

## 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 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22240090

研究課題名（和文） がんのゲノム・エピゲノム解析に基づく個性診断法の開発

研究課題名（英文） Development of diagnostic tools for personalized cancer medicine by genomic and epigenomic analyses

研究代表者

稲澤 譲治（INAZAWA JOHJI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：30193551

研究成果の概要（和文）：

大量オミックス情報を基盤としたがん個別化医療の実現に大きな期待が寄せられている。今回の研究では、がん関連マイクロ RNA に着目し、個性診断法開発と治療への応用を視野に、がん抑制性マイクロ RNA のハイスループット・スクリーニング系を独自に構築し、これらを用いることで各種がんにおけるがん抑制性マイクロ RNA を探索し、口腔がんの miR-193a、miR-137、miR-218、さらに miR-596 と標的遺伝子 LLGLS3BP、肝細胞がんの miR-124、miR-203、子宮体がんの miR-152 など同定し、さらにそれぞれの標的遺伝子候補を明らかにした。また、がんの悪性特性の中でも浸潤・転移能の獲得は難治がん特性としてその克服が焦眉の課題である。浸潤転移と密接に関与する EMT 関連分子を探索した。大腸がん EMT 制御転写因子 SIX1 を同定し、さらに、口腔扁平上皮がん (OSCC) 細胞株の解析による Wnt シグナル関連遺伝子群の発現解析と DNA メチル化解析から、間葉系細胞株特異的 DNA 過剰メチル化により発現抑制される WNT7A と WNT10A を見出した。これにより、miR-200-ZEB1-WNT7A-CDH1 経路が明らかになった。また、WNT7A と WNT10A の DNA 過剰メチル化は OSCC 症例の悪性度の相関が判明した。オートファジー関連遺伝子 LC3Av1 の構造を明らかにするとともにそのがん抑制機能を示した。MeDIP-chip 法による網羅的メチル化解析と網羅的発現解析を組み合わせた統合的解析から、DNA 過剰メチル化により発現抑制される肝細胞がん抑制遺伝子 MZB1 を同定した。

研究成果の概要（英文）：

In order to develop useful diagnostic tools for personalized cancer medicine, we performed genetic and epigenomic analyses in cancer, and identified novel cancer-related genes. By using methylation-based screening of tumor suppressor (TS) -miRNAs in oral squamous cell carcinoma (OSCC), we identified miR-596 and its target gene, LLGLS3BP. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is relevant to the mechanism of invasion and metastasis in cancer. From a comprehensive gene expression analysis using colorectal cancer (CRC) cell lines, and following the ontology (GO) analysis, SIX1 was identified as an EMT-related gene in CRC. Furthermore, through DNA methylation and gene expression analyses of components in the Wnt signaling pathway, we identified WNT7A and WNT10A as genes silenced by mesenchymal-specific DNA hypermethylation in oral OSCC. In autophagy LC3 has a physiologically important role. Among LC3 family genes, we identified two transcriptional variants of LC3A, LC3Av1 and LC3Av2. Interestingly, we found that LC3Av1 functions in autophagy and indicated that LC3Av1 may be crucial in various types of cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2011年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2012年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
年度			
年度			
総計	38,600,000	11,580,000	50,180,000

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：(1) 難治がん (2) 癌遺伝子

(5) エピゲノム (6) マイクロ RNA

(3) 癌抑制遺伝子

(4) ゲノム

(7) DNA メチル化

(8) 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

次世代型高速シーケンサーの開発ならびに大量ヒトゲノム情報を利用可能とするインフラが整備され、機能性 RNA を含む種々の網羅的分子情報の収集と多次元解析が加速化されてきており、大量オミックス情報を基盤としたがん個別化医療を実現するための診断ツール開発に期待が寄せられている。

2. 研究の目的

今回の研究は、我々が 10 余年をかけて構築したがんのゲノム・エピゲノムハイスループット解析システムとその解析情報を基軸に、遺伝子発現解析、エピジェネティック発現調節異常の同定、蛋白発現・機能変化、さらにがん特異的クロマチン構造異常やマイクロ RNA 機能異常の探索などを合わせ「がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析とその成果」に基づきがん病態を包括的に理解することで、各種がんの主要シグナル伝達経路や細胞文脈を明らかにし、がん個別化治療や予防法確立の分子基盤を構築し、画期的ながん分子診断法の開発ならびに治療標的分子の同定を目的とする。

3. 研究の方法

申請者が得意とするゲノム・エピゲノム解析システムとこれまでに蓄積した各種がんのゲノム・エピゲノム解析データに基づき、各種がんゲノム・エピゲノム異常を探索してがん特異的異常を同定し、これをランドマークに標的新規がん関連遺伝子候補を同定する。がん特異的ゲノム・エピゲノム異常スクリーニングには、既存法に加え次世代型シーケンサーとその応用技術、MeDI P 法などメチル化 DNA ハイスループット解析技術等を利用する。また、腫瘍バイオリソース、組織マイクロアレイ、*in vitro*、*in vivo* イメージン

グ法、siRNA による遺伝子機能ノックダウン、遺伝子改変マウス等を用いて、候補がん関連遺伝子のがん病態形成機構への関与を詳細に調べ、診断バイオマーカーや治療標的分子としての意義を検証する。さらに、合成二本鎖 RNA ライブラリーの機能的スクリーニングによる新規がん抑制遺伝子型 miRNA の網羅的探索システムにより、がん関連マイクロ RNA を同定、RNA 創薬の可能性を追究する。

4. 研究成果

申請者らは過去に大規模ながんゲノムコピー数解析を行い CGH database を構築して公開した。米国 NCBI データベースには「CGH database Japan」のバナーが設置され国内外研究者に利用されている。また、申請者は国内外より約 500 種類のがん細胞株を収集して詳細なオミックスデータに加えて「代謝」、「低酸素」、「細胞死」、「オートファジー」、「ゲノム不安定性」、「薬剤耐性」などの状態を調べ各種がん細胞株の「細胞文脈パネル」を構築している。その結果、現在まで新規 52 種類のがん遺伝子候補と 21 種類のがん抑制遺伝子候補、さらに、10 種類のがん抑制性マイクロ RNA を同定し、個々の詳細な機能と病態関連解析を行い、治療標的としての意義や個性診断バイオマーカーとしての有用性を検証し報告した。今回の研究では、オートファジー関連遺伝子 LC3Av1 のがん抑制遺伝子としての機能 (*Oncogene* 2012) や、MeDIP-chip 法による網羅的メチル化解析と網羅的発現解析を組み合わせた統合的解析により HCC で DNA 過剰メチル化により発現抑制される肝細胞がん抑制遺伝子 MZB1 (*Clin Can Res*, 2012、表紙に採用) を明らかにした。また、がん関連マイクロ RNA に着目し、治療への応用を視野に、がん抑制性マイクロ RNA のハイスループット・スクリーニング系を独自に構築し、これらを用いることで口腔がんの miR-193a、

miR-137、miR-218 (*Can Res* 2008, 2011)、肝細胞がんの miR-124、miR-203 (*Carcinogenesis*, 2010)、子宮体がんの miR-152 (*Can Res* 2011) など同定した。また、がんの悪性特性の中でも浸潤・転移能の獲得は難治がん特性としてその克服が焦眉の課題である。浸潤転移と密接に関与する EMT 関連分子の探索に注力した。まず、大腸がん EMT 制御転写因子 SIX1 (*Oncogene* 2012) を同定し、さらに、口腔扁平上皮がん (OSCC) 細胞株の解析による Wnt シグナル関連遺伝子群の発現解析と DNA メチル化解析から、間葉系細胞株特異的 DNA 過剰メチル化により発現抑制される WNT7A と WNT10A を見出した。miR-200-ZEB1-WNT7A-CDH1 経路を明らかにした。また、WNT7A と WNT10A の DNA 過剰メチル化は OSCC 症例の悪性度と相関する事が判明した (*Oncogene* 2012)。

#### 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 4 5 件)

1. Harazono Y, Kozaki K, Muramatsu T, Endo H, Uzawa N, Kawano T, Harada K, Inazawa J: miR-655 is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2. *PLoS One*. 2013 (in press) 査読有
2. Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K, Tanaka S, Arii S, Shimamura T, Niida A, Miyano S, Inazawa J: The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 8:e60155. 2013 査読有
3. Endo H, Muramatsu T, Furuta M, Uzawa N, Pimkhaokham A, Amagasa T, Inazawa J, Kozaki K: Potential of tumor-suppressive miR-596 targeting LGALS3BP as a therapeutic agent in oral cancer. *Carcinogenesis*. 34:560-9. 2013 DOI:10.1093/carcin/bgs376. 査読有
4. Miyawaki Y, Kawachi H, Ooi A, Eishi Y, Kawano T, Inazawa J, Imoto I: Genomic copy-number alterations of MYC and FHIT genes are associated with survival in esophageal squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci*. 103:1558-66. 2012 DOI: 10.1016/j.humpath.2012.03.015. 査読有
5. Matsumura S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Muramatsu T, Furuta M, Tanaka S, Sakamoto M, Arii S, Inazawa J: Integrative array-based approach identifies MZB1 as a frequently methylated putative tumor-suppressor in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 18:3541-3551. 2012 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1007. 査読有
6. Akamatsu S, Takata R, Haiman CA, Takahashi A, Inoue T, Kubo M, Furihata M, Kamatani N, Inazawa J, Chen GK, Le Marchand L, Kolonel LN, Katoh T, Yamano Y, Yamakado M, Takahashi H, Yamada H, Egawa S, Fujioka T, Henderson BE, Habuchi T, Ogawa O, Nakamura Y, Nakagawa H: Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese. *Nat Genet*. 44:426-9. 2012 DOI: 10.1038/ng.1104. 査読有
7. Ono H, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Matsui T, Kurasawa Y, Muramatsu T, Sugihara K, Inazawa J: SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation. *Oncogene*. 31:4923-34. 2012 DOI: 10.1038/onc.2011.646. 査読有
8. Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J: A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene*. 31:4397-408. 2012 DOI: 10.1038/onc.2011.613. 査読有
9. Ishihara T, Inoue J, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J: HECT-type ubiquitin ligase ITCH targets lysosomal-associated protein multispansing transmembrane 5 (LAPTM5) and prevents LAPTM5-mediated cell death. *J Biol Chem*. 286:44086-94. 2011 DOI: 10.1074/jbc.M111.251694. 査読有
10. Kurasawa Y, Kozaki K, Pimkhaokham A, Muramatsu T, Ono H, Ishihara T, Uzawa N, Imoto I, Amagasa T, Inazawa J: Stabilization of phenotypic plasticity through mesenchymal-specific DNA hypermethylation in cancer cells. *Oncogene*. 31:1963-74. 2012 DOI: 10.1038/onc.2011.373. 査読有
11. Tsuruta T, Kozaki K, Uesugi A, Furuta M, Hirasawa A, Imoto I, Susumu N, Aoki D, Inazawa J: miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res*.

- 71:6450-62. 2011 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0364. 査読有
12. Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, Omura K, Inazawa J: The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer Res.* 71:5765-78. 2011 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0368. 査読有
  13. Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Haruki S, Sudol M, Shimada Y, Tsuda H, Kawano T, Inazawa J: YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 32:389-98. 2011 DOI: 10.1093/carcin/bgq254. 査読有
  14. Miki D, Kubo M, Takahashi A, Yoon KA, Kim J, Lee GK, Zo JI, Lee JS, Hosono N, Morizono T, Tsunoda T, Kamatani N, Chayama K, Takahashi T, Inazawa J, Nakamura Y, Daigo Y: Variation in TP63 is associated with lung adenocarcinoma susceptibility in Japanese and Korean populations. *Nat Genet.* 42:893-6. 2010 DOI: 10.1038/ng.667. 査読有
  15. Takata R, Akamatsu S, Kubo M, Takahashi A, Hosono N, Kawaguchi T, Tsunoda T, Inazawa J, Kamatani N, Ogawa O, Fujioka T, Nakamura Y, Nakagawa H: Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population. *Nat Genet.* 42:751-4. 2010 DOI: 10.1038/ng.635. 査読有
  16. Haruki S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J: Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 31:1027-36. 2010 DOI: 10.1093/carcin/bgq053. 査読有
  17. Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J: miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 31:766-76. 2010 DOI: 10.1093/carcin/bgp250. 査読有

他 16 編

[学会発表] (計 101 件)

1. Inazawa J: Integrative genomics and

epigenomics for identification of cancer-related genes. Linking systems-biology to cancer research. Seoul national university dental hospital. Seoul, Korea.  
6/November/2010

2. Inazawa J: Exploring of tumor suppressor micro RNAs silenced by DNA methylation. 9<sup>th</sup> China-Japan Joint Conference of Cancer. Shanghai, China. 21-23/December/2011
  3. Inazawa J: Identification of tumor-suppressor micro-RNAs silenced by DNA hypermethylation in cancer. 2012 Seoul National University Cancer Research Institute Symposium. Seoul National University Kwanak Campus, Culture Center, Seoul, South Korea. 16-19/ May/2012
  4. Inazawa J: Exploring of tumor suppressive micro-RNAs silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in cancer. The 22<sup>nd</sup> HCS/the 4<sup>th</sup> JARI Joint International Symposium. Hiroshima, Japan. 30/August/2012
  5. 稲澤譲治: 「LAPTM5 蓄積で誘導されるリソゾーム細胞死と神経芽腫の自然退縮機構」。がん特定研究 5 領域合同シンポジウム。学術総合センター・一橋記念講堂。東京。2010 年 1 月 14 日
  6. 稲澤譲治: がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析の最近の進歩。第 70 回日本癌学会学術総会。名古屋国際会議場。愛知。2011 年 10 月 5 日
  7. 稲澤譲治: 新世代ゲノム解析技術によって浮上するがんのバックシートドライバ。第 16 回日本がん分子標的治療学会。西日本総合展示場。福岡。2012 年 6 月 29 日
- 他 94 演題

[図書] (計 12 件)

1. (分担) 稲澤譲治: 中国・日本科学最前線-研究の現場から- 2011 年版。独立行政法人科学技術振興機構中国総合研究センター (東京)。2011/3/15 (603P)
2. (分担) 稲澤譲治: がん生物学イラストレイテッド。株式会社羊土社 (東京) pp140-150 (11P), 2011/7/10 (411P)
3. (分担) 稲澤譲治: 新臨床腫瘍学 (改訂第 3 版)-がん薬物療法専門医のために-。株式会社南江堂 (東京)。pp8-13 (6P), 2012/12/15 (755P)
4. 稲澤譲治: 染色体異常-検査の進歩、結果の解釈。日本医師会。日本医師会雑誌。第 139 巻 第 3 号: 562-566, 2010(2010/6/1) (5P) 他 8 編

〔産業財産権〕

○出願状況（計 6 件）

名称：卵巣癌の検出方法、及び抑制方法  
発明者：稲澤譲治、井本逸勢、菊池良子  
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社

種類：

番号：13/659.834

出願年月日：平成 24 年 10 月 24 日

国内外の別：国外（US 分割）

名称：癌の検出方法および抑制方法

発明者：稲澤譲治、小崎健一、井本逸勢

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社

種類：

番号：12/964.464

出願年月日：平成 22 年 12 月 9 日

国内外の別：国外（US 分割）

名称：核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法

発明者：稲澤譲治、井本逸勢

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社

種類：

番号：特願 2010-118362

出願年月日：平成 22 年 5 月 24 日

国内外の別：国内

名称：核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法

発明者：稲澤譲治、井本逸勢

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社

種類：

番号：12/787.953

出願年月日：平成 22 年 5 月 26 日

国内外の別：国外（US）

名称：核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法

発明者：稲澤譲治、井本逸勢

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社

種類：

番号：10164051.4

出願年月日：平成 22 年 5 月 27 日

国内外の別：国外（EP）

名称：核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法

発明者：稲澤譲治、井本逸勢

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社

種類：

番号：10164051.4

出願年月日：平成 22 年 5 月 27 日

国内外の別：国外（EP）

○取得状況（計 11 件）

名称：食道癌の検出方法

発明者：稲澤譲治、小崎健一、井本逸勢

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、株式会社ビー・エム・エル

種類：

番号：特許第 5044837 号

取得年月日：平成 24 年 7 月 27 日

国内外の別：国内

名称：癌抑制剤

発明者：稲澤譲治、井本逸勢、和泉宏幸、横井左奈

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社

種類：

番号：特許第 5002749 号

取得年月日：平成 24 年 6 月 1 日

国内外の別：国内

名称：癌抑制剤

発明者：稲澤譲治、井本逸勢、于衛

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社

種類：

番号：特許第 4867018 号

取得年月日：平成 23 年 11 月 25 日

国内外の別：国内

名称：卵巣癌の検出方法、及び抑制方法

発明者：稲澤譲治、井本逸勢、菊池良子

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社

種類：

番号：1997910

取得年月日：平成 24 年 8 月 15 日

国内外の別：国外（EP）

名称：神経芽腫の検出方法

発明者：稲澤譲治、井本逸勢、井上純

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社

種類：

番号：8216785

取得年月日：平成 24 年 7 月 10 日

国内外の別：国外（US）

名称：癌の検出方法および癌抑制剤

発明者：稲澤譲治、小崎健一、井本逸勢

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社

種類：

番号：8183223  
取得年月日：平成 24 年 5 月 22 日  
国内外の別：国外（US 分割）

名称：口腔扁平上皮癌の検出方法  
発明者：稲澤譲治、井本逸勢、中村恵理奈、津田均  
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社  
種類：  
番号：8143003  
取得年月日：平成 24 年 3 月 27 日  
国内外の別：国外（US）

名称：癌抑制剤  
発明者：稲澤譲治、井本逸勢、和泉宏幸、横井左奈  
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社  
種類：  
番号：1837399  
取得年月日：平成 23 年 6 月 22 日  
国内外の別：国外（EP）

名称：癌の検出方法および癌抑制剤  
発明者：稲澤譲治、小崎健一、井本逸勢  
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社  
種類：  
番号：2088208  
取得年月日：平成 23 年 4 月 27 日  
国内外の別：国外（EP）

名称：癌の検出方法および抑制方法  
発明者：稲澤譲治、井本逸勢、于衛  
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社  
種類：  
番号：7867709  
取得年月日：平成 23 年 1 月 11 日  
国内外の別：国外（US）

名称：癌抑制剤  
発明者：稲澤譲治、井本逸勢、和泉宏幸、横井左奈  
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、富士フィルム株式会社  
種類：  
番号：7691594  
取得年月日：平成 22 年 4 月 6 日  
国内外の別：国外（US）

〔その他〕  
ホームページ等

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子細胞遺伝ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/mri/cgen/framepage.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

稲澤 譲治 (INAZAWA JOHJI)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
研究者番号：30193551

### (2) 研究分担者

小崎 健一 (KOZAKI KENICHI)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授  
研究者番号：50270715

井上 純 (INOUE JUN)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教  
研究者番号：50568326