

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 6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790775

研究課題名（和文）肝細胞癌の進展に関するエピジェネティック異常の解明

研究課題名（英文）Epigenetic dysregulation during development of HCC

研究代表者

永江 玄太（NAGAE GENTA）

東京大学・先端科学技術研究センター・助教

研究者番号：10587348

研究成果の概要（和文）：

肝癌進展に伴う分子生物学的異常解明を目的として、結節内結節肝癌の統合的ゲノム・エピゲノム解析を行った。DNAメチル化異常の多くはOuter Noduleの段階ですでに獲得していたが、染色体コピー数変化はOuter NoduleからInner Noduleへと進展する過程で加わっていた。一部の症例では、染色体コピー数の変化が少なく、DNAメチル化の変化が数多く見られた。以上より、ゲノム異常とエピゲノム異常が段階的に加わることで悪性化が進んでいる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the molecular changes during hepatocarcinogenesis, we performed integrative genomic and epigenomic analysis of HCC progressing in a nodule-in-nodule fashion. Whereas most aberrant DNA methylation was detected already in outer nodules, additional chromosomal changes were newly observed during the progression from outer nodules to inner nodules. Some HCC show methylation-dominant changes during progression conversely. These results may suggest stepwise accumulation of both genomic and epigenomic alteration in malignant progression of HCC.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：内科学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：肝臓学、肝臓癌、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は、ウイルス感染（HBV、HCV）、アルコール摂取や脂肪沈着に伴う代謝異常など、さまざまな外的因子・環境因子により惹起される慢性炎症・線維化を背景に発症する（El-Serag HB, Gastroenterology, 2007）。この過程において、染色体コピー数変化や点突然変異などのジェネティック異常およびDNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック異常が多数蓄積している。染色体コピー数の異常については、これまで複数のグループより癌の進展過程で段階的に加

わっているのが明らかにされてきた（Midorikawa, Hepatology, 2009）。一方、DNAメチル化異常などのエピジェネティック異常については、いくつかの遺伝子に限られた報告はあるものの、その全容は明らかになっていない。この異常メチル化のパターンが肝癌発癌のどの段階で形成され、癌の進展にどのように関与しているかを解明することは、肝癌発癌・進展過程の理解とこの情報に基づいた臨床応用にも重要な意味をもつと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝細胞癌の発癌・進展過程におけるエピジェネティック異常の意義を明らかにすることである。癌細胞には DNA メチル化やヒストン修飾の異常が数多く蓄積しているが、これらが発癌のどの段階で生じ、また癌の進展過程にどう関与しているかはほとんどわかっていない。そこで本研究では、肝癌の結節内結節における進展過程におけるゲノム変異とエピゲノム変異に焦点をあてて、Outer nodule と脱分化した内部の結節 (Inner nodule) の比較検討を行う。

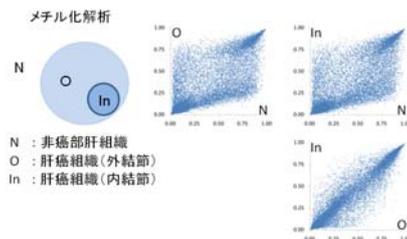
3. 研究の方法

肝癌の結節内結節 (Nodule-in-Nodule) の組織検体を用いて、DNA メチル化解析を行う。高分化型肝癌である Outer nodule と脱分化した内部の結節 (Inner nodule) および背景の非癌部肝組織のメチル化プロファイルと比較する。染色体コピー数、代表的な癌関連遺伝子の点突然変異と DNA メチル化状態、遺伝子発現パターンなどを含めた包括的な解析を行い、癌化に関連しているシグナル経路異常の探索を行った。

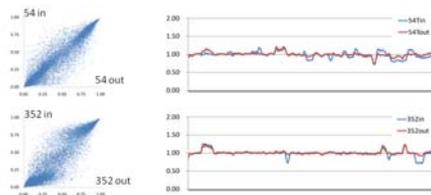
4. 研究成果

本研究課題で実施した結果により、以下のことが明らかとなった。

(1) Outer Nodule とこの内部より生じた Inner Nodule の DNA メチル化解析を行った結果、多くの DNA メチル化異常は Outer Nodule の段階ですでに獲得していることが明らかとなった。このことは、DNA メチル化異常の多くが癌化の初期段階で関与していることを示唆している。



(2) 染色体コピー数変化を比較した結果、Outer Nodule から Inner Nodule へと進展する過程で、多くの染色体異常が加わっていた。このことは、肝癌の進展過程でゲノム不安定性に伴う遺伝子異常が付加されていることを意味している。



(3) 一部の症例においては、染色体コピー数の変化が少なく、DNA メチル化の変化が数多く見られた。

(4) 遺伝子変異に関しては、Outer Nodule と Inner Nodule を比較した場合、新規に獲得された変異と検出されなくなった変異の双方が認められた。このことは、癌の悪性化に寄与している変異が増加するだけでなく、悪性化の過程で Selection も同時に進み、癌細胞の population の変化が生まれていることを意味している。

以上を総合すると、肝癌の進展過程において、ゲノム異常とエピゲノム異常がそれぞれ生じることで悪性化が進んでいる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (査読あり 8 件、査読なし 2 件)

① Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, Nagae G, Ueda K, Nakazaki K, Kamikubo Y, Eto K, Aburatani H, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood*. 2012 Jun 28;119(26):6234-42.

② Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci*. 2012 Apr;103(4):670-6.

③ Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. *Genome Res*. 2012 Feb;22(2):208-19.

④ Kaneda A, Fujita T, Anai M, Yamamoto S, Nagae G, Morikawa M, Tsuji S, Oshima M, Miyazono K, Aburatani H. Activation of Bmp2-Smad1 signal and its regulation by coordinated alteration of H3K27 trimethylation in Ras-induced senescence. *PLoS Genet*. 2011 Nov;7(11):e1002359.

⑤Isagawa T, Nagae G, Shiraki N, Fujita T, Sato N, Ishikawa S, Kume S, Aburatani H. DNA methylation profiling of embryonic stem cell differentiation into the three germ layers. PLoS One. 2011;6(10):e26052.

⑥ Matsusaka K, Kaneda A, Nagae G, Ushiku T, Kikuchi Y, Hino R, Uozaki H, Seto Y, Takada K, Aburatani H, Fukayama M. Classification of Epstein-Barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. Cancer Res. 2011 Dec 1;71(23):7187-97.

⑦Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C, Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, Ogata T, Hata K, Monk D. Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes. Hum Mol Genet. 2011 Aug 15;20(16):3188-97.

⑧Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Nonaka A, Yoshida S, Matsusaka K, Midorikawa Y, Ishikawa S, Soejima H, Fukayama M, Suemori H, Nakatsuji N, Kume S, Aburatani H. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. Hum Mol Genet. 2011 Jul 15;20(14):2710-21.

⑨永江玄太、【次世代シーケンサー 目的別アドバンスドメソッド】(第5章)エピジェネティクス解析編 ChIP-seq 解析 細胞工学(0287-3796)別冊次世代シーケンサー 目的別アドバンスドメソッド Page150-157(2012.09)

⑩永江玄太、肝細胞癌の遺伝的基盤 肝細胞癌の統合的ゲノム解析の現況、The Liver Cancer Journal(1883-9347)3 巻 1 号 Page34-39(2011.03)

[学会発表] (計10件)

①Nagae G, Midorikawa Y, Tatsuno K, Tsuji S, Yamamoto S, Tsutsumi S, Ishikawa S, Aburatani H, The 71th Japan Cancer Association Annual Meeting (International Session), Genome-wide profiling of promoter methylation identifies distinct subgroups in hepatocellular carcinoma, Sept. 20, 2012, Sapporo.

②Nagae G, Shiraki N, Kamio A, Fujita T,

Kume S, Aburatani H. Cytosine methylation dynamics during hepatic differentiation Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Epigenetics, Sept. 12, 2012, Cold Spring Harbor, NY (USA).

③永江玄太、細胞分化過程におけるシトシン修飾のダイナミクス、ADVANS 研究会 2012、2012年12月15日、東京

④Nagae G, Midorikawa Y, Tatsuno K, Tsuji S, Yamamoto S, Tsutsumi S, Ishikawa S, Aburatani H, Genome-wide profiling of promoter methylation identifies distinct subgroups in hepatocellular carcinoma、第6回日本エピジェネティクス研究会、2012年5月12日、東京

⑤Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Suemori H, Kume S, Aburatani H, Tissue-type specific hypomethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation, The 6th Asian Epigenomics Meeting, May 18, 2011, Kumamoto.

⑥Nagae G, Midorikawa Y, Tatsuno K, Tsuji S, Yamamoto S, Tsutsumi S, Ishikawa S, Aburatani H, The 70th Japan Cancer Association Annual Meeting (International Session), Genome-wide profiling of promoter methylation identifies distinct subgroups in hepatocellular carcinoma, Oct. 4, 2011, Nagoya.

⑦Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Suemori H, Kume S, Aburatani H, High-resolution profiling of DNA methylation changes during in vitro cellular differentiation, The 9th International Workshop on Advanced Genomics, July 12, 2011, Tokyo.

⑧永江玄太、砂河孝行、白木伸明、末盛博文、桑昭苑、油谷浩幸、組織分化過程における低CpGプロモーターの脱メチル化、第34回日本分子生物学会、2011年12月13日、横浜

⑨永江玄太、砂河孝行、白木伸明、末盛博文、桑昭苑、油谷浩幸、組織分化過程における低CpGプロモーターの脱メチル化、第5回日本エピジェネティクス研究会、2011年5月20日、熊本

[図書] なし

[産業財産権] なし

[その他]

ホームページ等
東京大学先端科学技術研究センター
ゲノムサイエンス分野
<http://www.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永江 玄太 (NAGAE GENTA)
東京大学先端科学技術研究センター・助教
研究者番号：10587348

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

緑川 泰 (MIDORIKAWA YUTAKA)
日本大学医学部附属病院消化器外科・助教
研究者番号：10292905