

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2007～2008

課題番号: 19591607

研究課題名(和文) DNA メチル化により制御される大腸癌肝転移を規定する遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文) Genome-wide Analysis of Hypermethylated Genes in Colon Cancer with Liver Metastasis.

研究代表者

佐野 力 (SANO TSUYOSHI)

愛知県がんセンター(研究所)分子腫瘍学部・研究員

研究者番号: 60303632

研究成果の概要: DNA メチル化は、遺伝子の発現抑制を介してがんの発生・進展に関与している。本研究は大腸がんの肝転移に関わる遺伝子のうち、特に DNA メチル化により制御される遺伝子の網羅的解析を行ない、大腸がんの肝転移に関与する遺伝子の同定と、新しい肝転移診断マーカーの開発を目指した。まず DNA メチル化標的遺伝子の網羅的解析法として、(Methylated CpG island Amplification-マイクロアレイ法; MCAM 法)を用いて、大腸がん原発巣(CRC)および転移巣(meta)の DNA メチル化標的遺伝子のプロファイリングを行った。大腸がんは MCAM 法により DNA メチル化が腫瘍内に集積する CpG island methylator phenotype (CIMP)症例と CIMP 陰性症例に分類可能であった。CIMP 陽性症例と陰性症例では肝転移の頻度には有意な差は認めなかった。CIMP 陽性・陰性症例で正常粘膜の DNA メチル化を、大腸の部位別に詳細に解析し、大腸がんの発がん過程における DNA メチル化の蓄積は大腸の部位によって異なる様相を呈することを見出した。すなわち近位部大腸に関与が深い CIMP 陽性症例に対し、遠位部大腸では DNA メチル化蓄積は年齢と強い相関を認め、その蓄積が発がんに関与していると考えた。次に 9 例の手術症例で同一患者の CRC と meta の組織から DNA を抽出した。これらの症例は CRC では CIMP 陽性例 2 例、CIMP 陰性例 7 例であった。全症例の平均では、CRC 特異的、meta 特異的、両者共通メチル化遺伝子は 568 遺伝子、579 遺伝子、515 遺伝子であった。これらの遺伝子のうち複数症例で共通してメチル化した遺伝子を選択し、研究期間内に蓄積した症例を用いて肝転移巣に特異的なメチル化標的遺伝子の解析を行なっている。以上の結果と臨床病理学的背景との相関から、大腸がんの肝転移に関与する遺伝子の同定と、新しい肝転移診断マーカーの開発に結びつけることが期待できる。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード: 大腸がん、DNA メチル化、マイクロアレイ、肝転移

1. 研究開始当初の背景

大腸がんの肝転移に関連することが予測される遺伝子・タンパクは、国内外の多数の施設で研究されている。国内では、門田守人教授(大阪大学消化器外科)らにより、質量分析法(MALDI-TOF/MS)を用いた大腸がん肝転移に関連したプロテオーム解析の研究が行なわれている。近藤 哲教授(北海道大学腫瘍外科)、森 正樹教授(九州大学腫瘍外科)らは複数の遺伝子発現と大腸がんの肝転移の予後因子に関する研究を行なっている。また、国外では Vogelstein B 博士らが phosphate of regenerating liver-3(PRL-3)の発現が癌の転移に強く関連することを報告している。しかし、肝転移には多数の遺伝子が関与してその生物学的特性を規定することを考えると、肝転移関連遺伝子の網羅的な解析を行なうことが、肝転移を理解するうえで重要であると考えられる。

最近 DNA メチル化をはじめとするエピジェネティックな変化が、がん抑制遺伝子の不活化を介して、がんの発生・進展に重要な役割を果たすことがわかってきた。特に大腸がんでは、DNA メチル化異常の蓄積が発がん過程の一経路となる可能性が示唆されている。一方、日比健志 博士(昭和大学藤が丘病院外科)らは、血液中の P16 遺伝子の DNA メチル化検出が、大腸がんの術後肝再発の有用な予測因子となりうることを示してきた。しかし、肝転移マーカーとして P16 遺伝子の DNA メチル化のみでは不十分である。他の関連遺伝子の探索が急務であるが、これまで DNA メチル化に制御される肝転移を規定する遺伝子の網羅的解析に関してほとんど報告がない。

我々の研究グループは、DNA メチル化標的遺伝子の解析法として、プロモーターアレーを用いた効果的な方法を確立し(MCA-マイクロアレー法)、これまでに、肝細胞がんにおいて、非常に高い特異性をもって、DNA メチル化標的遺伝子が網羅的に検出できることを詳細に解析し確認した。この MCA-マイクロアレー法は、世界に先駆けて開発した方法であり、比較的少量の臨床検体にも適応できる点が特に優れている。この方法を用いて、高い独自性で大腸がんの肝転移を規定

する遺伝子の網羅的探索が可能と考える。

2. 研究の目的

DNA メチル化により制御される大腸がん肝転移を規定する遺伝子を網羅的に解析・同定し、新しい肝転移の診断マーカーの開発および、有効な治療戦略の確立を試みる。

3. 研究の方法

大腸がんの肝転移に関わる遺伝子のうち、特に DNA メチル化により制御される遺伝子の網羅的解析を行ない、大腸がんの肝転移に関与する遺伝子の同定と、新しい肝転移診断マーカーの開発を目指した。まず DNA メチル化標的遺伝子の網羅的解析法として、(Methylated CpG island Amplification-マイクロアレー法; MCAM法)を用いて、大腸がん原発巣の DNA メチル化標的遺伝子のプロファイリングを行った。

4. 研究成果

大腸がんは MCAM 法により DNA メチル化が腫瘍内に集積する CpG island methylator phenotype (CIMP)症例と CIMP 陰性症例に分類可能であった。CIMP 陽性症例と陰性症例では肝転移の頻度には有意な差は認めなかった。しかし、CIMP 陽性・陰性症例で正常粘膜の DNA メチル化を、大腸の部位別に詳細に解析し、大腸がんの発がん過程における DNA メチル化の蓄積は大腸の部位によって異なる様相を呈することを見出した。すなわち近位部大腸に関与が深い CIMP 陽性症例に対し、遠位部大腸では DNA メチル化蓄積は年齢と強い相関を認め、その蓄積が発がんに関与していると考えた(投稿中)。次に 9 例の手術症例で同一患者の CRC と meta の組織から DNA を抽出した。これらの症例は CRC では CIMP 陽性例 2 例、CIMP 陰性例 7 例であった。全症例の平均では、CRC 特異的、meta 特異的、両者共通メチル化遺伝子は 568 遺伝子、579 遺伝子、515 遺伝子であった。これらの遺伝子のうち複数症例で共通してメチル化した遺伝子を選択し、研究期間内に蓄積した症例(CRC I 期~III 期 60 例、IV 期 20 例、meta60 例)を用いて肝転移巣に特異的なメチル化標的遺伝子の解析を行なっている。以上の結果と臨床病理学的背景との相関から、大腸がんの肝転移に関与する遺伝子の同定と、新しい肝転移診断マーカーの開発に結びつける。

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 12 件)

1. Shimizu Y, Sano T, Yasui K. Predicting pleural effusion and ascites following extended hepatectomy in the non-cirrhotic liver. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:837-840.
2. Shimizu Y, Yasui K, Sano T, Hirai T, Kanemitsu Y, Komori K, Kato T. Treatment strategy for synchronous metastases of colorectal cancer: Is hepatic resection after an observation interval appropriate? *Langenbeck's Arch Surg*. 2007;392:535-538.
3. Hiramatsu K, Sano T, Nagino M, Nimura Y. Repeated hepatectomy for colonic liver metastasis presenting intrabiliary growth Application of percutaneous transhepatic portal vein embolization for impaired liver. *Hepatogastroenterology*. 2007;54:1554-1556.
4. Shimizu Y, Yasui K, Sano T, Hirai T, Kanemitsu Y, Komori K, Kato T. Validity of observation interval for synchronous hepatic metastases of colorectal cancer: changes in hepatic and extrahepatic metastatic foci. *Langenbeck's Arch Surg*. 2008;393:181-184.
5. Sano T, Shimada K, Nara S, Sakamoto Y, Kosuge T. Reconstruction of hepatic venous tributaries using a Y-shaped left portal vein graft harvested from a resected left liver. *Hepatogastroenterology*. 2008;55:228-230.
6. Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima H, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JPJ, Sekido Y. Alterations of DNA Methylation and Histone Modifications Contribute to Gene Silencing in Hepatocellular Carcinomas. *Hepatol Res*. 2007; 37 : 974-83.

7. Boumber YA, Kondo Y, Chen X, Shen L, Gharibyan V, Konishi K, Estey E, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Issa JP. RIL, a LIM gene on 5q31, is silenced by methylation in cancer and sensitizes cancer cells to apoptosis. *Cancer Res*. 2007; 67 : 1997-2005.
8. Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, Shu J, Chen X, Waterland RA, Issa JP. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *Plos Genetics*. 2007; 3 :2023-36.
9. Kondo Y, Shen L, Ahmed S, Boumber Y, Sekido Y, Haddad BR, Issa JP. Downregulation of Histone H3 Lysine 9 Methyltransferase G9a Induces Centrosome Disruption and Chromosome Instability in Cancer Cells. *PloS One*. 2008; 3 : e2037.
10. Kondo Y, Shen L, Cheng A, Ahmed S, Boumber Y, Charo C, Yamochi T, Urano T, Furukawa K, Kwabi-Addo B, Gold D, Sekido Y, Huang T, Issa JP. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 tri-methylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet*. 2008; 40 : 741-750.
11. Boumber YA, Kondo Y, Chen X, Shen L, Guo Y, Tellez C, Estécio MR, Ahmed S, Issa JP. An Sp1/Sp3 binding polymorphism confers methylation protection. *PLoS Genet*. 2008; 4 : e1000162.
12. Gao W, Kondo Y, Shen L, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Natsume A, Goto Y, Ito M, Murakami H, Osada H, Zhang J, Issa JPJ, Sekido Y. Variable DNA Methylation Patterns Associated with Progression of Disease in Hepatocellular Carcinomas. *Carcinogenesis*. 2008; 29 : 1901-10.

[学会発表](計 7 件)

1. An B, Kondo Y, Goto Y, Murakami H, Osada H, Sano T, Sekido Y. Genomewide DNA Methylation Analyses in Cancerous and Adjacent Tissues from Hepatocellular Carcinoma Patients. 第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2007.10.4

2. Gao W, Kondo Y, Shen L, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Natsume A, Goto Y, Ito M, Murakami H, Osada H, Issa J, Sekido Y. Variable DNA Methylation Patterns Associated with Progression of Disease in Hepatocellular Carcinoma. The 2nd Shanghai Symposium of Epigenetics in Development and Diseases and The 3rd Annual Meeting of Asian Epigenome Alliance (Shanghai) 2008.7.6

3. Sano T, Shimizu Y, Senda Y, Ando M, Nimura Y. Hepatobiliary resection for metastatic rectal cancer with an expandable metallic stent for obstructive jaundice. The second biennial congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association, 2009/3/25-3/29 Bangkok, Thailand.

4. Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Nimura Y. Treatment strategy for synchronous metastases of colorectal cancer: Is hepatic resection after an observation interval appropriate? Digestive Disease Week 2008, 2008 San Diego, USA.

5. 清水泰博、佐野 力、山村義孝、平井 孝、金光幸秀、伊藤誠二、望月能成、小森康司、安藤公隆、加藤知行. 大腸癌同時性肝転移に対する治療戦略—待期による肝切除成績と治療法選択の変化—第 62 回 日本消化器外科学

会総会 2007 シンポジウム

6. 名嶋弥菜、稲葉吉隆、山浦秀和、佐藤洋造、清水泰博、佐野 力、谷田部 恭. 化学療法後の大腸癌肝転移切除例における術前画像診断と病理学的所見の検討. 第 6 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2008/3/20-21 福岡

7. 清水泰博、佐野 力、千田嘉毅、安藤公隆、山村義孝、平井 孝、金光幸秀、伊藤誠二、望月能成、小森康司、加藤知行、二村雄次. 大腸癌同時性肝転移に対する治療戦略—待機による肝切除成績と今後の展望—第 63 回日本消化器外科学会総会 シンポジウム 03 肝転移巣摘除のタイミング 2008/7/17

[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]

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐野 力(SANO TSUYOSHI)

愛知県がんセンター(研究所)分子腫瘍学部・研究員

研究者番号:60303632

(2)研究分担者

近藤 豊(KONDO YUTAKA)

愛知県がんセンター(研究所)分子腫瘍学部・室長

研究者番号:00419897

(3)連携研究者

清水泰博(SHIMIZU YASUHIRO)

愛知県がんセンター(研究所)分子腫瘍学部・研究員

研究者番号:40470166