

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860521

研究課題名(和文) 肝癌エピゲノム異常の多様性を形成するヒドロキシメチルシトシン修飾異常の解明

研究課題名(英文) Aberrant hydroxymethylation in human liver cancer

研究代表者

永江 玄太 (NAGAE, Genta)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任講師

研究者番号：10587348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌のメチル化プロファイルより、癌特異的な異常高メチル化と低メチル化、およびこれによって形成される4つのサブグループが明らかとなったが、肝癌における異常低メチル化の意義はわかっていない。そこで、我々はTET1高発現肝癌において、シトシンメチル化およびヒドロキシメチル化の網羅的プロファイリングを行った。その結果、ゲノムワイドにヒドロキシメチル化が癌特異的に分布することが明らかとなった。TET1の阻害によって肝癌細胞の増殖が抑制された。このメチル化シトシンの酸化酵素であるTET1はがん関連遺伝子のエピゲノム異常を介して細胞増殖を促進している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Methylation profiles of hepatocellular carcinoma (HCC) have revealed aberrant hypermethylation and hypomethylation, which form four subgroups. However, molecular significance of aberrant hypomethylation in HCC remains poorly understood. Here, we performed comprehensive profiling of cytosine methylation and hydroxymethylation (5-hmC) for the TET1-upregulated HCCs and clarified the aberrant deposition of 5-hmC in a genome-wide manner. Knockdown of endogenous TET1 in hepatoma cell lines decreased hmC deposition with cell growth suppression. Collectively, these results indicate the novel function of methylcytosine dioxygenase TET1 that promotes cell proliferation through epigenetic dysregulation of the oncogenic targets during hepatocarcinogenesis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝臓病学 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は、その発癌過程において、染色体コピー数変化や点突然変異などのジェネティック異常および DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック異常が多数蓄積している。申請者らは肝癌臨床組織の網羅的メチル化解析を行い、肝癌の4つのメチル化サブグループを見出し、これが臨床病理学的情報や臨床的予後とも関連することを明らかにした。異常高メチル化は、一般にポリコム複合体の標的となる転写因子が多いことがすでに知られているが、異常低メチル化は、これまで解析対象とされてこなかったため、どのようなメカニズムで生じるのか、わかっていない。そこで、脱メチル化優位のパターンを示すサブグループで、異常な hmC 修飾が脱メチル化の一端を担っているのではないかと考えた。ゲノムワイドに hmC を検出できる手法を確立し、さらに、肝癌における mC と hmC の分布を比較解析することで、シトシン修飾のダイナミクスという観点から新たな肝癌のエピゲノムの制御異常を解明できないかと考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

肝癌にみられる異常メチル化の生成メカニズムとその意義を、近年同定され DNA 脱メチル化経路の観点から明らかにすることである。肝癌における新たなエピゲノムの制御異常を解明することは、肝癌発癌過程における分子生物学的機序の理解につながるだけでなく、このパスウェイを標的とした治療法の開発など、臨床応用にも重要な意味をもつ。そこで、本研究では、ヒドロキシメチルシトシン (以下、hmC) を定量的かつゲノムワイドに検出できる系を確立したうえで、具体的に以下のことを明らかにすることを目的とする。①肝癌臨床組織には、どの程度異常な hmC 修飾領域が存在するか。②hmC 修飾は、メチルシトシン (以下、mC) 修飾の分布や遺伝子発現に影響を与えているか。③mC を hmC に変換する酵素 TET1 の発現抑制あるいは、酵素活性を阻害することで、肝癌細胞の増殖活性を抑制できるか。

3. 研究の方法

(1) hmC を定量的かつゲノムワイドに検出する系を確立し、肝癌臨床組織に応用する。TET 反応とバイサルファイト処理を組み合わせることで hmC を mC から区別し、マイクロアレイで定量的に検出する。
(2) 肝癌特異的な hmC 修飾領域を明らかにするとともに、異常な mC 領域 (特に低メチル化領域)、遺伝子発現との関係を解析する。
(3) 癌細胞株で TET1 の遺伝子発現あるいは機能を抑制し、これによるエピゲノム変化や細胞形質への影響を検証する。

4. 研究成果

(1) hMeDIP-seq 法を肝癌細胞株および肝癌臨床組織で応用し、hmC 修飾領域のプロファイルを作成した。高発現遺伝子の gene body、特に転写開始点よりやや下流の領域およびエンハンサー領域に優位に存在し、逆に低発現遺伝子周囲ではほとんど認めないことを確認した。また、遠位エンハンサー領域に癌特異的な hmC 修飾領域を認めた

(2) メチルシトシン (以下、mC) 修飾も高発現遺伝子の gene body に分布するが、転写開始点近傍には集積は認めず、むしろ転写停止点付近にかけて増加する傾向がみられた。

(3) mC を hmC に転換する酵素タンパク TET1 の発現抑制あるいは酵素活性を阻害することで、肝癌細胞増殖の抑制効果を認めた。発現解析とエピゲノム解析を比較することで、増殖に関わる癌関連遺伝子が hmC 修飾によって異常に活性化してい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12件)

- ① Saito Y, Nagae G, Motoi N, Miyauchi E, Ninomiya H, Uehara H, Mun M, Okumura S, Ohyanagi F, Nishio M, Satoh Y, Aburatani H, Ishikawa Y. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype in surgically resected small cell lung carcinoma. *Cancer Sci.* 107(3):320-5, 2016 (in press)
- ② Uchi R, Takahashi Y, Niida A, Shimamura T, Hirata H, Sugimachi K, Sawada G, Iwaya T, Kurashige J, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Chiba K, Shiraishi Y, Nagae G, Yoshida K, Nagata Y, Haeno H, Yamamoto H, Ishii H, Doki Y, Iinuma H, Sasaki S, Nagayama S, Yamada K, Yachida S, Kato M, Shibata T, Oki E, Saeki H, Shirabe K, Oda Y, Maehara Y, Komune S, Mori M, Suzuki Y, Yamamoto K, Aburatani H, Ogawa S, Miyano S, Mimori K. Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution. *PLoS Genet.* 12(2):e1005778, 2016
- ③ Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Shiraishi Y, Shimamura T, Yasunaga J, Totoki Y, Chiba K, Sato-Otsubo A, Nagae G, Ishii R, Muto S, Kotani S, Watatani Y, Takeda J, Sanada M, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Iwanaga M, Ma G, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Ogasawara H, Sato T, Sasai K, Muramoto K, Penova M, Kawaguchi T, Nakamura H,

- Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Yoon SS, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A, Matsuda F, Takeuchi K, Nureki O, Aburatani H, Watanabe T, Shibata T, Matsuoka M, Miyano S, Shimoda K, Ogawa S. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet.* 47(11):1304-15, 2015
- ④ Seki M, Nishimura R, Yoshida K, Shimamura T, Shiraishi Y, Sato Y, Kato M, Chiba K, Tanaka H, Hoshino N, Nagae G, Shiozawa Y, Okuno Y, Hosoi H, Tanaka Y, Okita H, Miyachi M, Souzaki R, Taguchi T, Koh K, Hanada R, Kato K, Nomura Y, Akiyama M, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Aburatani H, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nat Commun.* 6:7557, 2015
- ⑤ Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet.* 46(12):1267-73, 2014
- ⑥ Nakahara F, Kitaura J, Uchida T, Nishida C, Togami K, Inoue D, Matsukawa T, Kagiya Y, Enomoto Y, Kawabata KC, Chen-Yi L, Komeno Y, Izawa K, Oki T, Nagae G, Harada Y, Harada H, Otsu M, Aburatani H, Heissig B, Hattori K, Kitamura T. Hes1 promotes blast crisis in chronic myelogenous leukemia through MMP-9 upregulation in leukemic cells. *Blood.* 123(25):3932-42, 2014
- ⑦ Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H, Kume K, Endo F, Kume S. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab.* 19(5):780-94, 2014
- ⑧ Aihara K, Mukasa A, Gotoh K, Saito K, Nagae G, Tsuji S, Tatsuno K, Yamamoto S, Takayanagi S, Narita Y, Shibui S, Aburatani H, Saito N. H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients. *Neuro Oncol.* 16(1):140-6, 2014
- ⑨ Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, Iwama A. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med.* 210(12):2627-39, 2013
- ⑩ Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koefler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet.* 45(10):1232-7, 2013
- ⑪ Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet.* 45(8):860-7, 2013
- ⑫ Yamamoto S, Tateishi K, Kudo Y, Yamamoto K, Isagawa T, Nagae G, Nakatsuka T, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Aburatani H, Omata M, Koike K. Histone demethylase KDM4C regulates sphere formation by mediating the cross talk between Wnt and Notch pathways in colonic cancer cells. *Carcinogenesis.* 34(10):2380-8, 2013

[学会発表] (計6件)

- ①永江玄太、白井聖一、関元昭、工藤洋太郎、神尾明日香、緑川泰、立石敬介、一瀬雅夫、油谷浩幸、TET1 の発現上昇はエンハンサー領

域の異常ヒドロキシメチル化を介して肝細胞癌の悪性形質を促進する、第9回エピジェネティクス研究会、東京、2015年5月

② Nagae G, Shirai K, Seki M, Kamio A, Midorikawa Y, Tateishi K, Ichinose M, Aburatani H., The TET1 promotes malignant characteristics by aberrant enhancer hydroxymethylation in hepatocellular carcinoma., Keystone Symposia, DNA methylation, Colorado (USA)., April, 2015

③ Nagae G, Aburatani H., The TET1 promotes malignant characteristics by aberrant enhancer hydroxymethylation in hepatocellular carcinoma., 73th Japan Cancer Association Annual Meeting (International Session) Yokohama (Japan)., Sept. 25th, 2014

④ Nagae G, Ito H, Tanaka S, Aburatani H, Single cell transcriptome analysis of liver cancer stem cells, Keystone symposia, Stem cells and cancer (Banff, Canada), Feb., 2014

⑤ Nagae G, Tsuji S, Aburatani H, Variable patterns of aberrant promoter methylation in clinical cancer tissues, The 72th Japan Cancer Association Annual Meeting (Yokohama, Japan), Oct., 2013

⑥ 永江玄太、白木伸明、神尾明日香、藤田隆教、糸昭苑、油谷浩幸、Cytosine methylation dynamics during hepatic differentiation、第7回エピジェネティクス研究会、奈良、2013年5月

〔図書〕(計3件)

① 永江玄太、全ゲノムメチル化解析からみえてきたがん細胞のメチル化異常、実験医学増刊 Vol. 32 No. 12、pp67-71、羊土社、2015

② 永江玄太、がん研究におけるシングルセル遺伝子解析、実験医学 2015年1月号、Vol. 33 No. 1、pp7-14、羊土社、2015

③ 永江玄太、油谷浩幸、エピジェネティクスキーワード辞典、DNAメチル化解析法② 網羅的なDNAメチル化解、pp260-267、羊土社、2013

〔産業財産権〕

○出願状況 (計3件)

①名称：肝細胞癌に関する情報の取得方法、ならびに肝細胞癌に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット 発明者：酒井綾子、田井嘉悦、永江玄太、油谷浩幸 権利者：シスメックス、国立大学法人東京大学 種類：特許 番号：特許願 2013-113419 出願年月日：2013年5月29日 国内外の別：国内・海外

②名称：大腸癌に関する情報の取得方法、ならびに大腸癌に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット 発明者：酒井綾子、田井嘉悦、永江玄太、油谷浩幸 権利者：シスメックス、国立大学法人東京大学 種類：

特許 番号：特許願 2013-113419 出願年月日：2013年5月29日 国内外の別：国内・海外

③名称：複数種類の癌に関する情報を取得する方法、システムおよびプログラム 発明者：酒井綾子、田井嘉悦、永江玄太、油谷浩幸 権利者：シスメックス、国立大学法人東京大学 種類：特許 番号：特許願 2013-113419 出願年月日：2013年7月11日 国内外の別：国内・海外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永江 玄太 (NAGAE, Genta)

東京大学先端科学技術研究センター・特任講師

研究者番号：10587348

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者