

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390096

研究課題名(和文) 前がん状態においてDNAメチル化異常を惹起する分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of DNA methylation alterations in precancerous conditions

## 研究代表者

金井 弥栄 (Kanai, Yae)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：00260315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：多数の組織検体の分子病理学的解析をもとに、多段階発がん早期の前がん状態において、DNAメチル化異常を惹起する分子機構の理解を進めることを目指した。予後不良であるCpGアイランドメチル化形質陽性腎細胞がん症例で、ヒストンメチル化酵素・ヒストン脱メチル化酵素・ヒストンアセチル化酵素等の異常を認めた。H3K4トリメチル化・H3K27アセチル化修飾は、慢性肝炎・肝硬変症の段階で、DNAメチル化異常に先行して起こる可能性がある。前がん段階においてヒストンメチル化酵素等の異常を介してヒストン修飾異常が生じ、DNAメチル化によって固定されがんに継承されてがんの悪性度を規定すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to understand molecular mechanisms of DNA methylation alterations in precancerous conditions. Multi-layer omics abnormalities of histone methyltransferase, histone demethylase and histone acetyltransferase were observed in CpG islands methylator phenotype-positive renal cell carcinomas. H3K4me3 and H3K27Ac modifications preceded DNA methylation alterations at the chronic hepatitis and liver cirrhosis stages which are widely considered to be precancerous conditions for hepatocellular carcinomas. Histone modification alterations based on abnormalities of histone modification enzymes may be fixed due to DNA methylation alterations during multistage carcinogenesis and may determine aggressiveness of cancers.

研究分野：腫瘍病理学、発がんエピジェネティクス

キーワード：DNAメチル化 ヒストン修飾 前がん状態 腎がん 肝がん

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、世界的な研究の潮流に先駆けて、DNA メチル化異常の意義にいち早く注目し、DNA メチル化亢進によって不活化されるがん抑制遺伝子が Rb・VHL のみしか知られていなかった当時、ヒトのがんで E-カドヘリンがん抑制遺伝子がプロモーター領域の DNA メチル化で不活化される事実を初めて報告した。前がん状態で DNA メチル化異常が好発することを世界で最も早く指摘し、慢性炎症や喫煙等の発がんの背景要因と DNA メチル化異常の関連を詳細に記載してきた。DNA メチル化異常を伴う前がん状態から、より悪性度の高いがんを生じる可能性を提唱した。DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT)1 の発現亢進が、がん関連遺伝子の DNA メチル化亢進の蓄積や臨床病理学的悪性度と有意に相関して、症例の予後不良因子になることを示した。DNMT3b の不活性型バリエーション DNMT3b4 の発現亢進が、傍セントロメアサテライト領域の DNA メチル化減弱を惹起して染色体不安定性に帰結する分子機構を明らかにしてきた。研究開始時には、BAC アレイを基盤とするゲノム網羅的スクリーニング法により、発がんリスク診断・がんの存在診断・病態診断・予後診断指標となる DNA メチル化プロファイルを同定していた。

これら研究代表者の成果も含め、研究開始当初、DNA メチル化診断は実用化に近づき、脱メチル化剤によるがん治療も試みられていたが、DNA メチル化異常が惹起される分子機構の解明は立ち後れていた。DNA メチル化異常が前がん段階から多段階発がん過程に寄与するにもかかわらず、DNA メチル化の補正による発がん予防の試みはほとんど行われていなかった。そこで、前がん段階で DNA メチル化異常を惹起する分子機構を明らかにすることが、介入予防を含むトランスレショナルエピジェネティクスの基盤となる急務と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、多数の組織・細胞検体の分子病理学的解析をもとに、多段階発がん早期の前がん状態において、DNA メチル化異常を惹起する分子機構の理解を進めることを目的とする。まず、臨床病理像と対応させたゲノム網羅的 DNA メチル化解析 (メチローム解析) で、前がん段階において既に確立し、高悪性度のがんに至るまで継承される、cancer-prone の DNA メチル化プロファイルを同定する。さらに、cancer-prone の DNA メチル化プロファイルを示す前がん段階にある組織・細胞検体で、発現異常やヒストン修飾パターンの異常等を網羅的に解析する。以上により、DNA メチル化異常に先行して起こり、DNA メチル化異常を誘導する可能性のある、分子異常を同定することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) Cancer-prone の DNA メチル化プロファイルの同定

非腎腫瘍症例の手術検体等より得られた正常腎組織、DNA メチル化異常が蓄積する前がん段階にあることを研究代表者らが既に明らかにしている、淡明細胞型腎細胞がん症例より得られた非がん腎組織、淡明細胞型腎細胞がん組織、大腸がん肝転移症例の手術検体等より得られた正常肝組織、肝炎ウイルス感染に基づく慢性肝炎・肝硬変症を呈し、肝細胞がんに対する前がん段階にある非がん肝組織、肝細胞がん組織 (合計約 400 検体) において、Infinium HumanMethylation27 Bead Array あるいは Infinium HumanMethylation450 Bead Array (Illumina) による網羅的 DNA メチル化解析を行う。正常組織に比して前がん段階にある組織検体において既に DNA メチル化異常を来し、その異常が当該臓器のがんに継承されるプローブを網羅的に単離する。

### (2) 前がん段階等で発現異常・ヒストン修飾異常を来す分子の同定

上記・等前がん段階にある組織検体において、SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60K microarray (Agilent Technologies) を用いた網羅的発現解析を行う。さらに、各ヒストン修飾抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP)-シーケンシングで、ヒストン修飾パターンの網羅的解析を行う。

## 4. 研究成果

腎組織検体で実施したメチローム解析で、Infinium アレイに搭載された 27,578 プローブ中 4,830 プローブにおける DNA メチル化率は、正常腎組織に比し、非がん腎組織において有意に変化していた。1 塩基解像度で定量性に優れたスクリーニング法を用いた本研究でも、従来の候補遺伝子アプローチや BAC アレイを用いて得ていた知見と矛盾せず、腎細胞がん症例より得られた非がん腎組織は、既に DNA メチル化異常を伴う前がん段階にあると考えられた。

前がん段階において既に DNA メチル化状態が正常腎組織に比して変化し、その変化が腎細胞がん組織においてさらに亢進して腎細胞がんの発生に寄与する可能性があるプローブを抽出し、これらのプローブにおける DNA メチル化率を用いて腎細胞がん症例の階層的クラスタリングを行った。腫瘍径が大きく、組織学的異型度が高度で、静脈侵襲や腎静脈本幹腫瘍栓を伴い、浸潤性発育を示し、壊死を伴い、腎盂に浸潤し、診断時の病期が進行した症例 (臨床病理学的に悪性度の高い症例) が、有意に蓄積するクラスターが存在し、その無再発生存率ならびに全生存率は他のクラスターに比し有意に低値であった。当該クラスター症例においては、腎多段階発がん過程の早期にあたる前がん段階で既に、悪性度の高いがんを生じやすい cancer-prone の

DNA メチル化プロファイルが成立していると考えられた。

DNA メチル化プロファイルに基づく上記の予後不良クラスターには、DNA メチル化の亢進を示すプローブ数が有意に多く、DNA メチル化亢進を示すプローブは CpG アイランドに偏って存在した。大腸がん等では、臨床病理像と相関し、CpG アイランドにおける DNA メチル化亢進が蓄積するがんの形質を、CpG アイランドメチル化形質 (CpG island methylator phenotype [CIMP])と呼んでいる。CpG アイランドにおける DNA メチル化の亢進で特徴づけられる予後不良クラスターは、腎細胞がんの CIMP に相当すると理解された。

個々の症例の CIMP の有無を再現性を持って診断できるようにするため、ランダムフォレスト解析等で、腎細胞がん固有の CIMP マーカー遺伝子を同定した。CIMP マーカー遺伝子の DNA メチル化率を精密定量し、適切な診断閾値を設定して、CIMP 診断基準を策定した。ついで、エクソーム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析で CIMP 陽性腎細胞がん症例において高頻度に異常を来すことが分かった分子を用いて MetaCore 分子経路解析を実施したところ、CIMP 陽性腎細胞がんが多層のオミックス異常を来す分子群には、ヒストンメチル化酵素 SETD2・ヒストン脱メチル化酵素 KDM5C・ヒストンアセチル化酵素 NCOA1 を含むことが分かった。予後不良である CIMP 陽性症例において、エピゲノム制御蛋白の異常が、前がん段階から起こる DNA メチル化異常に寄与する可能性があると考えられた。

他方で、肝組織検体におけるメチローム解析では、の正常肝組織に比し の前がん段階で既に DNA メチル化異常を示し、その DNA メチル化異常が肝細胞がん組織に継承される 21,106 プローブを、

Jonckheere-Terpstra 傾向性検定等で同定した。21,106 プローブの DNA メチル化率を用いて階層的クラスタリングを行ったところ、正常肝組織・前がん段階にある肝組織・肝細胞がんのクラスターが概ね正しく分類されており、DNA メチル化異常が肝多段階発がん過程に継続して寄与する可能性が示唆された。特に、C 型肝炎ウイルス感染陽性症例において、DNA メチル化亢進の頻度が高いことが分かった。

次に の正常肝組織と の慢性肝炎・肝硬変症を呈する肝組織から、コラゲナーゼ処理等で分散肝細胞を得て ChIP-シーケンシングを実施した。ヒストン修飾パターンをグループ化するツールである ChromHMM(<http://compbio.mit.edu/ChromHMM/>)を用いて解析したところ、B 型肝炎ウイルス感染陽性症例のヒストン修飾パターンは正常肝細胞に比較的近いが、C 型肝炎ウイルス感染陽性症例においては概してヒストン H3K27 トリメチル化修飾主体の抑制性のマークが目立っていた。

ついで、先の 21,106 プローブの近傍、すなわち多段階発がん過程に継続して寄与する可能性がある DNA メチル化異常を示す領域のヒストン修飾パターンを調べた。C 型肝炎ウイルス感染陽性肝細胞で、概して H3K27 トリメチル化修飾が強調されていたものの、DNA メチル化異常が起こっている領域に限っては、ヒストン H3K4 トリメチル化修飾ならびに H3K27 アセチル化修飾主体の転写活性化マークが目立っていた。同様に、B 型肝炎ウイルス感染陽性肝細胞のヒストン修飾パターンは概して正常細胞に比較的近いと見えていたが、DNA メチル化異常が起こっている領域には H3K27 アセチル化修飾ならびに H3K4 トリメチル化修飾主体の転写活性化マークが見られた。H3K4 トリメチル化・H3K27 アセチル化修飾は、肝多段階発がん過程に寄与する DNA メチル化異常に先行して起こる可能性がある。

前がん段階において、ヒストンメチル化酵素・ヒストンアセチル化酵素の異常等を介してヒストン修飾異常が生じ、これらのエピゲノム異常が DNA メチル化によって固定され、がん継承されてがんの悪性を規定する可能性があると考えられた。今後ヒストン修飾異常が DNA メチル化酵素等をゲノム上に誘導して DNA メチル化異常に帰結する分子機構をさらに明らかにするとともに、エピゲノム制御蛋白の異常やエピゲノムプロファイルの異常を発がんリスク評価指標として用いること、等が望まれる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Arai E, Gotoh M, Tian Y, Sakamoto H, Ono M, Matsuda A, Takahashi Y, Miyata S, Totsuka H, Chiku S, Komiyama M, Fujimoto H, Matsumoto K, Yamada T, Yoshida T, Kanai Y. Alterations of the spindle checkpoint pathway in clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. *Int J Cancer*, in press, 2015.
2. Sato T, Soejima K, Arai E, Hamamoto J, Yasuda H, Terai H, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Naoki K, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Kanai Y, Betsuyaku T. Prognostic implication of hypomethylation of PTPRH in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, in press, 2015.
3. Yamanoi K, Arai E, Tian Y, Takahashi Y, Miyata S, Sasaki H, Chiwaki F, Ichikawa H, Sakamoto H, Kushima R, Katai H, Yoshida T, Sakamoto M, Kanai Y. Epigenetic clustering of gastric carcinomas based on DNA methylation profiles at the precancerous stage: its correlation with tumor aggressiveness and patient outcome. *Carcinogenesis*, 36: 509-520, 2015.
4. 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.
5. Arai E, Sakamoto H, Ichikawa H, Totsuka H, Chiku S, Gotoh M, Mori T, Nakatani T, Ohnami S, Nakagawa T, Fujimoto H, Wang L, Aburatani H, Yoshida T, Kanai Y. Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome. *Int J Cancer*, 135: 1330-1342, 2014.
  6. Sato T, Arai E, Kohno T, Takahashi Y, Miyata S, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T, Kanai Y. 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: 319-334, 2014.
  7. Gotoh M, Ichikawa H, Arai E, Chiku S, Sakamoto H, Fujimoto H, Hiramoto M, Nammo T, Yasuda K, Yoshida T, Kanai Y. Comprehensive exploration of novel chimeric transcripts in clear cell renal cell carcinomas using whole transcriptome analysis. *Genes Chromosomes Cancer*, 53: 1018-1032, 2014.
  8. Tian Y, Arai E, Gotoh M, Komiyama M, Fujimoto H, Kanai Y. 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.
  9. Sato T, Arai E, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T, Kanai Y. DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. *PLoS One* 8: e59444, 2013.
  10. Arai E, Chiku S, Mori T, Gotoh M, Nakagawa T, Fujimoto H, Kanai Y. Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. *Carcinogenesis*, 33: 1487-1493, 2012.
  11. Arai E, Nakagawa T, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, Kanai Y. DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. *Histopathology*, 60: E12-18, 2012.
  12. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis*, 32: 462-469, 2011.
  13. Arai E, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology*, 78: 1-9, 2011.
  14. Nagashio R, Arai E, Ojima H, Kosuge T, Kondo Y, Kanai Y. Carcinogenetic risk estimation based on quantification of DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage. *Int J Cancer*, 129: 1170-1179, 2011.
  15. Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *J Biomed Biotechnol*, 2011: 780836, 2011.
- 〔学会発表〕(招待講演計 18 件)
1. 金井 弥栄. 多層オミックス統合解析によるがんの本態解明と臨床応用. シンポジウム 3 「ゲノム・エピゲノム解析と病理形態学の邂逅: 発がんメカニズム解明に向けて」第 104 回日本病理学会総会, 2015.
  2. 金井 弥栄. 多層的疾患オミックス解析におけるエピゲノム情報に基づく創薬標的の網羅的探索を目指した研究. 彩都産学官連携フォーラム 2015, 2015.
  3. Yae Kanai. Epigenome mapping of normal hepatocytes for understanding molecular background of human hepatocarcinogenesis. International Human Epigenome Consortium 2014, Vancouver, Canada, 2014.
  4. 金井 弥栄. バイオバンク試料の利活用: 組織検体における多層オミックス解析. ワークショップ 4 「バイオバンクによる研究推進と病理の役割」第 103 回日本病理学会総会, 2014.
  5. 金井 弥栄. 病理診断に付加価値を加える: 多層的オミックス解析にもとづく病態診断. 日本癌学会-日本病理学会ジョイントシンポジウム「先端技術を集約したがんの病理診断」第 73 回日本癌学会学術総会, 2014.
  6. 金井 弥栄. 国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (IHEC)における正常消化器上皮細胞等標準エピゲノムプロファイル決定. シンポジウム「国際ヒトゲノム解読の現状と展望」第 59 回日本人類遺伝学会, 2014.
  7. 金井 弥栄. ナショナルセンターにおける疾患バイオバンク事業. シンポジウム「医薬品開発におけるヒト試料を用いたバイオマーカー研究の最新動向」第 35 回日本臨床薬理学会学術総会, 2014.
  8. Yae Kanai. Epigenome profiling during multistage human carcinogenesis and activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). 2013 Illumina Scientific Summit, Phuket, Thailand, 2013.

9. 金井弥栄. がんにおけるエピゲノム変化の解明と病態診断への応用. シンポジウム7「エピゲノムが拓く新たな人体病理学」第102回日本病理学会総会, 2013.
10. 金井弥栄. 国際ヒトエピゲノムコンソーシアムの取り組み. Activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). モーニングレクチャー5, 第72回日本癌学会学術総会, 2013.
11. 金井弥栄. 診断・治療応用を目指したがんの多層オミックス解析-エピゲノムを中心に. MKIセミナー「ITが拓く未来 - 個別化医療へのアプローチ - 」2013.
12. Yae Kanai, Tatsuhiko Shibata, Takashi Ito, Yutaka Suzuki, Satoshi Yamashita, Ying Tian, Masahiro Gotoh, Hidenori Ojima, Eri Arai. Standard Epigenome Analysis in Digestive Organs and Research Applications to Multistage Hepatocarcinogenesis. International Human Epigenome Consortium 2012, Soul, Korea, 2012.
13. Yae Kanai. Epigenome profiling during multistage hepatocarcinogenesis and activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). 17th Japan-Korea Cancer Research Workshop, Busan, Korea, 2012.
14. 金井弥栄. 多層のオミックス解析による疾患の本態解明と臨床応用 シンポジウム2「オミックス解析と病理学」第101回日本病理学会総会, 2012.
15. 金井弥栄. 腎がんの病理とゲノム・エピゲノム異常. 第1回総武泌尿器科病理研究会, 2012.
16. Yae Kanai. DNA methylation alterations during multistage hepatocarcinogenesis. The 3<sup>rd</sup> JCA-AACR Special Joint Conference “The latest advances in liver cancer research: from basic science to therapeutics”, Chiba, 2011.
17. Yae Kanai. Epigenome analysis in hepatocellular carcinomas associated with hepatitis virus infection. 9th China-Japan Joint Conference of Cancer, Shanghai, China, 2011.
18. 新井恵史, 金井弥栄. 泌尿器系腫瘍及びその背景組織のメチル化解析. ワークショップ1「前癌病変及び背景粘膜におけるエピジェネティクス異常」第100回日本病理学会総会, 2011.

〔図書〕(計1件)

金井弥栄, 新井恵史: 国際ヒトエピゲノムコンソーシアム『ピジェネティクス—基礎研究から産業応用への展望—』(畑田出穂, 久保田健夫編)シーエムシー出版, 2014; 90-99

〔産業財産権〕 該当なし

〔その他〕

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/01path/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

金井 弥栄 (KANAI Yae)  
国立研究開発法人国立がん研究センター  
研究所・分子病理分野・分野長  
研究者番号: 00260315

### (2)研究分担者

新井 恵史 (ARAI Eri)  
国立研究開発法人国立がん研究センター  
研究所・分子病理分野・主任研究員  
研究者番号: 40446547