

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659400

研究課題名（和文）消化管癌の間質エピゲノムからアプローチする癌幹細胞ニッチの病態解明

研究課題名（英文）Epigenomic analysis of gastrointestinal cancer stroma

研究代表者

篠村 恭久（SHINOMURA YASUHISA）

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90162619

研究成果の概要（和文）：消化管癌の癌細胞・背景粘膜・間質におけるエピゲノム異常を解析するため、網羅的 DNA メチル化解析を行った。Methylated CpG island Amplification (MCA) マイクロアレイ法およびバイサルファイト・パイロシークエンス法による解析の結果、胃癌細胞のみならず間質細胞において、SFRP1 や miR-34b/c など癌関連遺伝子のメチル化を検出した。さらに胃癌および背景粘膜の網羅的 DNA メチル化解析から、RASGRF1 遺伝子のメチル化を同定し、胃粘膜における RASGRF1 メチル化が胃癌リスクマーカーとなりうることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We aimed to analyze epigenome alterations in gastrointestinal cancer cells, cancer stroma and background non-cancerous mucosa. By performing Methylated CpG Amplification (MCA)-microarray analysis and bisulfite-pyrosequencing analysis, we detected methylation of tumor-related genes, such as SFRP1 and miR-34b/c, in gastric cancer cells as well as cancer stroma. Moreover, we identified aberrant methylation of a candidate cancer-related gene, RASGRF1, in both gastric cancer cells and background non-cancerous mucosa. We also found that methylation of RASGRF1 could be a potential biomarker to assess gastric cancer risk.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：胃癌、癌間質、エピジェネティクス、メチル化

1. 研究開始当初の背景

胃癌や大腸癌などの消化管癌細胞におけるジェネティックおよびエピジェネティックな異常が数多く発見され、消化器癌の発生、進展に重要な役割を担っていることが示されている。これまで我々は SFRP1、WIF1、RASSF2 など多くの癌抑制遺伝子・癌関連遺伝子が消化管癌において高メチル化していることを報告してきた。また胃癌高リスク群である皺襞肥大胃炎において、ゲノムワイドな低メチル化と遺伝子 CpG アイランド高メ

チル化の両方が認められることを明らかにした。一方、癌間質細胞は腫瘍の微小環境に寄与し、浸潤や転移など癌の進展に重要な役割を担うことが明らかになってきているが、癌間質の分子レベルでの異常はあまり検討されていない。乳癌では癌細胞のみならず間質にも DNA メチル化異常が見られることが報告されており、癌間質細胞におけるエピジェネティックな異常の存在が少しずつ明らかになってきた。しかし、それが腫瘍組織においてどのような意義を持つのかは明らか

にされておらず、また、消化器癌間質におけるエピジェネティックな変化の検討はほとんどなされていない。消化器癌間質において DNA メチル化異常を明らかにすることは、消化器癌の進展機序を解明する上で重要である。

2. 研究の目的

本研究では胃癌細胞および胃癌間質細胞における DNA メチル化を解析することで、胃癌間質細胞の DNA メチル化異常を明らかにすることを目的とする。得られたデータを詳細に検討し、同定した遺伝子の機能解析を行うことで、癌間質細胞におけるエピジェネティックな変化の機能的意義を明らかにし、診断・治療に応用しうる知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 解析対象

内視鏡的あるいは外科的に切除された胃癌組織を対象とした。腺管分離法を用いて、上皮成分と間質成分に分離した。また、CD31、CD34、CD146 をマーカーとしてフローサイトメトリー法を行うことで、内皮細胞の抽出を行った。

(2) 網羅的 DNA メチル化および発現解析

メチル化 DNA をゲノムワイドに増幅するために Methylated CpG island amplification (MCA)法を用いた。まずメチル化感受性制限酵素 SmaI でゲノム DNA を処理した後、アダプターをライゲーションし、PCR によって DNA 断片を増幅した。得られた MCA アンプリコンをラベリングし、CpG アイランドアレイにハイブリダイズすることで、網羅的メチル化解析を行った。また Total RNA を抽出し、Whole Human Genome アレイ (Agilent)を用いて、遺伝子発現プロファイル解析を行った。

エピゲノムデータを遺伝子解析ソフト Gene Spring GX にインポートし、クラスタリング解析、Gene Ontology 解析、Pathway 解析などのバイオインフォマティクス解析を行った。

(3) 遺伝子メチル化解析

網羅的解析で同定した遺伝子については、メチル化特異的 PCR (MSP)法およびパイサルファイト・シークエンス法、パイサルファイト・パイロシークエンス法でさらに詳細なメチル化解析を行った。

(4) ヒストン修飾解析

アクティブな転写開始点のマーカーであるトリメチル化ヒストン H3K4 (H3K4me3)、および転写抑制のマーカーであるトリメチル化ヒストン H3K27 (H3K27me3)に対する抗

体を用いて、それぞれクロマチン免疫沈降 (ChIP)を行った。

(5) 遺伝子機能解析

同定した遺伝子の機能を、MTT アッセイ、コロニー形成アッセイ、マトリゲル浸潤アッセイにより解析した。

4. 研究成果

臨床検体からエピゲノム解析を行うには、微量検体における DNA メチル化やヒストン修飾の解析手法の確立が必須である。我々は MCA 法の条件を検討することで、100 ng のスタート量からもメチル化 CpG アイランドを増幅可能なことを検証した。MCA の増幅産物をカスタム CpG アイランドマイクロアレイで解析することで、ゲノムワイドな DNA メチル化解析を行うことが可能となった。

また、ヒストン修飾を解析するためのクロマチン免疫沈降 (ChIP)法の条件を最適化することで、 1×10^5 個の細胞から ChIP 実験を行うことが可能となった。

次に、臨床検体を対象とした解析を行った。まず胃癌の生検組織から腺管分離法を用いて上皮成分と間質成分を分離した。腺管および間質を MCA マイクロアレイおよびパイサルファイト・パイロシークエンス法でメチル化解析した結果、興味深いことに SFRP1 や miR-34b/c などの遺伝子は胃癌細胞および間質の両者において高度にメチル化していることを見いだした。また MCA マイクロアレイの結果、胃癌および胃癌背景粘膜において RASGRF1 遺伝子のメチル化を新たに同定した。機能解析の結果、RASGRF1 は癌細胞増殖および浸潤能を抑制したことから、癌抑制遺伝子候補であることが示唆された。さらに臨床データとの比較検討により、RASGRF1 メチル化が胃癌のリスクマーカーとなり得ることを明らかにした。

次に、臨床検体から間質成分を直接抽出することを目指し、CD31、CD34、CD146 をマーカーとしてフローサイトメトリーを用いて内皮細胞の抽出を試みた。生検材料を FACS 解析した結果、これらのマーカー陽性の細胞が 0.1~2%程度存在することが分かったが、回収できる細胞数が数千個単位のため、エピゲノム解析は困難であった。内皮細胞の抽出には、生検材料よりも大きな切除標本が必要であると結論づけられた。

また、non-coding RNA 発現プロファイル解析から、消化管間質腫瘍において miR-196a と lincRNA である HOTAIR が悪性度と強く相関することを明らかにした。miR-196a および HOTAIR の高発現は、高悪性度、高転移性の消化管間質腫瘍に特徴的に見られることから、重要な予後予測マーカーおよび治療標的となりうると考えられた。

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 19 件)

- ① Sukawa Y, Yamamoto H, Noshō K, Kunimoto H, Suzuki H, Adachi Y, Nakazawa M, Nobuoka T, Kawayama M, Mikami M, Matsuno T, Hasegawa T, Hirata K, Imai K, Shinomura Y. Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 18:6577-6586, 2012. 査読有
- ② Yamamoto E, Suzuki H, Yamano HO, Maruyama R, Nojima M, Kamimae S, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada T, Suzuki R, Sato A, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Sugai T, Imai K, Shinomura Y, Toyota M. Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. *Am J Pathol* 181: 1847-1861, 2012. 査読有
- ③ Takamaru H, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Suzuki R, Yamamoto H, Kai M, Tokino T, Sugai T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Aberrant methylation of RASGRF1 is associated with an epigenetic field defect and increased risk of gastric cancer. *Cancer Prev Res* 5: 1203-1212, 2012. 査読有
- ④ Yasui H, Ishida T, Maruyama R, Nojima M, Ikeda H, Suzuki H, Hayashi T, Shinomura Y, Imai K. Model of translational cancer research in multiple myeloma. *Cancer Sci* 103:1907-1912, 2012. 査読有
- ⑤ Yamamoto H, Adachi Y, Taniguchi H, Kunimoto H, Noshō K, Suzuki H, Shinomura Y. Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 18:2745-2755, 2012. 査読有
- ⑥ Shitani M, Sasaki S, Akutsu N, Takagi H, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto H, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Genome-wide analysis of DNA methylation identifies novel cancer-related genes in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 33: 1307-1317, 2012. 査読有
- ⑦ Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Noshō K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, Nishida T, Bamba T, Kanda T, Ajioka Y, Taguchi T, Okahara S, Takahashi H, Nishida Y, Hosokawa M, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 72: 1126-1136, 2012. 査読有
- ⑧ Maruyama R, Suzuki H, Yamamoto E, Imai K, Shinomura Y. Emerging links between epigenetic alterations and dysregulation of noncoding RNAs in cancer. *Tumour Biol* 33: 277-85, 2012. 査読有
- ⑨ Kimura T, Yamamoto E, Yamano HO, Suzuki H, Kamimae S, Nojima M, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Takagi R, Kato R, Harada T, Suzuki R, Maruyama R, Kai M, Imai K, Shinomura Y, Sugai T, Toyota M. A novel pit pattern identifies the precursor of colorectal cancer derived from sessile serrated adenoma. *Am J Gastroenterol* 107: 460-469, 2012. 査読有
- ⑩ Ohashi H, Adachi Y, Yamamoto H, Taniguchi H, Noshō K, Suzuki H, Arimura Y, Imai K, Carbone DP, Shinomura Y. IGF-I receptor expression is associated with aggressive phenotypes and has therapeutic activity in biliary tract cancers. *Cancer Sci* 103: 252-261, 2012. 査読有
- ⑪ Okamoto Y, Sawaki A, Ito S, Nishida T, Takahashi T, Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Takeuchi I, Shinjo K, An B, Ito H, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Kataoka H, Joh T, Sekido Y, Kondo Y. Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumour. *Gut* 61: 392-401, 2012. 査読有
- ⑫ Ii M, Li H, Adachi Y, Yamamoto H, Ohashi H, Taniguchi H, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. The efficacy of IGF-I receptor monoclonal antibody against human gastrointestinal carcinomas is independent of k-ras mutation status. *Clin Cancer Res*. 17: 5048-5059, 2011. 査読有
- ⑬ Li H, Adachi Y, Yamamoto H, Min Y, Ohashi H, Ii M, Arimura Y, Endo T, Lee CT, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. Insulin-like growth factor-I receptor blockade reduces tumor angiogenesis and enhances the effects of bevacizumab for a human gastric cancer cell line, MKN45. *Cancer*. 117: 3135-3147, 2011. 査読有
- ⑭ Suzuki H, Takatsuka S, Akashi H, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Kai M, Yamano HO, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of

- microRNA genes in colorectal cancer. *Cancer Res* 71: 5646-5658, 2011. 査読有
- ⑮ Ii M, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Nakazawa M, Ohashi H, Tanuma T, Sukawa Y, Suzuki H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y. Co-expression of laminin $\beta 3$ and $\gamma 2$ chains and epigenetic inactivation of laminin $\alpha 3$ chain in gastric cancer. *Int J Oncol* 39: 593-599, 2011. 査読有
- ⑯ Sasaki S, Ishida T, Toyota M, Ota A, Suzuki H, Takaoka A, Yasui H, Yamamoto H, Takagi H, Maeda M, Seito T, Tsujisaki M, Shinomura Y, Imai K. Interferon- α/β and anti-fibroblast growth factor receptor 1 monoclonal antibody suppress hepatic cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 6: e19618, 2011. 査読有
- ⑰ Kamimae S, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Suzuki H, Ashida M, Hatahira T, Sato A, Kimura T, Yoshikawa K, Harada T, Hayashi S, Takamaru H, Maruyama R, Kai M, Nishiwaki M, Sugai T, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. Epigenetic alteration of DNA in mucosal wash fluid predicts invasiveness of colorectal tumors. *Cancer Prev Res* 4: 674-683, 2011. 査読有
- ⑱ Hizaki K, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Nakazawa M, Tanuma T, Kato N, Sukawa Y, Sanchez JV, Suzuki H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y. Epigenetic inactivation of calcium-sensing receptor in colorectal carcinogenesis. *Mod Pathol* 24: 876-884, 2011. 査読有
- ⑲ Yamamoto E, Suzuki H, Takamaru H, Yamamoto H, Toyota M, Shinomura Y. Role of DNA methylation in the development of diffuse-type gastric cancer. *Digestion* 83: 241-249, 2011. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 鈴木 亮, 山本英一郎, 鈴木拓, 丸山玲緒, 能正勝彦, 山本博幸, 野島正寛, 甲斐正広, 山野泰穂, 菅井有, 今井浩三, 篠村恭久. miR-34b/c の異常メチル化は胃癌の異時性多発リスクに関与する. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌.
- ② 鈴木 亮, 山本英一郎, 鈴木拓, 野島正寛, 丸山玲緒, 能正勝彦, 山本博幸, 甲斐正広, 山野泰穂, 菅井有, 今井浩三, 篠村恭久. microRNA-34b/c の異常メチル化は胃癌の異時性多発リスクに関与する. 第 32 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2012, 札幌.
- ③ 新沼 猛, 鈴木 拓, 野島正寛, 高丸博之, 山本英一郎, 能正勝彦, 山本博幸,

篠村恭久. GIST の悪性度マーカーおよび治療標的としての non-coding RNA. 第 8 回日本消化管学会総会学術集会. 2012, 仙台.

- ④ 新沼 猛, 鈴木 拓, 野島正寛, 高丸博之, 能正勝彦, 山本博幸, 豊田 実, 篠村恭久. 消化管間質腫瘍における microRNA 発現プロファイル解析. 第 53 回日本消化器病学会大会. 2011, 福岡.
- ⑤ 高丸博之, 鈴木 拓, 山本英一郎, 新沼 猛, 山本博幸, 有村佳昭, 豊田 実, 篠村恭久. DNA メチル化異常の網羅的な解析による新規胃癌関連遺伝子の検索. 第 53 回日本消化器病学会大会. 2011, 福岡.
- ⑥ 鈴木 亮, 山本英一郎, 鈴木 拓, 丸山玲緒, 山野泰穂, 今井浩三, 豊田 実, 篠村恭久. 胃癌におけるゲノムワイドな低メチル化と染色体不安定性. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011, 名古屋.
- ⑦ 鈴木 亮, 山本英一郎, 鈴木 拓, 丸山玲緒, 山野泰穂, 今井浩三, 豊田 実, 篠村恭久. 胃癌におけるゲノムワイドな低メチル化と染色体不安定性. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011, 名古屋.
- ⑧ 高丸博之, 鈴木 拓, 山本英一郎, 丸山玲緒, 神前正幸, 新沼 猛, 青木由佳, 澤田 武, 豊田 実, 篠村恭久. 胃癌におけるエピジェネティックな遺伝子異常の網羅的解析. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011, 名古屋.

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠村 恭久 (SHINOMURA YASUHISA)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：90162619

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鈴木 拓 (SUZUKI HIROMU)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：20381254