

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462064

研究課題名(和文) DNAメチル化プロファイルによる癌易罹患性の予測

研究課題名(英文) DNA methylation profiling to evaluate the susceptibility to cancer

研究代表者

力山 敏樹 (Rikiyama, Toshiki)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：80343060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化異常は癌組織のみならず非癌部組織でも認められます。そこで非癌部組織で観察されるDNAメチル化異常の情報をもとに、癌のかかりやすさを予測しようと考えました。癌組織で異常メチル化のため発現が低下している遺伝子を同定し、その異常メチル化の程度を背景粘膜で解析しました。潰瘍性大腸炎では、発癌に関連するDNAメチル化異常を非癌部組織で捉える事により、癌の易罹患性を予測する有用な指標となる事を示しました。さらに大腸癌ではDNAメチル化マイクロアレイを用いて、その発癌経路に関わるメチル化異常の違いを評価し、一連の発癌経路に関わる遺伝子の変化が癌と腺腫で共有されている事を明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explore DNA methylation alterations in non-cancer tissues to evaluate the susceptibility of cancer. Methylation alterations are observed in both cancer and non-cancer tissues, so we elucidate the levels in non-cancer tissues to link with the predisposition of cancer or detection of early cancer. We identified methylation alterations in some genes decreased in cancer tissues, and explore the levels of methylation in these genes in non-cancer tissues. In ulcerative colitis, we showed that methylation alteration in non-cancer tissues could be a useful biomarker for the predisposition of colitic-cancer. Comprehensive analysis of DNA methylation array in colon cancer revealed that methylation alterations underlying colon cancer development are shared between cancer and adenomas.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌のかかりやすさ DNAメチル化異常 NAメチル化マイクロアレイ 潰瘍性大腸炎 大腸癌発癌経路

### 1. 研究開始当初の背景

癌の発生、進展には遺伝子配列の変化を伴う遺伝子異常とともに、DNA メチル化のような遺伝子配列の変化を伴わない遺伝子修飾の異常が重要な役割を演じています。特に遺伝子修飾の異常は癌のみならず、癌発症の背景となる慢性胃炎や潰瘍性大腸炎等の非癌組織にも観察されるため、発癌過程の変化を捉えるのに有効であると考えられます。

遺伝子修飾異常が関わる発癌のメカニズムとして、プロモーター領域の異常メチル化による癌抑制遺伝子の失活と、ゲノム全域の脱メチル化異常による染色体不安定性の惹起が関与しており、ともに発癌の初期段階に関わっていると考えられています。そこで癌化に先行して引き起こされる遺伝子修飾の変化を正常組織において捉える事ができれば、癌の易罹患性を予測する有用な手段となり得ます。

近年、網羅的ゲノム検索により多くの遺伝子が同定されました。2012年にNATUREに報告された大腸癌276症例のwhole genome studyは、これまで同定された既知の遺伝子とその上流、あるいは下流の遺伝子変化に着目しました。腫瘍抑制遺伝子APCが関与するWNTシグナル伝達系において、その経路のどこかに遺伝子異常がある大腸癌の頻度は92-97%と非常に高い数値を示しました。すなわち、APCに異常を認めなくても、APCのシグナル伝達に関わる遺伝子の異常を多くの大腸癌が有していたという事です。この結果より、一連のシグナル伝達系に関わる遺伝子変化を包括的に検索し、解析する事の重要性が示されました。しかしながら、このような網羅的ゲノム検索を正常組織で行い、癌組織の変化と関連づけた報告はありません。

### 2. 研究の目的

本研究は、正常組織で観察される遺伝子修飾異常(DNAメチル化異常)の情報をもとに、癌のかかりやすさを予測しようとするものです。DNAメチル化異常は癌組織のみならず、非癌部組織でも認められるため、その情報を癌発症の予測や早期診断に利用します。

具体的には、癌組織で異常メチル化のため遺伝子発現が低下している遺伝子を同定し、それらの遺伝子の異常メチル化の程度を背景粘膜でも検出します。背景粘膜の異常メチル化の程度と遺伝子発現の相関を解析し、異常メチル化の進行に伴い遺伝子の発現が低下していく過程を捉えられれば、それは発癌過程の段階的変化を表現していると考えられます。我々が独自に開発したDNAメチル化マイクロアレイ、発現アレイを用いる事により、網羅的に遺伝子異常、遺伝子修飾異常を捉えることが可能となり、分子生物学的な発癌プロファイルの作成が可能となります。それは発癌リスクのバイオマーカーとして有用性が期待されます。

### 3. 研究の方法

- (1) 大腸癌癌部、非癌部のDNAメチル化異常を、我々が独自に開発したDNAメチル化マイクロアレイを用いて網羅的に検索し、癌部と非癌部で同じ変化を示す遺伝子断片を同定します。
- (2) 発現アレイで遺伝子発現の程度を評価し、Pyro Markでメチル化シトシン定量し、アレイの結果の検証を行います。
- (3) クラスター解析、DAVID解析で関連遺伝子を同定し、メチル化プロファイルを作成します。そしてDNAメチル化異常とその遺伝子の発現の情報を統合させ、分子生物学的な発癌リスクのプロファイルの作成を目標とします。

### 4. 研究成果

これまで我々は、胃、大腸癌におけるメチル化の異常とゲノムの不安定性、そして癌化という一連の経路に着目し、ゲノム全域に渡って蓄積された遺伝子異常、遺伝子修飾異常を包括的に解析、評価してきました(Suzuki K. Gastroenterology 2003, Suzuki K. Cancer Cell 2006)。その結果、ゲノム全域のメチル化の進行はゲノムの不安定性を招来し、癌化に深く関わっていることを明らかにしました(図1)

図1: 異常メチル化の程度と遺伝子不安定性の相関

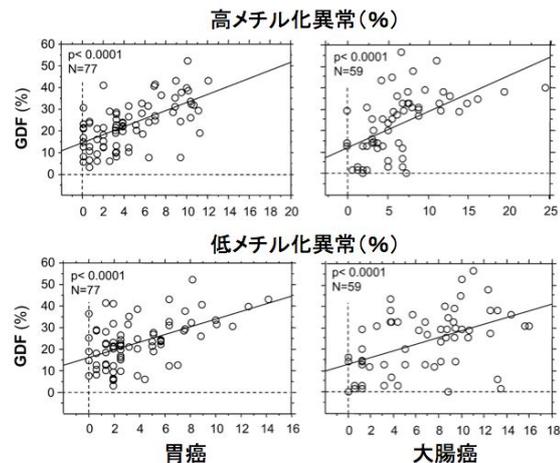
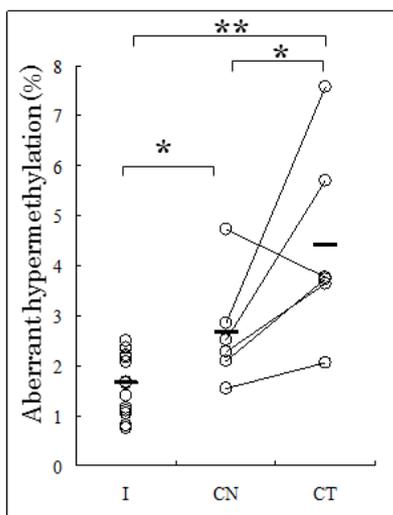


図1: 横軸は methylation sensitive length polymorphism(MS-AFLP)法(詳細は研究方法に記載)で評価したメチル化の程度を示す。縦軸 GDF (Genomic damage fraction) は Arbitrarily primed PCR 法で評価した遺伝子不安定性の程度を示す。異常メチル化の程度と遺伝子不安定性の相関が認められる。図上段は、低メチル化、下段は高メチル化と GDF の相関を示す。(Suzuki K. Global DNA methylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. Cancer Cell 2006)

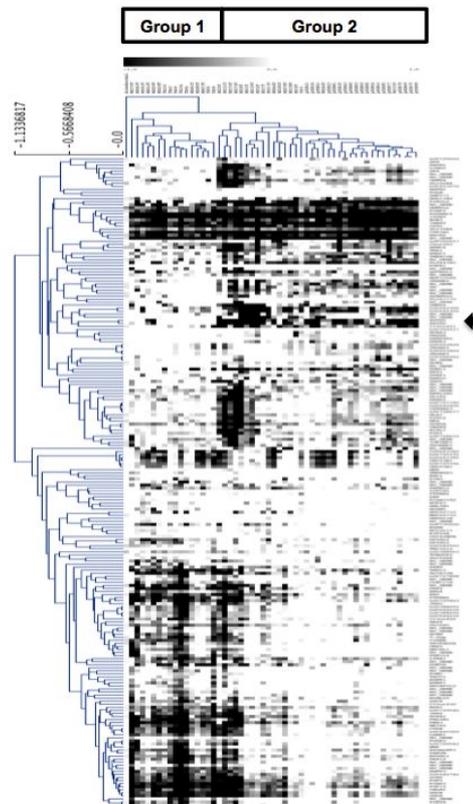
次に我々は、癌組織から背景粘膜に視点を移し、罹患年数とともに発癌のリスクが高くなる潰瘍性大腸炎を対象として、独自に開発した DNA メチル化マイクロアレイ (研究方法参照) を用いて DNA メチル化異常をゲノム全域に渡り網羅的に解析しました。その結果、非担癌非癌部大腸粘膜 (I)、担癌非癌部 (CN)、担癌癌部 (CT) の順に段階的にメチル化異常が進んでいくことを明らかにし (図 2)、さらに担癌非癌部および癌部でとも異常メチル化している遺伝子で、非担癌大腸粘膜では異常メチル化を認めない遺伝子を同定しました。それらの遺伝子の異常メチル化の程度は、癌部でより強くなり、遺伝子発現の低下に関わっていました。これらの結果から、発癌に関連する遺伝子修飾の変化を非癌部組織で捉える事により、癌の易罹患性を予測する有用な指標となる事を示しました。

図2:メチル化異常の頻度の比較



さらに、DNA メチル化マイクロアレイを用いて、マイクロサテライト不安定性大腸癌 (MSI) とその前癌病変と考えられている鋸歯状腺腫 (SSA)、通常大腸癌 (MSS) とその前癌病変と考えられている管状腺腫 (TA) の DNA メチル化異常のゲノム全域にわたる包括的解析を行い、2 つの異なる大腸癌発癌経路に関わるメチル化異常の違いを評価しました (18)。右図 3 は MSI+SSA 群 (Group1) と MSS+TA 群 (Group2) の 2 群で t 検定を行い、ヒートマップを作成したものです。矢印は、APC とともに複合体を形成し、カテニンの分解に携わり、WNT signaling に関わる AXIN2 遺伝子です (図 3)。MSS+TA 群 (Group2) では脱メチル化 (白) しており、MSI+SSA 群 (Group1) では高メチル化 (黒) している事が分かります。メチル化された症例では遺伝子発現が低下している事も確認しています。前述した一連の発癌経路に関わる遺伝子の変化が癌と腺腫で共有されている事が分かりました。

図3:メチル化プロファイルの比較



今後は発癌に関わる遺伝子の変化を正常粘膜で捉え、発癌プロファイルを作成する事により、発癌リスクのバイオマーカーとしての有用性を検討しようと考えています。

本研究は、癌の発生母地である正常組織において観察される遺伝子修飾異常 (DNA メチル化異常) に着目し、癌組織で認められる変化と関連づける点が独創的であり、得られた情報を包括的に解析し、分子生物学的な発癌プロファイルを作成し、それを癌易罹患性マーカーとして応用するこれまでにはない画期的な試みです。臓器固有の疾患プロファイルを血液細胞の変化と関連づけることができれば、検診の効率向上に大きく貢献できると考えます。また重複癌の発症リスクのマーカーとしての応用も可能で、飛躍的に進歩してきた縮小手術を考慮する際の治療戦略に大きな影響を与えるものと確信します。さらこのプロファイルは癌のみならず、自己免疫疾患をはじめとする種々の臓器障害などの後天的疾患の発症プロセスに関与した予知医療マーカーとしての応用も期待されます。

#### 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 6 件)

1. Alonso S, González B, Ruiz-Larroya T, Durán Domínguez M, Kato T, Matsunaga

- A, Suzuki K, Strongin AY, Gimenez-Bonafé P, Perucho M. Epigenetic inactivation of the extracellular matrix metalloproteinase ADAMTS19 gene and the metastatic spread in colorectal cancer. *Clinical Epigenetics*.2015;7:124.
2. Kato T, Suzuki K, Muto Y, Sasaki J, Tsujinaka S, Kawamura YJ, Noda H, Horie H, Konishi F, Rikiyama T. Multiple primary malignancies involving primary sporadic colorectal cancer in Japan: incidence of gastric cancer with colorectal cancer patients may be higher than previously recognized. *World J Surg Oncol*.2015;13:23
  3. Tago K, Funakoshi-Tago M, Itoh H, Furukawa Y, Kikuchi J, Kato T, Suzuki K, Yanagisawa K. Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop including c-Myc and DDX5. *Oncogene*.2015;34(3):314-22
  4. Saito M, Kiyozaki H, Takata O, Suzuki K, Rikiyama T. Treatment of stage IV gastric cancer with induction chemotherapy using S-1 and cisplatin followed by curative resection in selected patients. *World J Surg Oncol*.2014;12:406.
  5. Muto Y, Maeda T, Suzuki K, Kato T, Watanabe F, Hidenori Kamiyama, Saito M, Koizumi K, Miyaki Y, Konishi F, Sergio Alonso, Manuel Perucho, and Rikiyama T. DNA methylation alterations of AXIN2 in serrated adenomas and colon carcinomas with microsatellite instability. *BMC cancer*.2014;14:466.
  6. Suzuki K, Kato Takaharu, Muto Y, Ichida K, Fukui T, Takayama Y, Tsujinaka S, Junichi Sasaki, Hisanaga Horie, Yutaka J. Kawamura, Konishi F and Rikiyama T. The XELIRI regimen plus continuous treatment with bevacizumab is well tolerated and effective in metastatic colorectal cancer patients in a second-line setting involving the sequential administration of XELOX and XELIRI. *Mol Clin Oncol*.2014;2(5):827-832.
- Futsuhara K, Miyakura Y, Noda H, Hirokazu Kiyozaki, Konishi F, Rikiyama T; Liquid biopsy leads to a paradigm shift in cancer treatment. ASCO-GI Jan 21-23, 2016
2. Kakizawa N, Suzuki K, Takayama Y, Ichida K, Fukui T, Watanabe F, Muto Y, Rikiyama T; Clinical and molecular assessment of response to Regorafenib. ASCO-GI Jan 21-23, 2016
  3. Takayama Y, Suzuki K, Daito T, Ichida K, Fukui T, Muto Y, Nao Kakizawa, Imoto H, Taniyama Y, Kaneda Y, Tanaka H, Watanabe F, Kato T, Hasegawa F, Saito M, Tsujinaka S, Miyakura Y, Noda H, Konishi F, Rikiyama T; Emergence of KRAS mutation in detection of circulating tumor DNA during treatments for metastatic gastrointestinal cancer patients. ASCO, May 29-Jun 2, 2015:11026 Chicago
  4. Ichida K, Suzuki K, Takayama Y, Muto Y, Fukui T, Kato T, Saito M, Watanabe F, Kakizawa N, Hirofumi Imoto, Tanaka H, Kaneda Y, Yusuke Taniyama, Shingo Tsujinaka, Osamu Takata, Miyakura Y, Noda H, Kiyozaki H, Konishi F, Rikiyama T; Detection of satellite alpha transcript in sera, as a surrogate marker for the risk of development of multiple cancers in colorectal cancer patients. ASCO May 29-Jun 2, 2015: e22044 Chicago

#### 2015年国内学会

1. 齊藤正昭、鈴木浩一、染谷崇徳、石岡大輔、市田晃佑、武藤雄太、加藤高晴、渡部文昭、兼田裕司、辻仲眞康、菊川利奈、宮倉安幸、清崎浩一、野田弘志、力山敏樹：DNA脱メチル化異常をバイオマーカーとする癌易罹患性の評価。第26回日本消化器癌発生学会総会 2015.11.19-20 米子口演
  2. 鈴木浩一、齊藤正昭、武藤雄太、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、柿澤奈緒、渡部文昭、長谷川芙美、辻仲眞康、宮倉安幸、野田弘志、清崎浩一、力山敏樹：バイオマーカーによる患者選別のpitfall。第26回日本消化器癌発生学会総会 2015.11.19-20 米子口演
  3. 武藤雄太、鈴木浩一、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、齊藤正昭、柿澤奈緒、渡部文昭、辻仲眞康、宮倉安幸、小西文雄、力山敏樹：大腸癌臨
- [学会発表](計43件)
- 2015年国際学会
1. Suzuki K, Takayama Y, Daito T, Ichida K, Fukui T, Muto Y, Kakizawa N, Yuji Kaneda, Watanabe F, Hasegawa F, Saito M, Tsujinaka S,

- 床検体における遺伝子発現プロファイルの腫瘍内不均一性と上皮間葉移行の関係 . 第 26 回日本消化器癌発生学会総会 2015.11.19-20 米子 口演
4. 高山裕司、鈴木浩一、市田晃佑、福井太郎、武藤雄太、加藤高晴、辻仲眞康、宮倉安幸、野田弘志、小西文雄、力山敏樹：転移性大腸がん患者に対する治療経過中の血中 KRAS 遺伝子変異の出現と消退 . 第 74 回日本癌学会学術集会 2015.10.8 ポスター 名古屋 口演
  5. 鈴木浩一：Loquid biopsy leads to a paradigm shift in cancer diagnosis . 第 14 回自治医科大学シンポジウム 2015.9.3 栃木（本院） 口演
  6. 武藤雄太：The expressions of ZEB1 and miR-200 in invasive front are predictive markers for metastasis in colorectal cancer: Intratumor heterogeneity of epithelial-mesenchymal transition . 第 14 回自治医科大学シンポジウム 2015.9.3 栃木（本院） 口演
  7. 市田晃佑：Detection of satellite alpha transcript in sera, as a surrogate marker for the risk of development of multiple cancers in colorectal cancer patients. 第 14 回自治医科大学シンポジウム 2015.9.3 栃木（本院） 口演
  8. 福井太郎：The analysis of gene mutation of ccf-DNA of patients with metastatic pancreatic cancer . 第 14 回自治医科大学シンポジウム 2015.9.3 栃木（本院） 口演
  9. 鈴木浩一、市田晃佑、福井太郎、高山裕司、武藤雄太、齊藤正昭、辻仲眞康、宮倉安幸、野田弘志、力山敏樹：血中遊離核酸のモニタリングとその臨床応用その臨床応用 . 第 70 回日本消化器外科学会総会 2015.7.15-17 浜松 口演
  10. 武藤雄太、鈴木浩一、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、齊藤正昭、辻仲眞康、宮倉安幸、小西文雄、力山敏樹：腫瘍内不均一性を考慮した大腸癌の上皮間葉移行の検討および血中マイクロ RNA と転移の関係 . 第 70 回日本消化器外科学会総会 2015.7.15-17 浜松 口演
  11. 高山裕司、鈴木浩一、福井太郎、市田晃佑、武藤雄太、長谷川芙美、齊藤正昭、辻仲眞康、宮倉安幸、力山敏樹：切除不能大腸癌患者における血中遊離 DNA を用いた KRAS 遺伝子解析と化学療法の効果予測 . 第 70 回日本消化器外科学会総会 2015.7.15-17 浜松 口演
  12. 福井太郎、鈴木浩一、市田晃佑、高山裕司、武藤雄太、辻仲眞康、宮倉安幸、渡部文昭、野田弘志、力山敏樹：切除不能膵癌症例に対する、血中遊離 DNA による遺伝子変異検索と臨床像との比較 . 第 70 回日本消化器外科学会総会 2015.7.15-17 浜松 口演
  13. 齊藤正昭、鈴木浩一、力山敏樹：非癌部組織のエピゲノム異常とがん治療 . 第 4 回消化器合同 Cancer Board 2015.7.8 埼玉 口演
  14. 渡部文昭、鈴木浩一、武藤雄太、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、辻仲眞康、宮倉安幸、小西文雄、力山敏樹：マイクロサテライト不安定性 (MSI) 大腸癌の発癌に関わるゲノムプロファイルの同定 . 第 83 回大腸癌研究会 2015.7.3 久留米 ポスター
  15. 鈴木浩一、武藤雄太、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、柿澤奈緒、渡部文昭、齊藤正昭、宮倉安幸、力山敏樹 血中遊離核酸のモニタリングとその臨床応用 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 シンポジウム
  16. 渡部文昭、鈴木浩一、武藤雄太、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、辻仲眞康、宮倉安幸、小西文雄、力山敏樹 マイクロサテライト不安定性 (MSI) 大腸癌の発癌に関わるゲノムプロファイルの同定 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
  17. 市田晃佑、鈴木浩一、武藤雄太、高山裕司、福井太郎、長谷川芙美、田中宏幸、辻仲眞康、宮倉安幸、力山敏樹 血中で測定する大腸癌における多発癌発生のリスクマーカー 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
  18. 武藤雄太、鈴木浩一、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、長谷川芙美、田中宏幸、辻仲眞康、宮倉安幸、力山敏樹 上皮間葉移行に関わる遺伝子の腫瘍内不均一性の検討 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
  19. 高山裕司、鈴木浩一、武藤雄太、福井太郎、市田晃佑、長谷川芙美、田中宏幸、辻仲眞康、宮倉安幸、力山敏樹 血中遊離核酸のモニタリングによる KRAS 変異クローンの検出とその臨床応用 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
  20. 齊藤正昭、鈴木浩一、市田晃佑、福井太郎、高山裕司、武藤雄太、加藤高晴、力山敏樹 DNA 脱メチル化異常を介した染色体不安定性の解明 第

- 24 回 癌 病 態 治 療 研 究 会  
2015.6.25-26 栃木 口演
21. 柿澤奈緒、鈴木浩一、武藤雄太、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、辻仲眞康、宮倉安幸、野田弘志、力山敏樹 形態学的評価を用いた大腸癌転移の治療戦略 第24回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
22. 齊藤正昭、鈴木浩一、清崎浩一、井本博文、渡部文昭、田中宏幸、谷山裕亮、辻仲眞康、高田 理、宮倉安幸、野田弘志、力山敏樹 胃癌術式選択における背景粘膜のメチル化異常の臨床的意義 第115回日本外科学会定期学術集会 2015.4.16-18 名古屋 口演

2014 年国際学会

- 1 Suzuki K, Kato T, Muto Y, Ichida K, Fukui T, Taka Yama Y, Tsujinaka S, Sasaki J, Watanabe F, Noda H, Horie H, Rikiyama T. Assessment of morphological response contributes to selection of candidates for rescue liver resection among patients undergoing chemotherapy for initially unresectable colorectal liver metastasis. ESMO 16th World Congress on Gastrointestinal Cancer 2014.6.25-28 Barcelona, Spain, Poster
- 2 Ichida K, Suzuki K, Kato K, Muto Y, Fukui T, TakaYama Y, Watanabe F, Tsujinaka S, Sasaki J, Noda H, Horie H, Rikiyama T. Management of patients with colorectal liver metastasis harboring more than 5 multiple tumors. ESMO 16th World Congress on Gastrointestinal Cancer 2014.6.25-28 Barcelona, Spain, Poster
- 3 Takayama Y, Muto Y, Suzuki K, Kato T, Ichida K, Fukui T, Saito M, Tsujinaka S, H Kamiyama K, Sasaki J, Horie H, Kiyozaki K, Rikiyama T. The levels of methionine determined by amino acid profiling correlate with the degree of methylation in colon cancer tissues. ESMO 16th World Congress on Gastrointestinal Cancer 2014.6.25-28 Barcelona, Spain, Poster
- 4 Kato T, Suzuki K, Muto Y, Sasaki J, Tsujinaka S, Kawamura Y, Noda H, Horie H, Konishi F Rikiyama T. Multiple primary malignancies

involving primary sporadic colorectal cancer in Japan: Incidence of gastric cancer with colorectal cancer patients may be higher than previously recognized. 50th 2014 ASCO Annual Meeting 2014.5.30-6.3 Chicago, USA, General Poster

〔図書〕(計3件)

- 1 鈴木浩一, 力山敏樹. 腫瘍性大腸炎のゲノム・エピゲノム解析. 医学のあゆみ. 2015;255(6):661-665
- 2 鈴木浩一, 力山敏樹. DNAメチル化プロファイルによる膵癌診断膵癌治療 up-to-date. 2015;105-112
- 3 鈴木浩一, 力山敏樹. 消化器外科レジデントマニュアル 第3版 9章 癌化学療法 医学書院, 2014;98-104

〔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

力山 敏樹 (RIKIYAMA, Toshiki) (自治医科大学, 医学部, 教授)

研究者番号: 80343060

(2) 研究分担者

鈴木 浩一 (SUZUKI, Koichi) (自治医科大学, 医学部, 講師)

研究者番号: 70332369

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: