

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790456

研究課題名（和文）慢性炎症により発がんに寄与する DNA メチル化異常が惹起される分子機構

研究課題名（英文）Epigenetic mechanism of chronic inflammation-associated human carcinogenesis

研究代表者

新井 恵吏 (ARAI ERI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：40446547

研究成果の概要（和文）：慢性炎症を背景としてがんが生じる、肺腺がんと肝炎ウイルス関連肝細胞がんのヒト手術検体よりがん組織・背景非がん組織、対照として非がん症例の正常組織を収集し、ゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行った。喫煙肺に悪性度の高いがんを生じさせる DNA メチル化プロファイルに関連する遺伝子を同定した。また B 型・C 型肝炎ウイルス特異的に発がんに寄与する DNA メチル化プロファイルとウイルス種で差がなく炎症によって誘導されると思われる DNA メチル化プロファイルをそれぞれ同定した。

研究成果の概要（英文）： This study has focused on the significance of epigenome alterations in multistage carcinogenesis associated with chronic inflammation. Genome-wide DNA methylation analysis was performed in cancerous and non-cancerous tissue samples obtained from patients with adenocarcinomas of the lung. For comparison, normal lung tissue samples from patients without any primary lung tumor were also analyzed. DNA methylation profiles, which may generate aggressive adenocarcinomas from the inflammatory background in chronic obstructive pulmonary disease in heavy smokers, were identified. Genome-wide DNA methylation analysis also identified DNA methylation profiles each specific to hepatocarcinogenesis associated with hepatitis B virus (HBV) infection and hepatitis C virus infection (HCV) and DNA methylation profiles shared by HBV-positive and HCV-positive patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：分子病理、腫瘍、DNA メチル化、炎症

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の全身の諸細胞は、発生分化の過程で形成された、各細胞特有の DNA メチル化プロファイルを有しているが、がん細胞ではその固有のプロファイルが失われ、染色体不安定性やがん抑制遺伝子の不活化を誘導して発がん過程に寄与すると考えられている。しかし、DNA メチル化プロファイルがいかに変化して発がんに至るかの分子機構は明らかになっていない。

遷延する慢性炎症は種々の臓器において前がん状態を形成し得る。かつ、慢性炎症を伴う前がん状態では DNA メチル化異常が蓄積していることが報告されている。すなわち、慢性炎症が DNA メチル化異常を生じさせ、発がんに寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

慢性炎症が DNA メチル化異常を惹起する分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

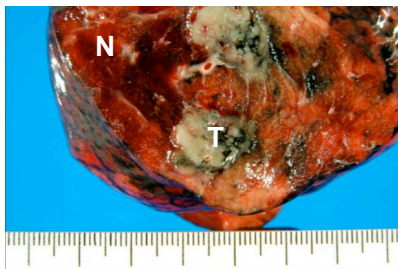
慢性炎症を背景として発がんするヒトがんについて、国立がん研究センター中央病院で外科的に切除された病理標本より、患者の同意を得て組織検体を採取する。本研究では発がん過程の早期、前がん状態に着目するため、がん組織 T とがんの背景にある非がん組織 N の他に、当該臓器の原発性腫瘍を有さない正常組織 C を、他臓器がんの転移症例等から採取する。(1)喫煙を高リスク要因とし、副流煙中の発がん物質への暴露と肺の慢性炎症を背景として発がんする肺腺がん、(2)肝炎ウイルスの持続感染と遷延する慢性炎症を背景として発がんする肝細胞がん、を本研究の対象とする。

採取された組織検体よりフェノール・クロロホルム法で DNA を抽出し、ゲノム全体に多数のプロンプが設計された高密度ビーズアレイを用いてゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行う。得られたアレイデータから call rate 0.9 未満ならびに性染色体上のプロンプを除き、階層的クラスタリング解析、logistic 解析、Jonckheere-Terpstra 検定等の統計学的処理を行い、炎症の程度やウイルス種と比較する。

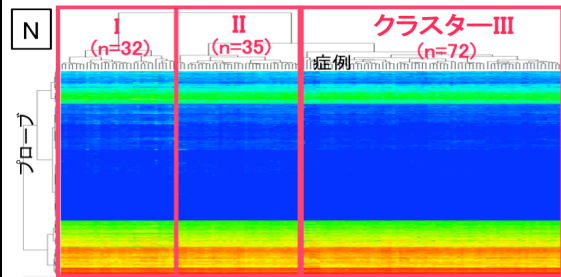
4. 研究成果

(1) 肺腺がん

肺腺がん症例の肺切除術検体より、非がん肺組織検体 N とがん組織 T 各 189 検体(うち EGFR 異常解析が既に行われている検体 163 ペア)、転移性腫瘍に対する肺切除検体より得られた正常肺組織 C36 検体を用いて、イリミナ社 Infinium HumanMethylation27 BeadChip Kit による網羅的 DNA メチル化解析を行った。



C と N とで有意に異なる DNA メチル化状態を示すプロンプを、性・年齢・実験バッチで補正したロジスティックモデルで解析したところ、3,546 プロンプにおいて DNA メチル化状態が有意に異なっていた (FDR, $q=0.01$)。肺がん症例の非がん肺組織は、既に DNA メチル化異常を伴う前がん状態であると考えられた。N の DNA メチル化プロファイルを用いて、163 症例について教師なし階層的クラスタリング解析を行ったところ、肺腺がん症例を 3 群に分けることができた。

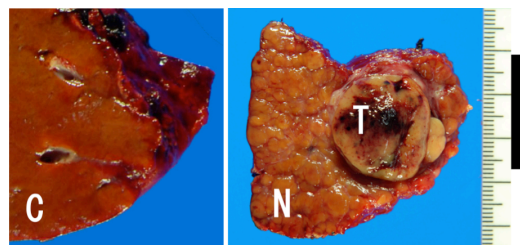


クラスターと臨床病理学的因子との相関を解析したところ、クラスター I は、重喫煙者の荒廃した肺組織から生じ、局所進行性を示す肺腺がん症例、クラスター II は、非喫煙者で、比較的予後良好な肺腺がん症例、クラスター III は、軽喫煙者の気腫性変化の軽度な肺から生じ、最も悪性度が高く予後不良な肺腺がん症例と特徴づけられた。

肺がんは喫煙を高リスク要因として発生するがんであり、喫煙は気道の慢性炎症を誘発して慢性閉塞性肺疾患を誘発するが、本解析の結果から、喫煙と慢性炎症の観点より、肺腺がんの複数の発がん経路が推察された。すなわち、重篤な喫煙による高度の炎症と肺構築の破壊を背景とした発がん経路、軽度の喫煙と軽微な組織変化にも関わらず、悪性度の高いがんを生じる発がん経路、喫煙と無関係な発がん経路である。アレイによる DNA メチル化状態とリアルタイム RT-PCR より、クラスター特異的に発現変化する遺伝子を特定した。これらの遺伝子をヒト肺がん由来の培養細胞に導入して、増殖・浸潤能の変化を検索している。

(2) 肝炎ウイルス関連肝細胞がん

肝炎ウイルス関連肝細胞がん手術検体より採取した非がん肝組織 36 検体ならびに肝細胞がん組織 24 検体、対照として転移性肝がん症例より得られた正常肝組織 36 検体の Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit による網羅的 DNA メチル化解析を行った。



前がん状態にある慢性障害肝組織に既に生じ、肝細胞がん組織に受け継がれる DNA メチル化異常を示すプロンプは 21106 プロンプあった。前がん状態の DNA メチル化異常は gene body や非コード領域に優位であった。DNA メチル化異常を示すプロンプは HBV 感染肝に比して HCV 感染肝に多く、HBV 感染肝は

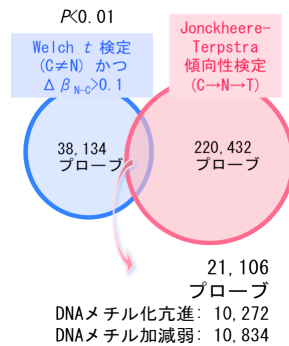
DNA メチル化減弱が、HCV 感染肝は DNA メチル化亢進が優位であった。一方で、慢性肝炎で生じながらがんを受け継がれない DNA メチル化異常も存在した。以上より、肝炎ウイルス種特異的に生じる DNA メチル化異常と炎症そのもので生じる DNA メチル化異常が存在すること、炎症そのもので生じる DNA メチル化異常の中に、がんを受け継がれて発がんに寄与する異常と単に炎症によって誘発される異常が存在することがわかった。今後は、これらの DNA メチル化プロファイルの詳細についての解析を継続し、ウイルス感染・慢性炎症によって DNA メチル化が誘発され発がんに寄与する分子機構の解明を進めたい。

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. Nakagawa T, Hara T, Kawahara T, Ogata Y, Nakanishi H, Komiyama M, Arai E, Kanai Y, Fujimoto H. Prognostic risk stratification of patients with urothelial carcinoma of the bladder with recurrence after radical cystectomy. *J Urol*, 189: 1275-81, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.juro.2012.10.065.
2. Hara T, Nakanishi H, Nakagawa T, Komiyama M, Kawahara T, Manabe T, Miyake M, Arai E, Kanai Y, Fujimoto H. Ability of preoperative 3.0-Tesla magnetic resonance imaging to predict the absence of side-specific extracapsular extension of prostate cancer. *Int J Urol*, 29: 2013 (in print). 査読有
DOI: 10.1111/iju.12091.
3. 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. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0059444.
4. Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Liu YT, Izumiya M, Abe K, Ochiai M, Jiang L, Nagai H, Okazaki Y, Murakami H, Sekido Y, Arai E, Kanai Y, Hino O, Takahashi T, Nakagama H, Toyokuni S. Fenton reaction induced cancer in wild type rats



recapitulates genomic alterations observed in human cancer. *PLoS One*, 7: e43403, 2012. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0043403.

5. 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: E12-8, 2012. 査読有
DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04174.x.

6. 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*, 33:1487-93, 2012. 査読有
DOI: 10.1093/carcin/bgs177.

7. Ito H, Honda K, Satow R, Arai E, Shitashige M, Ono M, Sakuma T, Sakano S, Naito K, Matsuyama H, Yamada T. Combined functional genome survey of therapeutic targets for clear cell carcinoma of the kidney. *Jpn J Clin Oncol*, 41: 847-53, 2011. 査読有

DOI: 10.1093/jjco/hyr060.

8. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis*, 32: 462-9, 2011. 査読有

DOI: 10.1093/carcin/bgq274

9. 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. 査読有

DOI: 10.1155/2011/780836

10. 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: 1170-9, 2011. 査読有

DOI: 10.1002/ijc.26061

11. 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. 査読有
DOI: 10.1159/000322072

12. Arai E, Kanai Y. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. Int J Clin Exp Pathol, 4: 58-73, 2011. 査読有
DOI: none

〔学会発表〕(計 17 件、うち招待講演 1 件)

1. Arai E et al., Multilayer-omics (whole-exome, methylome and transcriptome) analysis identifies the Wnt/ β -catenin pathway as a key player in the development of renal cell carcinoma. 103rd American Association of Cancer Research Annual Meeting, 2013. 4. 8, Washington D. C., USA.
2. Sato T, Arai E et al., DNA methylation profiles at precancerous stage cluster lung adenocarcinomas into subclusters associated with carcinogenetic pathway, clinicopathological aggressiveness and patient outcome. 103rd American Association of Cancer Research Annual Meeting, 2013. 4. 10, Washington D. C., USA.
3. Arai E et al., Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. 9th American Association of Cancer Research-Japanese Cancer Association Joint Conference, 2013. 2. 23, Hawaii, USA
4. Sato T, Arai E et al., DNA methylation profiles at precancerous stage cluster lung adenocarcinomas into subclusters associated with carcinogenetic pathway, clinicopathological aggressiveness and patient outcome. 9th American Association of Cancer Research-Japanese Cancer Association Joint Conference, 2013. 2. 23, Hawaii, USA
5. 新井恵吏他、腎淡明細胞がんにおける多層的オミックス (エクソーム・メチローム・トランスクリプトーム) 解析。第 71 回日本癌学会学術総会、2012. 9. 21、札幌
6. 佐藤崇、新井恵吏他、前がん段階における DNA メチル化異常が肺腺がんの悪性度と予後を規定する。第 71 回日本癌学会学術総会、2012. 9. 20、札幌
7. 西山直隆、新井恵吏他、尿路上皮がんにおけるゲノム構造異常：臨床病理学的意義ならびに DNA メチル化異常との関係。第 71 回日本癌学会学術総会、2012. 9. 20、札幌
8. 佐藤崇、新井恵吏他、肺多段階発がん過程における DNA メチル化の変化のゲノム網羅的解析。第 101 回日本病理学会総会、

2012. 4. 27、東京 (招待講演)

9. 新井恵吏他、ゲノム網羅的 DNA メチル化解析による腎淡明細胞がんの CpG アイランドメチル化形質。日本エピジェネティクス研究会第 6 回年会、2012. 5. 15、東京
10. 佐藤崇、新井恵吏他、肺多段階発がん過程における DNA メチル化異常のゲノム網羅的解析。日本エピジェネティクス研究会第 6 回年会、2012. 5. 15、東京
11. 新井恵吏他、腎細胞がん発生過程における DNA メチル化異常の網羅的解析。第 70 回日本癌学会学術総会、2011. 10. 3、名古屋
12. 新井恵吏他、腎細胞がん発生過程における DNA メチル化異常の網羅的解析。日本エピジェネティクス研究会第 5 回年会、2011. 5. 20、熊本
13. 長塩亮、新井恵吏他、慢性障害肝における DNA メチル化状態を指標とした発がんリスク評価の肝生検検体を用いた臨床応用。日本エピジェネティクス研究会第 5 回年会、2011. 5. 19、熊本
14. 新井恵吏他、多層的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「固形がんのエピゲノム解析」。第 101 回日本病理学会総会、2012. 4. 27、東京 (招待講演)
15. 赤塚慎也、新井恵吏他、酸化ストレス誘発ラット腎癌は高度な染色体不安定性を示す。第 100 回日本病理学会総会、2011. 4. 29、横浜
16. 新井恵吏他、泌尿器系腫瘍及びその背景組織のメチル化解析。第 100 回日本病理学会総会、2011. 4. 28、横浜
17. Nishiyama N, Arai E et al., Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. The 102nd Annual Meeting of AACR, 2011. 4. 2, Orlando, USA

〔図書〕(計 2 件)

1. Kanai Y, Arai E., Academic Press, Epigenetics in Human Disease, 2011, 592 pages
2. Arai E et al., Elsevier, DNA methylation alterations in human cancers. In: Epigenetics in Human Disease., 2012, 24 pages

〔その他〕

ホームページ等
ヒト多段階発がん過程におけるエピゲノム異常：国立がん研究センター研究所分子病理分野
<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/01path/01path01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 恵吏 (ARAI ERI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究
所・研究員

研究者番号：40446547

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし