

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501261

研究課題名(和文)大腸癌幹細胞の性質を規定するエピゲノムおよび機能性RNAの解明

研究課題名(英文)Analysis of epigenome and functional RNA in colorectal cancer cells and cancer stem cells

研究代表者

鈴木 拓 (Suzuki, Hiromu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20381254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌細胞のエピゲノムおよびmicroRNA発現を解析することで、大腸癌においてエピジェネティックに不活化されたmicroRNA遺伝子を複数同定した。大腸癌幹細胞性質にDNAメチル化酵素1型(DNMT1)が必要であることを明らかにし、さらにcancer initiating cellにおいて発現が変化するmicroRNAを複数同定した。大腸発癌過程におけるゲノム・エピゲノム変化を解析することで、発癌早期における分子異常を明らかにした。また前癌病変のDNAメチル化と内視鏡所見を統合解析することで、CpGアイランドメチル化形質(CIMP)陽性前癌病変の診断に有用な形態変化を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：By analyzing epigenome and microRNA expression profiling in colorectal cancer (CRC) cells, we identified a series of epigenetically silenced microRNA genes. We found that DNA methyltransferase 1 (DNMT1) is essential for the maintenance of cancer stem-like cells (CSC)/ cancer initiating cells (CIC), and we also identified microRNA genes which are differentially expressed in CSC/CIC. We carried out genome and epigenome analysis in precursor and malignant lesions in colorectum, and identified aberrant DNA methylation patterns in the premalignant stage. Finally, by performing integrative analysis of molecular, pathological and endoscopic findings of premalignant colorectal lesions, we identified a novel surface microstructure which is specific to the precursor lesions of CpG island methylator phenotype (CIMP)-positive CRC.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：大腸癌 癌幹細胞 エピジェネティクス DNAメチル化 microRNA

1. 研究開始当初の背景

発癌は遺伝子変異などのジェネティックな変化と、DNA メチル化やヒストン修飾異常などのエピジェネティックな変化の両者が蓄積することによって発生すると考えられている。癌細胞では数百以上の遺伝子が DNA メチル化異常を示すことが知られ、発癌に関与するあらゆるパスウェイの遺伝子がメチル化異常の標的となり得る。さらに近年では、noncoding RNA 遺伝子のエピジェネティクス異常も明らかにされつつある。

これまで申請者は、主に消化器癌におけるエピジェネティックな異常の解析を行ってきた。その中で、WNT シグナル阻害遺伝子や細胞周期チェックポイント遺伝子など多数の癌関連遺伝子のメチル化異常を明らかにした。また miR-34 ファミリー遺伝子など microRNA 遺伝子 (以下 miRNA) のメチル化異常を報告してきた。

大腸癌をはじめ様々な癌において CpG アイランドメチル化形質(CIMP)を示す一群の存在が知られている。CIMP の存在は、メチル化異常がメインとなる発癌経路の存在を示唆している。申請者は、CIMP 陽性大腸癌におけるメチル化異常を解析し、IGFBP7 メチル化が CIMP 発癌に関与している可能性を報告した。

近年、癌幹細胞(Cancer stem cell; CSC)あるいは Tumor-initiating cell (TIC)が重要な研究テーマとして注目されている。エピジェネティックな異常が大腸発癌早期から発生することを鑑みても、エピゲノムが大腸癌幹細胞性質に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、大腸癌細胞株および臨床検体(前癌病変、早期癌、進行癌)におけるエピゲノムと noncoding RNA 発現を解析することで、大腸発癌および大腸癌幹細胞の性質を規定する分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。さらにそれらを診断・治療へ応用するための基盤的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

大腸癌細胞株(n = 10)、大腸癌細胞株 HCT116 の DNA メチル化酵素 1 型(DNMT1)ノックアウト細胞、外科的あるいは内視鏡的に切除された大腸前癌病変(n=190)、大腸癌(n=100)を解析対象とした。

Methylated CpG island Amplification microarray (MCAM)法により網羅的な CpG アイランドメチル化解析を行った。メチル化特異的 PCR (MSP) 法、バイサルファイトシーケンス法、バイサルファイトパイロシーケンス法により各遺伝子のメチル化解析を行った。クロマチン免疫沈降(ChIP)法によりヒストン H3 リジン 4 トリメチル化 (H3K4me3)とヒストン H3 リジン 27 トリメチル化(H3K27me3)を解析した。アレイ CGH

法により、染色体コピー数異常の解析を行った。遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ(Agilent)により解析し、microRNA 発現プロファイルを TaqMan low density array (Applied Biosystems)により解析した。アレイデータの解析には Gene Spring GX ソフトウェア(Agilent)を用いた。MTT アッセイ、コロニーフォーメーションアッセイ、Wound healing アッセイ、マトリゲル浸潤アッセイにより遺伝子の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 大腸癌関連 miRNA の解析

大腸癌細胞におけるヒストン修飾 (H3K4me3 および H3K27me3) を ChIP-seq 法により解析することで、miRNA 遺伝子の転写開始点領域と同一し、エピジェネティックに不活化された miRNA を同定した。その結果、大腸癌において CpG アイランドメチル化により不活化される miRNA 遺伝子を複数同定した。中でも miR-1-1 遺伝子上流の CpG アイランドは、大腸腺腫および大腸癌において高頻度 (70~80%) にメチル化しており、大腸発癌早期に発生する変化であると考えられた。また miR-1 は、大腸癌細胞の増殖、遊走、浸潤を抑制する効果を示した。大腸癌細胞に miR-1 を導入して発現アレイ解析を行った結果、miR-1 は遺伝子発現プロファイルに大きな影響を与えることが示された。さらに ANXA2 および BDNF が miR-1 標的遺伝子として同定された。

(2) 大腸癌幹細胞における DNA メチル化酵素の役割

大腸癌細胞株 HCT116 の DNMT1 ノックアウト細胞は、DNA メチル化の多くを保っており、in vitro での増殖能にも大きな変化がないことが知られている。しかし詳細な検討の結果、Flow cytometry 解析で Side population (SP) 分画が消失、癌幹細胞マーカーのひとつとされる ALDH1 発現が消失、免疫不全マウスでの腫瘍形成能がほぼ消失するなど、癌幹細胞様性質を失っていることが明らかとなった。このことから大腸癌幹細胞性質の維持に DNMT1 が必要である事が示された。また HCT116 細胞の SP 分画と MP 分画における miRNA 発現プロファイルを比較した結果、SP 分画細胞において発現低下あるいは消失する miRNA が複数同定された。

(3) 大腸発癌過程におけるゲノム・エピゲノム変化の解析

大腸発癌過程における分子異常を詳細に検討するため、大腸腺腫 (serrated adenoma と conventional adenoma) および早期大腸癌におけるゲノム・エピゲノム異常の網羅的な解析を行った。その結果、CpG アイランドメチル化の多くは大腸腺腫の段階ですでに確立しているが、ゲノムコピー数異常は腺腫ではほとんど見られないことがわかった。また過形

成、大腸腺腫、早期大腸癌への移行過程における遺伝子変異、メチル化、染色体異常を統合的に解析することで、新たな大腸発癌経路を提唱した。

大腸癌および前癌病変の診断には、拡大内視鏡によるピットパターン診断が有用である。本研究では大腸前癌病変における拡大内視鏡像と、分子異常との統合的な解析を行った。その結果、CIMP 大腸癌の前癌病変とされる sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) の指標となりうる新たなピットパターン (Type II-O 型) を見いだした。Type II-O 型ピットを示す腺腫は、IGFBP7 や p16 など CIMP に特有なメチル化異常を高度に示した。これらの知見は分子異常と腫瘍形態との相関を示すとともに、CIMP 陽性大腸癌の前癌病変を効率的に同定しうる診断法につながると考えられた。

一方、進行大腸癌をメチル化異常とゲノムコピー数異常に基づいてクラスタリング解析した結果、臨床病期および転移との相関が認められた。このことからメチル化異常とコピー数異常とを組み合わせることが、大腸癌の臨床予後予測に有用である可能性が示唆された。

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 20 件)

Tahara T, Yamamoto E, Madireddi P, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano HO, Sugai T, Kondo Y, Toyota M, Issa JP, Estécio MR. Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators. *Gastroenterology* 146:530-538, 2014. 査読有 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1865.

Nosho K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, Naito T, Sukawa Y, Mikami M, Sumioka W, Yamamoto E, Kurokawa S, Adachi Y, Takahashi H, Okuda H, Kusumi T, Hosokawa M, Fujita M, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Suzuki H, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of MicroRNA-31 with BRAF mutation, Colorectal-Cancer Survival and Serrated pathway. *Carcinogenesis* 35:776-783, 2014. 査読有 doi: 10.1093/carcin/bgt374.

Morita R, Hirohashi Y, Suzuki H, Takahashi A, Tamura Y, Kanaseki T, Asanuma H, Inoda S, Kondo T, Hashino S, Hasegawa T, Tokino T, Toyota M, Asaka M, Torigoe T, Sato N. DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers. *Exp Mol Pathol* 94:322-329, 2013. 査読有 doi: 10.1016/j.yexmp.2012.10.004.

Shimizu T, Suzuki H, Nojima M, Kitamura

H, Yamamoto E, Maruyama R, Ashida M, Hatahira T, Kai M, Masumori N, Tokino T, Imai K, Tsukamoto T, Toyota M. Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. *Eur Urol* 63:1091-1100, 2013. 査読有 doi: 10.1016/j.eururo.2012.11.030.

Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T, Ashida M, Kai M, Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, Toyota M, Itoh F, Sugai T. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 52:140-149, 2013. 査読有 doi: 10.1002/gcc.22013.

Honda S, Okada T, Miyagi H, Minato M, Suzuki H, Taketomi A. Spontaneous rupture of an advanced pancreatoblastoma: aberrant RASSF1A methylation and CTNNB1 mutation as molecular genetic markers. *J Pediatr Surg* 48:e29-32, 2013. 査読有 doi: 10.1016/j.jpedsurg.2013.02.038.

Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Nosho K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, Nishida T, Bamba T, Kanda T, Ajioka Y, Taguchi T, Okahara S, Takahashi H, Nishida Y, Hosokawa M, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 72: 1126-1136, 2012. 査読有 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1803.

Kimura T, Yamamoto E, Yamano HO, Suzuki H, Kamimae S, Nojima M, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Takagi R, Kato R, Harada T, Suzuki R, Maruyama R, Kai M, Imai K, Shinomura Y, Sugai T, Toyota M. A novel pit pattern identifies the precursor of colorectal cancer derived from sessile serrated adenoma. *Am J Gastroenterol* 107: 460-469, 2012. 査読有 doi: 10.1038/ajg.2011.457.

Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Mol Oncol* 6: 567-578. 2012. 査読有 doi: 10.1016/j.molonc.2012.07.007.

Maruyama R, Suzuki H, Yamamoto E, Imai K, Shinomura Y. Emerging links between epigenetic alterations and dysregulation of noncoding RNAs in cancer. *Tumour Biol* 33: 277-85, 2012. 査読有 doi: 10.1007/s13277-011-0308-9.

Takamaru H, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO,

Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Suzuki R, Yamamoto H, Kai M, Tokino T, Sugai T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Aberrant methylation of RASGRF1 is associated with an epigenetic field defect and increased risk of gastric cancer. *Cancer Prev Res* 5: 1203-1212, 2012. 査読有 doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0056.

Aoki Y, Nojima M, Suzuki H, Yasui H, Maruyama R, Yamamoto E, Ashida M, Itagaki M, Asaoku H, Ikeda H, Hayashi T, Imai K, Mori M, Tokino T, Ishida T, Toyota M, Shinomura Y. Genomic vulnerability to LINE-1 hypomethylation is a potential determinant of the clinicogenetic features of multiple myeloma. *Genome Med.* 4:101, 2012. 査読有 <http://genomemedicine.com/content/4/12/101>

Yamamoto E, Suzuki H, Yamano HO, Maruyama R, Nojima M, Kamimae S, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada T, Suzuki R, Sato A, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Sugai T, Imai K, Shinomura Y, Toyota M. Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. *Am J Pathol* 181: 1847-1861, 2012. 査読有 doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.007.

Sasaki Y, Sugisaka J, Maruyama R, Sugisaka J, Tamura M, Sugisaka J, Suzuki H, Idogawa M, Shinomura Y, Tokino T. CLCA2, a target of the p53 family, negatively regulates cancer cell migration and invasion. *Cancer Biol Ther* 13:1512-1521, 2012. 査読有 doi: 10.4161/cbt.22280.

Shitani M, Sasaki S, Akutsu N, Takagi H, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto H, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Genome-wide analysis of DNA methylation identifies novel cancer-related genes in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 33: 1307-1317, 2012. 査読有 doi: 10.1007/s13277-012-0378-3.

Okamoto Y, Sawaki A, Ito S, Nishida T, Takahashi T, Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Takeuchi I, Shinjo K, An B, Ito H, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Kataoka H, Joh T, Sekido Y, Kondo Y. Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumour. *Gut* 61: 392-401, 2012. 査読有 doi: 10.1136/gut.2011.241034.

Suzuki H, Takatsuka S, Akashi H, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Kai M, Yamano HO, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M.

Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of microRNA genes in colorectal cancer. *Cancer Res* 71: 5646-5658, 2011. 査読有 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1076.

Kamimae S, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Suzuki H, Ashida M, Hatahira T, Sato A, Kimura T, Yoshikawa K, Harada T, Hayashi S, Takamaru H, Maruyama R, Kai M, Nishiwaki M, Sugai T, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. Epigenetic alteration of DNA in mucosal wash fluid predicts invasiveness of colorectal tumors. *Cancer Prev Res* 4: 674-683, 2011. 査読有 doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0214.

Yano Y, Konishi K, Yamochi T, Katagiri A, Nozawa H, Suzuki H, Toyota M, Kubota Y, Muramoto T, Kobayashi Y, Tojo M, Konda K, Makino R, Kaneko K, Yoshikawa N, Ota H, Imawari M. Clinicopathological and molecular features of colorectal serrated neoplasias with different mucosal crypt patterns. *Am J Gastroenterol* 106: 1351-1358, 2011. 査読有 doi: 10.1038/ajg.2011.76.

Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Yokota I, Koyama R, Kusano M, Suzuki H, Fujita M, Maruyama R, Toyota M, Saito T, Tokino T. p53 negatively regulates the hepatoma growth factor HDGF. *Cancer Res* 71: 7038-7047, 2011. 査読有 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1053.

〔学会発表〕(計 16 件)

鈴木拓．がんエピゲノム解析による病態解明と診断応用．第 102 回日本病理学会総会，2013 年 6 月 6-8 日，札幌

原田拓，山本英一郎，野島正寛，丸山玲緒，佐藤亜紀子，甲斐正広，山野泰穂，鈴木拓．腸管洗浄液のメチル化検出による大腸癌診断法の開発．第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会，2013 年 10 月 2 日，横浜

丸山玲緒，山本英一郎，桑川昂平，津矢田明泰，鈴木亮，芦田仁己，甲斐正広，佐藤亜紀子，新沼猛，山野泰穂，菅井有，篠村恭久，時野隆至，鈴木拓．消化器癌の発生や進展に関与する長鎖 ncRNA の量的・質的異常の探索と臨床応用への試み．第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会，2013 年 10 月 2 日，横浜

鈴木拓，山本英一郎，丸山玲緒，鈴木亮，清水崇，原田拓，山野泰穂，野島正寛，高塚伸太郎，新沼猛，甲斐正広，篠村恭久，今井浩三．マイクロ RNA 遺伝子のエピジェネティクス異常と臨床応用．第 72 回日本癌学会学術総会，2013 年 10 月 3-5 日，横浜

丸山玲緒，山本英一郎，桑川昂平，津矢

田明泰,鈴木亮,芦田仁己,佐藤亜紀子,甲斐正広,山野泰穂,菅井有,篠村恭久,時野隆至,鈴木拓. 消化器癌において重要な役割を果たす長鎖 ncRNA の網羅的同定の試み. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3-5 日, 横浜

鈴木拓. 消化管腫瘍のエピゲノムおよび non-coding RNA 解析による分子マーカー探索. 第 32 回日本分子腫瘍マーカー研究会. 2012 年 9 月 18 日, 札幌.

鈴木拓, 新沼猛, 野島正寛, 丸山玲緒, 山本英一郎, 甲斐正広, 能正勝彦, 山本博幸, 時野隆至, 今井浩三, 篠村恭久. microRNA-196a と HOTAIR の過剰発現は消化管間質腫瘍の悪性度と相関する. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌

丸山玲緒, 糸川昇平, 山本英一郎, 井戸川雅史, 野島正寛, 甲斐正広, 能正勝彦, 佐々木泰史, 山野泰穂, 菅井有, 篠村恭久, 時野隆至, 鈴木拓. 大腸癌においてエピジェネティックに抑制されている長鎖 ncRNA の網羅的同定の試み. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌

山本英一郎, 鈴木拓, 神前正幸, 丸山玲緒, 山野泰穂, 澤田武, 能正勝彦, 山本博幸, 甲斐正広, 時野隆至, 菅井有, 今井浩三, 篠村恭久. 大腸腫瘍におけるニューロテンシン受容体 1 型遺伝子のメチル化と臨床的意義. 第 71 回日本癌学会学術総会. 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌

鈴木拓, 山本英一郎, 丸山玲緒, 山野泰穂, 甲斐正広, 山本博幸, 篠村恭久. 大腸腫瘍におけるニューロテンシン受容体 1 型遺伝子のメチル化と臨床的意義. 第 23 回日本消化器癌発生学会総会 2012 年 11 月 15-16 日, 徳島.

鈴木拓, 野島正寛, 丸山玲緒, 山本英一郎, 津矢田明泰, 篠村恭久. miR-196a および HOTAIR の過剰発現は消化管間質腫瘍の悪性度を促進する. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11-14 日, 福岡

鈴木拓, 山本英一郎, 篠村恭久. 消化管癌における microRNA 遺伝子のエピジェネティックな不活化の網羅的解析. 第 97 回日本消化器病学会総会, 2011 年 5 月 13-15 日, 東京

鈴木拓, 山本英一郎, 丸山玲緒, 篠村恭久, 今井浩三, 豊田実. 大腸癌のエピゲノム解析による癌関連 miRNA 遺伝子の同定. 第 31 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2011 年 10 月 2 日, 名古屋

豊田実, 野島正寛, 鈴木拓, 丸山玲緒, 山本英一郎, 甲斐正広, 時野隆至, 篠村恭久, 今井浩三. エピゲノム解析による造血器腫瘍の新たな分子標的の同定. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3-5 日, 名古屋

鈴木拓, 山本英一郎, 野島正寛, 丸山玲緒, 高丸博之, 甲斐正広, 時野隆至, 今井浩三, 豊田実, 篠村恭久. 大腸癌のエピゲノム解析からアプローチする癌関連 miRNA の探索. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011 年 10 月 3-5 日, 名古屋

鈴木拓, 山本英一郎, 丸山玲緒, 野島正寛, 今井浩三, 篠村恭久, 豊田実. 大腸癌における microRNA 遺伝子のエピジェネティックな制御の網羅的解析. 第 22 回日本消化器癌発生学会総会, 佐賀, 2011 年 11 月 25-26 日

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者
鈴木拓 (SUZUKI HIROMU)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20381254

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし