

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460487

研究課題名(和文) ヒト純化細胞を用いた肝多段階発がん過程におけるエピゲノムプロファイル解析

研究課題名(英文) Epigenome profiling of precancerous condition in hepatocarcinogenesis using purified human hepatocytes

研究代表者

新井 恵史 (Arai, Eri)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40446547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝部分切除術検体から、計31検体分の正常肝細胞ならびに非がん肝細胞を純化し得た。比較対照の組織検体と共にゲノム網羅的DNAメチル化解析を行った。HCV陽性症例はHBV陽性症例に比してDNAメチル化異常の頻度が高く、HCV陽性症例ではDNAメチル化亢進の頻度が高かった。HBV特異的プロファイルは極めて少なく、一方でHCV特異的プロファイルはゲノム全体に高頻度で認められた。組織検体と純化肝細胞の結果は概ね一致していたが、純化細胞でより顕著に観察できる特徴もあった。純化細胞を用いることでChIP-seqが可能になり、臨床情報と紐付いたヒト臨床検体のヒストン修飾パターン取得が可能になった。

研究成果の概要(英文)：Thirty-one samples of hepatocytes with precancerous and normal condition could be purified from partial hepatectomy specimens of patients with metastatic carcinoma and hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B or C viral infection. Methylome analysis was performed using Infinium HumanMethylation450k BeadChip. The incidence of DNA methylation alterations was higher at the precancerous stage of HCV-positive patients than that of HBV-positive patients. Many Infinium probes showed HCV-positive-specific DNA methylation alterations throughout the genome, by contrast to HBV-positive patient-specific ones. Although DNA methylation profile of purified hepatocytes exhibited almost similar trend with liver tissue samples, some characteristic profiles appeared significant in purified cells. Cell purification from surgical specimen enabled histone modification profiling which is applicable to personal differentiation or clinical analysis.

研究分野：病理学、エピゲノム

キーワード：エピゲノム 純化細胞 前がん状態 肝細胞がん 慢性肝炎 肝硬変 肝炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化ならびにヒストン修飾等のエピゲノム情報の異常は、遺伝子発現異常やゲノム構造異常を惹起して、発がんに寄与することが知られている。研究代表者は多数の臨床症例の病理組織検体の解析を基盤として、DNA メチル化異常ががんの臨床病理学的悪性度や症例の予後とよく相関することを明らかにし、発がんリスク診断や予後診断指標を開発してきた。特に、慢性肝炎・肝硬変症等前がん段階での網羅的 DNA メチル化解析に基づき、慢性肝疾患で経過観察中の患者における肝発がんリスク診断法の開発等を行っている [Arai et al. Int J Cancer, 2009、Nagashio et al. Int J Cancer, 2011]。このような研究過程で、以下のようなブレイクスルーが必要であると研究代表者は考えた。

(1) エピゲノム情報には組織・細胞系毎に多様性があるので、がん組織と対照組織の解析のみでは構成細胞の相違を検出してしまいう可能性がある。病理組織検体から腫瘍血管内皮細胞・間質細胞等を排除し、目的細胞のみのエピゲノムプロファイルを取得したい。
(2) ヒストン修飾は DNA メチル化とならぶ重要なエピゲノム情報でありながら、クロマチン免疫沈降 (ChIP) における技術的困難さから、その解析は培養細胞に限定されていた。株化機構に左右されず、個体差や臨床情報との詳細な対応を可能にするためには、臨床組織検体からの目的細胞の純化が必要である。
(3) ウイルス感染や炎症がエピジェネティクス異常を惹起する分子機構には未だ不明な点が多い。がんの前駆細胞がまだクローナルな増殖を開始していない前がん段階にあって、偶然生じた DNA メチル化異常が選択されて蓄積したものとは考えにくく、多段階発がんの早期に領域特異的・塩基配列特異的な DNA メチル化異常を生じさせる分子機構があると考えの方がより自然である。特定の部位の DNA メチル化プロファイルを用いた発がんリスク診断や、異常 DNA メチル化を生じる分子を標的としたエピジェネティック治療の開発には、発がん過程における DNA メチル化異常をもたらず分子機構の解明が必要であり、そのためには、共通配列解析等に応用可能なより高解像度なエピゲノムプロファイルを手入れしたい。

以上の点でブレイクスルーを図るために、国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (International Human Epigenome Consortium

[IHEC]) における経験・情報・技術の活用を考えた。IHEC は、標準エピゲノムの多様性を把握し人類共有の研究基盤としてのエピゲノムデータベースを構築するために創設されたものである

(<http://www.ihec-epigenomes.org/>)。研究代表者の所属する研究室は、IHEC 日本チームとして正常肝細胞・胃粘膜細胞・大腸粘膜細胞等の標準エピゲノムプロファイル決定を担当している。この過程で研究代表者は、手術検体のコラゲナーゼ灌流等による正常肝細胞純化技術・純化肝細胞における ChIP 解析等を獲得・蓄積でき、本研究において比較対照とすべき正常肝細胞におけるゲノム網羅的標準エピゲノムプロファイルを誰よりも早く入手し参照できる。

2. 研究の目的

本研究では、肝炎ウイルス感染・アルコール性肝障害・非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 等を背景とする、肝細胞がんに対する前がん段階にある肝細胞を純化し、ゲノム網羅的 DNA メチル化解析・ヒストン修飾解析を施行する。肝多段階発がん過程早期から起こるエピゲノムプロファイル異常を包括的に把握し、特に病因特異的・塩基配列特異的にエピゲノム異常が惹起される分子機構の理解を進めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 国立がん研究センター中央病院において肝部分切除術を受けた症例より、同意を得て新鮮組織を採取し、コラゲナーゼ灌流と低速遠心によって肝細胞を純化する。転移性肝がん症例から脂肪化や線維化、炎症細胞浸潤のない正常肝細胞を、HBV または HCV 感染を伴う肝細胞がん症例から慢性肝炎・肝硬変症の状態にある非がん肝細胞を採取する。
(2) 高密度ビーズアレイによってゲノム網羅的 DNA メチル化プロファイルを取得する。
(3) 比較対照として、既に収集済みの正常ならびに慢性ウイルス性肝炎・肝硬変症の肝組織検体のゲノム網羅的 DNA メチル化プロファイルを取得する。
(4) バイオインフォマティクスと共同し、統計学的解析を行う。組織検体と純化細胞検体の DNA メチル化データを比較し、その再現性と差違について評価する。発がんに寄与する DNA メチル化異常は、がんも解析する組織検体によって抽出し、前がん状態の組織検体に生じる異常が純化細胞にも再現されるか評価する。

(5) HBV・HCV 陽性肝細胞がん症例から得られた純化肝細胞の、次世代シーケンサによる全ゲノム DNA メチル化プロファイル取得、ChIP-seq によるヒストン修飾プロファイル取得を行う。IHEC プロジェクトによる正常純化肝細胞の標準プロファイルと比較し、前がん状態にある純化肝細胞のエピゲノム異常について評価する。

4. 研究成果

(1) 肝細胞の純化とビーズアレイによるゲノム網羅的 DNA メチル化プロファイル解析

転移性肝がんならびに HBV・HCV 陽性肝細胞がんに対する肝部分切除術検体から、正常肝組織ならびに非がん肝組織から、計 31 検体分の肝細胞を純化した。収集した肝細胞から、フェノール・クロロホルム法と透析法によって高分子量 DNA を抽出した。これら純化肝細胞由来 DNA を用いて、高密度ビーズアレイである Infinium HumanMethylation450k BeadChip を用いたゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行った。

(2) 肝組織検体のゲノム網羅的 DNA メチル化プロファイル解析と純化肝細胞との比較

純化肝細胞の DNA メチル化プロファイルと比較するために、既に収集済みの凍結肝組織検体のゲノム網羅的 DNA メチル化データを取得した。転移性肝がん症例の正常肝組織 36 検体、肝細胞がん症例の非がん肝組織 36 検体、肝細胞がん組織 24 検体について、Infinium HumanMethylation450 BeadChip 解析を行った。非がん肝組織において正常肝組織に比してすでに生じ、その異常が肝細胞がんに継承される DNA メチル化の変化を示す CpG 部位を 21,106CpG 検出した。肝細胞がん症例には HBV 陽性症例・HCV 陽性症例の双方を含むように選択し、肝炎ウイルス毎に肝発がんに寄与する可能性のある DNA メチル化の変化を検出した。HCV 陽性症例は HBV 陽性症例に比して DNA メチル化異常の頻度が高く、HCV 陽性症例では DNA メチル化亢進の頻度が高いことがわかった。HBV 特異的プロファイルは極めて少なく、一方で HCV 特異的プロファイルはゲノム全体に高頻度で認められた。

凍結組織組織と純化細胞による結果を比較すると、HBV 陽性例の純化細胞において全体的な DNA メチル化減弱と CpG アイランドの DNA メチル化亢進のパターンが顕在化した点が異なっていたが、ゲノム全体を俯瞰した DNA メチル化パターンにおいては純化細胞と凍結組織に大きな差異はなかった。顕在化し

た部分は、標的細胞を純化して血管内皮細胞等の混入を排除したことによる成果と考えられ、ゲノム上の領域によっては、肝細胞の純化が解析に必須となる可能性が懸念される。一方で、凍結組織を使用した解析でもある程度までは有意な結果を得ることが可能であり、速やかに多数の検体を利用したい場合、症例の予後評価のために術後一定以上の時間の経った症例を解析対象としたい場合等において、バイオバンク等から取得した組織検体を利用することも有用であると考えられた。

(3) 純化肝細胞によるヒストン修飾プロファイル解析

HBV 陽性・HCV 陽性肝細胞がん症例各 1 例の背景非がん肝組織から純化した肝細胞を用いて、全ゲノムバイサルファイトシーケンシングならびに H3K4me1・H3K4me3・H3K27Ac・H3K36me1・H3K27me・H3K9me1 の 6 種類のヒストン修飾に対する ChIP-seq を行った。本研究と併行して行われた IHEC プロジェクトによって取得した、正常肝細胞の同データをリファレンスとした。

ウイルス感染を伴う肝細胞では、正常肝細胞における個体差を遥かに凌駕する DNA メチル化変化があった。ウイルス種による DNA メチル化変化の差異を比較すると、HBV 感染肝細胞に比して HCV 感染肝細胞ではより多くの DNA メチル化変化が蓄積していた。HBV 感染肝細胞では DNA メチル化亢進が、HCV 感染肝細胞では DNA メチル化減弱が目立っていたが、HBV 感染肝細胞においても CpG アイランドでは DNA メチル化亢進が優位であった。個体差が少なく、DNA メチル化の変化から何らかの機序で保護されているとみられる転写開始点から 200bp 以内や第 1 エクソンにおいても、HCV 感染肝細胞では DNA メチル化の変化がみられ、保護機序の破綻が推察された。

HCV 陽性肝細胞では、HBV 陽性肝細胞に比して DNA メチル化異常の頻度が高く、かつ DNA メチル化亢進の頻度が高かった。これは組織検体の場合(成果 4.(1))と一致していた。

組織検体の Infinium ビーズアレイ解析データより特定した、HCV 陽性肝細胞がんにおいて前がん状態より生じがんに受け継がれる DNA メチル化異常を示す CpG 部位のヒストン修飾状態を、純化肝細胞によって確認したところ、H3K4me1 と K27Ac がより集積していた。HCV 陽性肝発がんに寄与す

る DNA メチル化異常に先行するのは K4me1+K27Ac の active マークの可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Arai E (16 人中 1 人目), Gotoh M (16 人中 2 人目), Tian Y et al. Alterations of the spindle checkpoint pathway in clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. *Int J Cancer*, 137: 2589-606, 2015. DOI: 10.1002/ijc.29630. 査読有
2. Robles AI, Arai E (22 人中 2 人目), Mathé EA et al. An Integrated Prognostic Classifier for Stage I Lung Adenocarcinoma Based on mRNA, microRNA, and DNA Methylation Biomarkers. *J Thorac Oncol*, 10: 1037-48, 2015. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000560. 査読有
3. Yamanoi K, Arai E (14 人中 2 人目), Tian Y et al. Epigenetic clustering of gastric carcinomas based on DNA methylation profiles at the precancerous stage: its correlation with tumor aggressiveness and patient outcome. *Carcinogenesis*, 36: 509-20, 2015. DOI: 10.1093/carcin/bgv013. 査読有
4. Sato T, Soejima K, Arai E (10 人中 3 人目) et al. Prognostic implication of PTPRH hypomethylation in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 34: 1137-45, 2015. DOI なし. 査読有
5. Narukawa T, Hara T, Arai E (7 人中 3 人目) et al. Tumour multifocality and grade predict intravesical recurrence after nephroureterectomy in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma without a history of bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 45: 488-93, 2015. DOI: 10.1093/jjco/hyv019. 査読有
6. Arai E (15 人中 1 人目), Sakamoto H, Gotoh M (15 人中 6 人目) et al. Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome. *Int J Cancer*, 135: 1330-42, 2014. DOI: 10.1002/ijc.28768. 査読有
7. Kanai Y, Arai E. Multilayer-omics analyses of human cancers: exploration of biomarkers and drug targets based on the activities of the International Human Epigenome Consortium. *Front Genet*, 5: 24, 2014. DOI: 10.3389/fgene.2014.00024. 査読有
8. Sato T, Arai E (10 人中 2 人目), Kohno T et al. Epigenetic clustering of lung adenocarcinomas based on DNA methylation profiles in adjacent lung tissue: Its correlation with smoking history and chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Cancer*, 135: 319-34, 2014. DOI: 10.1002/ijc.28684. 査読有
9. Tian Y, Arai E (6 人中 2 人目), Gotoh M (6 人中 3 人目) et al. Prognostication of patients with clear cell renal cell carcinomas based on quantification of DNA methylation levels of CpG island methylator phenotype marker genes. *BMC Cancer*, 14: 772, 2014. DOI: 10.1186/1471-2407-14-772. 査読有
10. Gotoh M (11 人中 1 人目), Ichikawa H, Arai E (11 人中 3 人目) et al. Comprehensive exploration of novel chimeric transcripts in clear cell renal cell carcinomas using whole transcriptome analysis. *Genes Chromosomes Cancer*, 53: 1018-32, 2014. DOI: 10.1002/gcc.22211. 査読有
11. Takaki Y, Saito Y, Arai E (13 人中 10 人目) et al. Silencing of microRNA-122 is an early event during hepatocarcinogenesis from non-alcoholic steatohepatitis. *Cancer Sci*, 105: 1254-60, 2014. DOI: 10.1111/cas.12498. 査読有
12. Sato T, Arai E (8 人中 2 人目), Kohno T et al. DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. *PLoS One*, 8: e59444, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0059444. 査読有
13. Nakagawa T, Hara T, Arai E (9 人中 7 人目) et al. Prognostic risk stratification of patients with urothelial carcinoma of the bladder with recurrence after radical cystectomy. *J Urol*, 189: 1275-81, 2013. DOI: 10.1016/j.juro.2012.10.065. 査読有

14. Matsuzaki J, Suzuki H Arai E (13人中6人目) et al. Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. *Gastroenterology*, 145:1300-11, 2013. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.08.008. 査読有
15. Hara T, Nakanishi H, Arai E(10人中8人目) et al. Ability of preoperative 3.0-Tesla magnetic resonance imaging to predict the absence of side-specific extracapsular extension of prostate cancer. *Int J Urol*, 20:993-9, 2013. DOI: 10.1111/iju.12091. 査読有

[学会発表](計 22件)

1. Arai E(15人中1人目), Miura F, Gotoh M(15人中6人目) et al. Epigenome landscape of human normal purified hepatocytes and genome-epigenome interaction analysis by the International Human Epigenome Consortium (IHEC). Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics. 2016年2月16日～20日. Maui(USA).
2. Arai E(13人中1人目), Miura F, Gotoh M(13人中6人目) et al. Reference epigenome mapping of hepatocytes: participation in International Human Epigenome Consortium (IHEC). 第74回日本癌学会学術総会. 2015年10月8日～10日. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).
3. 新井恵史(7人中1人目)、田迎、後藤政広(7人中3人目)他. Epigenome alterations in precancerous conditions associated with hepatitis virus infection. 第104回日本病理学会総会. 2015年4月30日～5月2日. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).
4. Arai E (7人中1人目), Tian Y, Gotoh M (7人中3人目) et al. Genome-wide DNA methylation analysis in precancerous conditions associated with hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. American Association of Cancer Research Annual Meeting 2015. 2015年4月18日～22日. Philadelphia (USA).
5. 新井恵史(9人中1人目)、高橋順子、坂本裕美他. 逆行分析前方シミュレーションモデルを用いた腎細胞がんのバイオマーカーならびに治療標的分子の同定. 第73回日本癌学会学術総会. 2014年9月25日～27日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
6. 後藤政広(11人中1人目)、市川仁、新井恵史(11人中3人目)他. 腎細胞がんに発現する新規融合遺伝子の同定. 第73回日本癌学会学術総会. 2014年9月25日～27日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
7. 佐藤崇、副島研三、新井恵史(13人中3人目)他. 非小細胞肺がんにおける PTPRH の DNA 低メチル化と予後への関与. 第73回日本癌学会学術総会. 2014年9月25日～27日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
8. 新井恵史(9人中1人目)、坂本裕美、尾野雅哉他. CpG アイランドメチル化形質陽性腎臓明細胞がんの多層的オミックス解析. 第103回日本病理学会総会. 2014年4月24日～26日. 広島国際会議場(広島県広島市).
9. 田迎、新井恵史(5人中2人目)、後藤政広(5人中3人目)他. CpG アイランドメチル化形質陽性腎臓がんの DNA メチル化診断法の開発. 第72回日本癌学会学術総会. 第103回日本病理学会総会. 2014年4月24日～26日. 広島国際会議場(広島県広島市).
10. 後藤政広(9人中1人目)、市川仁、新井恵史(9人中3人目)他. 腎臓がんが発現する新規融合遺伝子の同定. 第103回日本病理学会総会. 2014年4月24日～26日. 広島国際会議場(広島県広島市).
11. 山ノ井一裕、新井恵史(8人中2人目)、高橋順子他. 胃がん症例の非がん胃粘膜における DNA メチル化プロファイルが、がんの悪性度・症例の予後と相関する. 第103回日本病理学会総会. 2014年4月24日～26日. 広島国際会議場(広島県広島市).
12. Arai E(9人中1人目), Sakamoto H, Gotoh M(9人中7人目) et al. Multilayer omics analysis in CpG island methylator phenotype clear cell carcinomas. American Association of Cancer Research Annual Meeting 2014. 2014年4月5日～9日. San Diego (USA).
13. Yamanoi K, Arai E(8人中2人目), Takahashi Y et al. Epigenetic clustering of gastric carcinoma based on DNA methylation profiles at the precancerous stage: its correlation with tumor aggressiveness and patient outcome. American Association of Cancer Research Annual Meeting 2014. 2014年4月5日～9日. San Diego (USA).
14. Yamanoi K, Arai E(8人中2人目),

Takahashi Y et al. Epigenetic clustering of gastric carcinoma based on DNA methylation profiles at the precancerous stage: its correlation with tumor aggressiveness and patient outcome. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. 2013年12月16日～18日.東京ベイ舞浜ホテル(千葉県舞浜市).

15. Arai E(11人中1人目), Miura F, Gotoh M(11人中8人目) et al. Epigenome mapping in purified human hepatocytes. IHEC Annual Meeting 2013. 2013年11月10日～12日. Berlin (Germany)

16. 新井恵史(11人中1人目)、坂本裕美、尾野雅哉他. CpG アイランドメチル化形質陽性腎細胞がんの多層的オミックス解析. 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月3日～5日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

17. 田迎、新井恵史(5人中2人目)、後藤政広(5人中3人目)他. CpG アイランドメチル化形質マーカー遺伝子の DNA メチル化レベルを指標とする腎細胞がんの予後診断法の開発. 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月3日～5日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

18. 新井恵史(10人中1人目)、坂本裕美、尾野雅哉他. 腎細胞癌の多層的オミックス解析. 第102回日本病理学会総会. 2013年6月6日～8日. ロイトン札幌 (北海道札幌市)

19. 新井恵史(10人中1人目)、坂本裕美、尾野雅哉他. 腎細胞がんの多層的オミックス解析. 第7回日本エピジェネティクス研究会年会. 2013年5月30日～31日. 奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

20. 田迎、新井恵史(5人中2人目)、後藤政広(5人中3人目)他. CpG アイランドメチル化形質陽性腎細胞がんの DNA メチル化診断法の開発. 第7回日本エピジェネティクス研究会年会. 2013年5月30日～31日. 奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

21. Arai E(13人中1人目), Sakamoto H, Gotoh M(13人中5人目) et al. Multilayer-Omics (Whole-Exome, Methylome and Transcriptome) Analysis Identifies the Wnt/ -catenin Pathway as a Key Player in the Development of Renal Cell Carcinoma. American Association of Cancer Research Annual Meeting 2013. 2013年4月7日～10日. Washington DC (USA)

22. Sato T, Arai E(8人中2人目), Kohno T et

al. DNA methylation profiles at precancerous stage cluster lung adenocarcinomas into subclusters associated with carcinogenic pathway, clinicopathological aggressiveness and patient outcome. American Association of Cancer Research Annual Meeting 2013. 2013年4月7日～10日. Washington DC (USA)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ
http://www.keio-pathology.net/eri_arai.html
<http://www.nccri.ncc.go.jp/jimu/030/010/20151210154337.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 恵史 (ARAI, Eri)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 40446547

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

後藤 政広 (GOTOH, Masahiro)
国立研究開発法人国立がん研究センター
研究所・主任研究員
研究者番号: 00291138