

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18789

研究課題名(和文) イヌのリンパ腫におけるDNAメチル化のゲノムワイド解析 機序解明と臨床応用

研究課題名(英文) Genome-wide analysis of DNA methylation in canine lymphoma

研究代表者

山崎 淳平 (YAMAZAKI, JUMPEI)

北海道大学・獣医学研究科・助教

研究者番号：20732902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：イヌリンパ腫細胞株5株に関し、次世代シーケンサーによる解析を行ったところ、約100,000CpGサイトのDNAメチル化の定量的な解析が可能であった。また、正常血液サンプルとリンパ腫細胞株の区別が可能であった。さらに、各々のリンパ腫細胞株において1000～4000個の高メチル化部位、および3000～10,000個の低メチル化部位が発見された。これらのうち、特に高メチル化部位の近傍には腫瘍に関連すると考えられる遺伝子が認められた。イヌのリンパ腫自然発症例24例についても同様の解析・検討を行ったところ、DNAメチル化のグループ分けが予後因子となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Next-generation sequencing for 5 canine lymphoma cell lines was found to be quantitative so that 100,000 CpG sites could be analyzed. It also showed clearly difference in DNA methylation patterns between lymphoma cell lines and normal lymphocytes. We identified 1000-4000 hypermethylated and 3000-10000 hypomethylated CpG sites in each cell line. Genes known to be involved in tumor were found to be located close to the CpG sites hypermethylated in the cell lines. The analysis for 24 spontaneous lymphoma cases indicated that DNA methylation pattern could be prognostic factor in canine lymphoma.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNAメチル化 エピジェネティクス リンパ腫

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ腫はイヌにおいて最も発生率が高い腫瘍であるが原因については不明な点が多い。

エピジェネティックなメカニズムの研究はこの10年ほどで大幅に進歩したが、獣医領域における知見は非常に乏しい。また近年の次世代シーケンサーの発達は疾患のメカニズム解明に大きな影響を与えているが、獣医領域での汎用はされていない。

## 2. 研究の目的

イヌのリンパ腫におけるメカニズムの解明は重要な命題であり、治療成績の向上を目指すためにはこの疾患の全容解明が必須である。そこで、DNAメチル化のイヌゲノムワイド解析を行うことによってイヌのリンパ腫特異的な変化を検出し、将来的なイヌのリンパ腫のさらなるメカニズムの解明への手がかりとすることだけでなく、このイヌのリンパ腫特異的なDNAメチル化の変化を診断などへ応用することによって、臨床に有益な情報を与える。具体的な目的は以下の3点。

1. イヌのリンパ腫由来細胞株および正常犬由来リンパ球を用いて DNA メチル化のゲノムワイド解析法の樹立およびその有効性の検討を行う
2. イヌのリンパ腫自然発症例の腫瘍細胞を用いて、イヌのリンパ腫特異的な DNA メチル化の変化の検出を行う
3. 認められた DNA メチル化の変化のバイオマーカーとしての応用の検討および腫瘍発生のメカニズムへの関与の検討を行う

## 3. 研究の方法

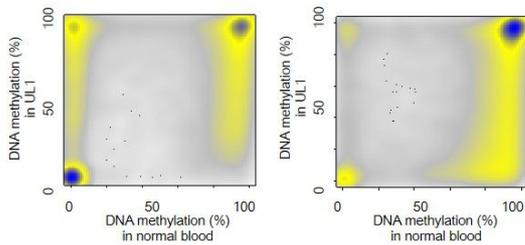
DNA メチル化のゲノムワイド解析法である Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation (DREAM)法 をイヌゲノム DNA へ応用し、約 100,000 箇所の DNA メチル化の程度を定量化する。 正常犬由来リンパ球およ

びイヌリンパ腫細胞株について検討し、DREAM 法の有効性を確認する。また、イヌのリンパ腫症例 20-30 症例に対して DREAM 法を適用、プロモーター領域だけでなく遺伝子内のエクソンやイントロン、または遺伝子外の部分の CpG サイトについて検討を行う。

## 4. 研究成果

イヌリンパ腫細胞株 5 株より DNA を抽出、制限酵素処理を行った後、アダプター結合から PCR を行うことによって、次世代シーケンサーに最適な目的のサイズを持ったライブラリを作製した。次世代シーケンサーによる解析を行ったところ、全ての検体において約 100,000 CpG サイトの DNA メチル化の定量的な解析が可能であった。実際にこれらの配列を用いて解析をおこなったところ、DNA メチル化状態の類似性によって分類した結果、正常血液サンプルとリンパ腫細胞株の区別が可能であり、また、リンパ腫細胞株間においても異なる DNA メチル化状態が存在することが示された。さらに、各々のリンパ腫細胞株において 1000 ~ 4000 個の高メチル化部位、および 3000 ~ 10,000 個の低メチル化部位が発見された(図)。これらのうち、特に高メチル化部位の近傍には腫瘍に関連すると考えられる遺伝子が認められた。

さらに、イヌのリンパ腫自然発症例 24 例についても同様の解析・検討を行ったところ、症例によって異なるゲノムワイドな DNA メチル化の変化が検出され、これを用いてグループ分けすることによって、臨床的なパラメータと独立した予後因子となる可能性が示された。



図

DNA メチル化レベルの比較 (リンパ腫細胞株 UL1 と正常リンパ球) 左: CpG アイランド上のサイト 右: non-CpG アイランド上のサイト

## 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 7 件)

1. Tahara T\*, Yamazaki J\*, Sayumi Tahara, Masaaki Okubo, Tomohiko Kawamura, Noriyuki Horiguchi, Takamitsu Ishizuka, Mitsuo Nagasaka, Yoshihito Nakagawa, Tomoyuki Shibata, Makoto Kuroda, and Naoki Ohmiya (2017) Magnifying narrow-band imaging of gastric mucosal morphology predicts the H. pylori-related epigenetic field defect. *Sci. Rep.* in press \*Equally contributed (査読有り)

2. Yamazaki J, Taby R, Jelinek J, Raynal NJ, Cesaroni M, Pierce SA, Kornblau SM, Bueso-Ramos CE, Ravandi F, Kantarjian HM, Issa JP (2016) Hypomethylation of TET2 target genes identifies a curable subset of acute myeloid leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 108: djv323 doi: 10.1093/jnci/djv323 (査読有り)

3. Yamazaki J, Jelinek J, Lu Y, Cesaroni M, Madzo J, Neumann F, He R, Taby R, Vasanthakumar A, Macrae T, Ostler KR,

Kantarjian HM, Liang S, Estecio MR, Godley LA, Issa JP (2015) TET2 mutations affect non-CpG island DNA methylation at enhancers and transcription factor binding sites in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Res.* 75:2833-43 (査読有り)

4. Kelly AD, Kroeger H, Yamazaki J, Taby R, Neumann F, Yu S, Lee JT, Patel B, Li Y, He R, Liang S, Lu Y, Cesaroni M, Pierce SA, Kornblau SM, Bueso-Ramos CE, Ravandi F, Kantarjian HM, Jelinek J, Issa JP (2017) A CpG island methylator phenotype in acute myeloid leukemia independent of IDH mutations and associated with a favorable outcome. *Leukemia* in press doi: 10.1038/leu.2017.12 (査読有り)

5. Yokoyama N, Ohta H, Yamazaki J, Kagawa Y, Ichii O, Khoirun N, Morita T, Osuga T, Lim SY, Sasaki N, Morishita K, Nakamura K, Takiguchi M (2016) Localization of TLR2 and TLR4 mRNA in the colorectal mucosa of miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps. *J. Comp. Pathol.* in press (査読有り)

6. Tahara T, Shibata T, Okamoto Y, Yamazaki J, Kawamura T, Horiguchi N, Okubo M, Nakano N, Ishizuka T, Nagasaka M, Nakagawa Y, Ohmiya N (2016) Mutation spectrum of TP53 gene predicts clinicopathological features and survival of gastric cancer. *Oncotarget* 7: 42252-42260 (査読有り)

7. Malouf GG, Tahara T, Paradis V, Fabre M, Guettier C, Yamazaki J, Long H, Lu Y, Raynal NJ, Jelinek J, Mouawad R, Khayat D,

Brugières L, Raymond E, Issa JP (2015)  
Methylome sequencing for fibrolamellar  
hepatocellular carcinoma depicts  
distinctive features. *Epigenetics*  
10:872-81 (査読有り)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 久本 真也, 山崎 淳平, 稲葉 睦 イ  
ヌにおける DNA メチル化のゲノムワイド解  
析法の樹立 第13回 日本獣医内科学アカ  
デミー学術大会 2017年2月 パシフィコ横  
浜(神奈川県、横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 淳平 (YAMAZAKI, JUMPEI )

北海道大学・獣医学研究科・助教

研究者番号: 20732902

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし