伝子のレファレンスを提供すると期待している。

残念ながらこのモデル細胞は、治療に使う脱メチル化剤に反応して形質を変化させると言う事はなかった。ただ、領域特異性を持たない薬剤であるにも関わらず、脱メチル化のされ方に領域間で大きな差を見られる事が確認できた事は重要な一歩になった。また、例えば脱メチル化がhigh density CpG islandでほとんど起こっていない事から、実際の臨床例の研究では、プロモーターアレーを中心に検討すると言った方針を決めるのに重要な情報を得る事が出来た。

実際のMDS例についての研究結果

既に述べたように、治験の中止などの様々な問題が起こったため、実際の患者さんのリクルートが始まったのが2011年の秋にずれこんだ。その上で、3ヶ月の間に、全5例の患者さんのリクルートを得る事が出来た。不幸にして、その中の1例は治療開始後亡くなったが、残りの患者さんについては長期にわたる治療期間を通してゲノムメチロームを調べる事が出来た。以下にこれまでの結果をまとめた。

1) モデル実験系と同じで、high density CpG islandは疾患タイプや治療であまり変化を見る事はなかった。一方、プロモーターアレーを使った結果では、病型との高い相関性を見る事が出来た。

2) 細胞間でメチル化の差が見られる領域は予想以上に短かく、周りは全く変化がない事が多かった。これは、メチル化が転写状態に依存して、動的に維持されていることを示す。

3) 最も大きなメチル化パターン之差は、治療より、病型間で見られた。今回RCMD1 2例とRAEB2 2例を詳しく調べたが、図1に見られるように、両者を完全にメチロームで分類パターンと相関を見せた。

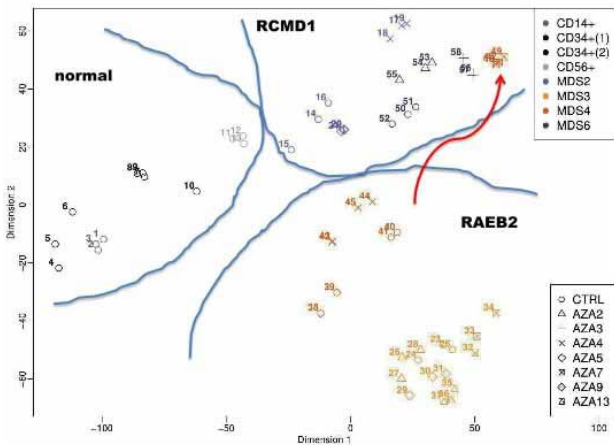


図1 MDS 4 症例のゲノムワイドメチル化パターン

この結果は、メチル化パターンを将来 MDS の分類に利用できる可能性を示唆するとともに、MDS 発症に確かに DNA メチル化が関わっている事を示唆した。

4) 一般的に腫瘍ではがん抑制遺伝子のメチル化が起こる事が指摘されている。今回の分析でもより悪性の MDS になるほどメチル化が進む傾向が見られた。ただ、遺伝子領域全てに見られる一般傾向ではない。図 2 に MIR9 遺伝子領域のメチル化パターンを例として示したが、赤系の線と青系の線をたどっていくと、ある場所だけで赤系のせんが青系より高い領域があるのがわかる。この赤系の線は RAEB2 の 2 例を示しており、青線の方は RCMD1 と正常血液細胞を示す。即ち、この場所は悪性度と相関するメチル化状態が見られる。

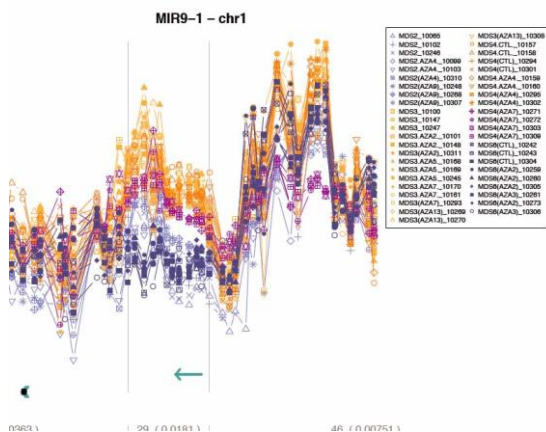


図2 MIR9 遺伝子のメチル化パターン

5) 図 2 にはメチル化阻害剤による治療の様々な段階で解析した結果もプロットしてあるが、脱メチル化剤の治療によって抗メチル化状態を正常化できるケースはほとんど

なかった。しかし、今回調べた全例は治療に一定の反応を示しており、治療前後で変化する領域を更に詳しく調べる必要がある。

6) メチル化パターンの変化は、MDS の発症と、進展と高い相関を持つ事が明らかになったが、次にこの変化が見られた個々の遺伝子について検討した。最も顕著な傾向として、MDS 細胞でメチル化亢進を示す遺伝子の多くが転写因子であった。亢進を示した top10 遺伝子のうち 7 つ、top100 のうち半分が転写因子であった (図 3)。

1 MIR9-1	MIRNA	26 Abx1	TF	51 Foxd2	TF	76 Gata4	TF
2 HoxD-3	TF	27 Podhg4	p-Cdh	52 Hox11	TF	77 Fgf17	Ligand
3 Oip1	TF	28 Dmrt1	TF	53 loc254559	TF	78 Kcnb2	Ion Channel
4 Sim1	TF	29 Phox2a	TF	54 Dlx5	TF	79 Tbx3	TF
5 Mafk211	TF	30 Pax3	TF	55 loc145845	TF	80 Dnao2	TF
6 Nks6-1	TF	31 Tmprss2	Transmembrane	56 Sc6a15	Solute Carrier	81 Gsx2	TF
7 TFAP2C	TF	32 T	TF	57 Mir193b	MIRNA	82 DKFZP434H168	TF
8 C17orf53	TF	33 Oig2	TF	58 TFAP2A	TF	83 Ab4	TF
9 Srsf9	TF	34 ENS0000421228	TF	59 Hm2	TF	84 LR2	Receptor
10 Nks2-2	TF	35 Lmd1a	TF	60 Kirrel2	CD-80 like	85 Dlx1	TF
11 Kcnk3	Ion Channel	36 LOC115056	TF	61 Zfp4	TF	86 Cald1	TF
12 Cyp26b1	Enzyme	37 Col27a1	ECM	62 Tacc2	Coiled coil	87 Tcf21	TF
13 Sp9	TF	38 My6	TF	63 Guc	TF	88 Sc8a1	Solute Carrier
14 En1	TF	39 Robo3	Receptor(?)	64 Slpr1	Receptor	89 Kcnma1	Ion Channel
15 Mir10-b	MIRNA	40 Khl14	TF	65 slc10a4	Solute Carrier	90 Rspo2	Receptor
16 Pax9	TF	41 Bcl6	TF	66 slc6a4	Solute Carrier	91 Zfp5	TF
17 FL345983	TF	42 M2C12982	TF	67 Hoxb6	TF	92 Gdnrb2	Ion Channel
18 Cnfr1	Receptor	43 Onecut1	TF	68 Fzd4	TF	93 Esrrg	TF
19 Ndufa412	Enzyme	44 Twst1	TF	69 SP8	TF	94 Ccn1	Cyclin
20 Wt1	TF	45 Nr4a2	TF	70 FLM1350	TF	95 C15orf26	TF
21 Irf2	TF	46 Nr2e1	TF	71 Hox13	TF	96 Mir1179	MIRNA
22 Sox2	TF	47 Ephr5	Receptor	72 Nr9-3	MIRNA	97 Shhn22	TF
23 Sox9	TF	48 CCDC140	TF	73 CSMDS	Membrane protein	98 Rnf59	TF
24 Zmynd15	TF	49 GABRG2	Receptor	74 HPSE2	Enzyme	99 Gasas	Antisense tra
25 Lhx8	TF	50 Onecut2	TF	75 Hox13	TF	100 Duox1	TF

図3 MDS で抗メチル化されている遺伝子の top100.

この中には MDS の発症に関わる事がはっきり示されている Nr4a2 を含め、これまで腫瘍発生と関わる事が示された興味ある遺伝子が多く含まれていた。これら遺伝子について、現在簡便な検査法を開発しており、今後多くの患者さんについて調べ、診断的価値があるかどうかを確かめる。

7) 治療により大きな改善を見せた一例では、免疫系に関わる遺伝子に比較的選択的な脱メチル化が見られた。ただ、脱メチル化の程度は強くはなかった。他の症例でも、治療により脱メチル化が確かに確認された。ただ、この変化は治療開始後すぐに見られるだけで、長期に治療を続けると、元のパターンに戻った。一方、この治療は長期間続ける事による効果の存在が既に示されており、メチロームの我々の結果とは一見矛盾するよう思われた。

以上 4 例ではあったが、MDS の理解に新しい可能性を開く様々な結果を得る事が出来た。いずれにせよ、メチル化パターンが診断的価値がある事がはっきりしたため、次はゲノムワイドではない、特定のセットの遺伝子に絞った、多くの患者さんについての検討が必要であると考えられる。この研究については、長崎大学原爆医学研究所を中心に準備を進めている。

5. 主な発表論文等

MDS に直接関わる研究については、現在投稿中と準備中の段階である。従って、発表論文として、研究室で行った論文をリストしてお

く。

計 16 件

- 1) Nakagawa, R., A. Togawa, T. Nagasawa, and S. Nishikawa. 2013. Peyer's patch inducer cells play a leading role in the formation of B and T cell zone architecture. *J Immunol* 190:3309-3318.
- 2) Kataoka, H., M. Hayashi, K. Kobayashi, G. Ding, Y. Tanaka, and S.I. Nishikawa. 2013. Region-specific Etv2 ablation revealed the critical origin of hemogenic capacity from Hox6-positive caudal-lateral primitive mesoderm. *Exp Hematol*
- 3) Ding, G., Y. Tanaka, M. Hayashi, S. Nishikawa, and H. Kataoka. 2013. PDGF receptor alpha+ mesoderm contributes to endothelial and hematopoietic cells in mice. *Dev Dyn* 242:254-268
- 4) Jakt, L.M., S. Moriwaki, and S. Nishikawa. 2013. A continuum of transcriptional identities visualized by combinatorial fluorescent in situ hybridization. *Development* 140:216-225.
- 5) Kobayashi, K., L.M. Jakt, and S. Nishikawa. 2013. Epigenetic regulation of the neuroblastoma genes, Arid3b and Mycn. *Oncogene* 32:2640-2648.
- Hayashi, M., M. Pluchinotta, A. Momiyama, Y. Tanaka, S. Nishikawa, and H. Kataoka. 2012. Endothelialization and altered hematopoiesis by persistent Etv2 expression in mice. *Exp Hematol* 40:738-750 e711.
- 7) Tanaka, Y., A. Joshi, N.K. Wilson, S. Kinston, S. Nishikawa, and B. Gottgens. 2012. The transcriptional programme controlled by Runx1 during early embryonic blood development. *Dev Biol* 366:404-419
- 8) Tanaka, Y., M. Hayashi, Y. Kubota, H. Nagai, G. Sheng, S. Nishikawa, and I.M. Samokhvalov. 2012. Early ontogenic origin of the hematopoietic stem cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:4515-4520.
- 9) Ishitobi, H., A. Wakamatsu, F. Liu, T. Azami, M. Hamada, K. Matsumoto, H. Kataoka, M. Kobayashi, K. Choi, S. Nishikawa, S. Takahashi, and M. Ema. 2011. Molecular basis for Flk1 expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse. *Development* 138:5357-5368.
- 10) Kataoka, H., M. Hayashi, R. Nakagawa, Y. Tanaka, N. Izumi, S. Nishikawa, M.L. Jakt, and H. Tarui, and S. Nishikawa. 2011. Etv2/ER71 induces vascular mesoderm from Flk1+PDGFRalpha+ primitive mesoderm. *Blood* 118:6975-6986.
- 11) Fukushima, Y., M. Okada, H. Kataoka, M. Hirashima, Y. Yoshida, F. Mann, F. Gomi, K. Nishida, S. Nishikawa, and A. Uemura. 2011. Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disordered angiogenesis in ischemic retinopathy in mice. *J Clin Invest* 121:1974-1985.
- 12) Freter, R., M. Osawa, and S. Nishikawa. 2010. Adult stem cells exhibit global suppression of RNA polymerase II serine-2 phosphorylation. *Stem Cells* 28:1571-1580.
- 13) Kubota, Y., M. Osawa, L.M. Jakt, K. Yoshikawa, and S. Nishikawa. 2009. Necdin restricts proliferation of hematopoietic stem cells during hematopoietic regeneration. *Blood* 114:4383-4392.
- 14) Kinoshita, M., T. Era, L.M. Jakt, and S. Nishikawa. 2009. The novel protein kinase Vlk is essential for stromal function of mesenchymal cells. *Development* 136:2069-2079.
- 15) Eilken, H.M., S. Nishikawa, and T. Schroeder. 2009. Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature* 457:896-900.
- 16) Nishikawa, S., R.A. Goldstein, and C.R. Nierras. 2008. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:725-729.

〔学会発表〕 (計 6 件)

1. WongYanFung: Genome-wide analysis of DNA methylation in stem cell diseases Keystone Symposia, 2010, 4月26日
2. WongYanFung: Genome-wide analysis of DNA methylation in stem cell diseases. Cold Spring

Harbor Symposium. 蘇州 9月21日

3. WongYanFung: Genome-wide analysis of DNA methylation in stem cell disorder. 32回 Lorne Genome Conference Genomics & Molecular Biology. Lorne, オーストラリア 2011年 2月 13日
4. WongYanFung: Genome-wide analysis of DNA methylation in stem cell disorders. Inaugural Symposium on Pluripotency and Development. ケンブリッジ 2011年、6月6日
5. WongYanFung: A reverse epigenetic approach to study DNA methylation sensitive regions in leukemia genome. Copenhagen Bioscience Conference. コペンハーゲン、2012年 6月 25日
6. WongYanFung: Characterization of DNA methylome in Myelodysplastic Syndromes. Wellcome Trust Scientific Conference. John Hopkins 大学 2012年10月2日

ホームページ等

退職によりホームページは閉鎖。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 伸一 (NISHIKAWA SHINICHI)

独立行政法人理化学研究所・幹細胞研究グループ・グループディレクター

研究者番号：60127115

(2) 研究分担者

樽井 寛 (TARUI HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・ゲノム資源解析ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：90342815

伊藤 光宏 (ITO MITSUHIRO)

神戸大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：50362794

錦織 千佳子 (NISHIGORI CHIKAKO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50198454

松井 利充 (MATSUI TOSHIMITSU)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10219371

永井 謙一 (NAGAI KEN-ICHI)

財団法人先端医療振興財団・先端医療センター診療開発部・部長

研究者番号：50470208

宮崎 泰司 (MIYAZAKI YASUSHI)

長崎大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40304943

伊藤 仁也 (ITO KIMINARI)

財団法人先端医療振興財団・血液再生研究グループ・グループリーダー

研究者番号：20301989 (H20→H21 連携研究者)