

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08383

研究課題名(和文) 癌間質のエピジェネティック変化に着目した癌悪性化機構の解明と診断・治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of epigenetic alterations in tumor stromal cells and application in cancer diagnosis and treatment.

研究代表者

幅野 渉 (HABANO, WATARU)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50332979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌は腺管組織を構成する上皮細胞より発生し、遺伝子変異を蓄積する。我々は腺管組織を取り囲む間質組織の役割に着目した。2例の大腸癌の正常および癌組織を対象に、腺管分離法を用いて、それぞれから腺管組織と間質組織を分離・回収した。DNAメチル化の網羅解析を実施し、各分離組織のDNAメチル化プロファイルを得た。正常腺管と癌腺管のメチル化プロファイルの違いは、癌細胞の発育・進展に関わる癌抑制遺伝子などの存在を示唆した。一方、正常間質と癌間質の間では、少数だがメチル化レベルが大きく異なる遺伝子が確認された。エピジェネティクス機構による癌間質の機能変化が大腸癌において重要な役割をする可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genetic alterations accumulate in crypt epithelial cells during colorectal carcinogenesis. We focused on the role of stromal tissue surrounding tumor epithelial cells. Crypt and stromal compartments were isolated from both normal and tumor tissues surgically resected from 2 patients with colorectal cancer, and global DNA methylation profiles were compared among these tissues. Different DNA methylation profile between normal and tumor crypts revealed certain genes responsible for colorectal cancer. Interestingly, there were few, but significant numbers of genes that showed different DNA methylation status between normal and tumor stroma. This suggests that alterations of not only epithelial cells, but also stromal cells, play important roles in colorectal carcinogenesis through an epigenetic mechanism.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：癌間質 腺管分離法 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

癌は上皮細胞より発生し、多段階で遺伝子の変異を蓄積しながら進展する。癌細胞でのみ検出される変異遺伝子の産物を標的とした治療薬が開発され、今では多くの癌患者がその恩恵に与っている。しかしながら、期待どおりの治療効果が現れない癌も存在し、また分子標的薬による治療では、耐性が生まれやすい傾向があることもわかってきた。このように、特定の遺伝子変異を標的とした従来の抗癌剤療法は、必ずしも万能ではなく、新たな課題に直面している。

一方、癌細胞をとりまく微小環境、すなわち線維芽細胞や炎症細胞、血管構成細胞などの間質が、癌細胞の増殖や浸潤、転移に積極的な役割を果たすこともわかってきた。すなわち癌の悪性化には、癌細胞自身の変異の蓄積のみならず、間質細胞の変化によっても影響されることが明らかになってきた。こうした間質と上皮細胞との間で交わされるクロストークは、正常の組織においても重要であり、組織の幹細胞の特徴である「自己複製」と「多分化能」の維持にも大きく関わっている。癌組織では、間質と上皮細胞との相互作用に何らかの変化が起こり、新たなクロストークの形成が推測されている。たとえば癌組織では、間質の主な構成要素である線維芽細胞がマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) を分泌し、細胞外マトリックスを破壊することで癌細胞の浸潤を促進させることが証明されている (Stuelten C.H et al., J Cell Sci 2005;118:2143)。また、肺腺癌の間質中にリンパ管内皮細胞マーカーである Podoplanin を発現する線維芽細胞を間質中に多く含む肺腺癌では、リンパ節転移陽性例が多く予後不良であることも報告されている (Kawase A et al., Int J Cancer 2008;123:1053)。このように、間質が癌悪性化に寄与する分子機構は多様であると同時に、これらの因子が相加・相乗的に働くことが予想される。したがって、正常組織の間質と癌組織の間質との間の生物学的な差異を包括的かつ系統的に把握することが重要となる。

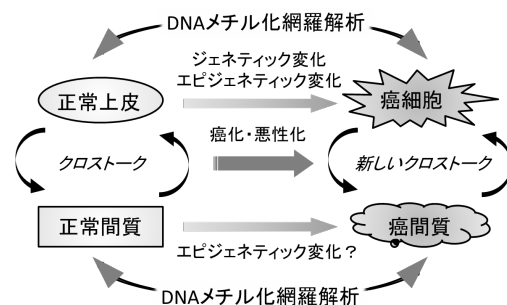
多段階で進行する癌細胞の悪性化に、間質細胞が継続的に寄与するためには、癌の間質で起こる機能変化は柔軟である一方、非可逆的でなければならない。そのためには間質細胞に突然変異もしくはエピジェネティックな変化が起こることが不可欠となる。このうち突然変異が多数の間質細胞に同様に起こるとは、増殖を続ける癌細胞とは異なり考えにくいのが、エピジェネティックな変化である DNA メチル化であれば癌間質で起こる可能性は高い。実際にピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) 感染で誘発された慢性炎症において、間質線維芽細胞における特定の遺伝子の DNA メチル化が蓄積され、癌化に寄与することが証明されている。また、癌組織近傍の

正常背景粘膜において、DNA メチル化異常が蓄積して発癌の素地を形成していることを考慮すると、間質においても DNA メチル化異常の芽が発生することは十分に考えられる。DNA メチル化異常が特定の遺伝子に蓄積することにより、間質がその生物学的性質を変化させ、癌細胞にとって、さらには間質自身にとって居心地のよい微小環境を形成している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、正常組織の間質と癌組織の間質を対象に、DNA メチル化の網羅解析を試みる。両者の間でメチル化状態が異なる遺伝子は、その発現量を変化させることで癌の悪性化に寄与する可能性がある。癌間質における DNA メチル化プロファイルの全体像が明らかになれば、癌の発育・進展の新しい分子メカニズムの発見につながり、新たな研究領域の開拓につながることになる。また、癌の生物学的分類や浸潤・転移などの予後の予測、さらには抗癌剤治療に対する感受性の評価への貢献も期待される。

本研究の特長は、間質細胞の正確なプロファイルを得るために、腺管分離法を用いることである。我々はこれまでに大腸癌や胃癌組織を対象に同法を用いて上皮腺管と間質を実体顕微鏡下で分取することで、精度の高い遺伝子解析を実施してきた (Habano W et al., Lab Invest 1996;74:933 および研究業績 16, 17, 18, 19, 他)。組織切片より目的の領域のみを回収するマイクロダイセクション法でも間質の採取は可能だが、DNA の断片化により網羅解析の精度の低下を免れない。その点、腺管分離法では質の高い DNA を回収できるため、現時点では本法によってのみ、純粋な間質の解析が可能と思われる。また、我々は培養細胞を対象に DNA メチル化の網羅解析を実施した経験もあり、エピジェネティクス機構により発現が制御される薬物代謝酵素を複数同定している (平成 26 年度生化学会シンポジウム発表)。腺管分離法と DNA メチル化網羅解析を組み合わせることで、癌間質における詳細かつ正確な DNA メチル化プロファイルを初めて明らかにすることができる。



3. 研究の方法

3-1. 対象症例および腺管・間質組織の分離

岩手医科大学医学部附属病院において大腸癌手術で摘出された3症例 (No. 1687, 1727, 1663) の癌組織およびその周囲の正常組織を対象とした。

腺管分離法³⁾により、癌粘膜および正常粘膜それぞれから、腺管組織と間質組織を実体顕微鏡下で分別し収集した。特に癌間質については、形態のみでは腺管の混入がないことを判断できないため、腺管が確認されない微小の組織片を癌間質候補として、多数の組織片を回収した。

3-2. ゲノム DNA の抽出・精製

分離した正常腺管、正常間質、癌腺管および癌間質を対象に、NucleoSpin Tissue キット (MACHEREY-NANGEL GmbH & Co. KG, Germany) を用いてゲノム DNA を抽出し精製した。

3-3. 癌腺管における TP53 遺伝子変異の探索

正常腺管と癌腺管のゲノム DNA を対象に、癌抑制遺伝子 TP53 (exon 5~8 領域) の変異を調べるため、AmpliTaQ Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) または TaKaRa EpiTaq HS (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて遺伝子増幅を行った。遺伝子増幅に用いたプライマーの塩基配列とアニーリング温度を表 1 に示す。

表1 プライマーの配列、PCR条件、および変異検出のための制限酵素

プライマー	配列 (5' -3')	アニーリング (°C)	増幅長 (bp)	制限酵素
TP53_ex5	ATCTGTTCACTTGTGCCCTGA	55	308	-
	TCAGTGAGGAATCAGAGGCCT			
TP53_ex6	AGATAGCGATGGTGAGCAGCT	60	261	-
	GCCACTGACAACCACCTTAA			
TP53_ex7	TTGCCACAGGTCTCCCAAG	55	305	-
	ATTCCCGCGGAAATGTGAT			
TP53_ex8	ACAGGTAGGACCTGATTTC	55	249	-
	TGAGGCATAACTGCACCTT			
codon176 変異検出	GACGGAGTTGTGAGGCGGT	62	124	RsaI
	TCAGTGAGGAATCAGAGGCCT			
codon 248 変異検出	TTGCCACAGGTCTCCCAAG	62	124	MspI
	ATTCCCGCGGAAATGTGAT			
codon 273 変異検出	TTAAATGGGACAGGTAGGACCTGAT	60	126	HhaI
	TCTCTCCAGGACAGGCACAAACGC			

増幅産物を 2%アガロースゲルにて電気泳動し (60 V、1 時間) エチジウムブロマイド染色により確認した。アガロースゲルから目的の DNA を切り出し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (MACHEREY-NANGEL GmbH & Co. KG) を用いて精製した。これを鋳型として、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いた direct sequencing 法により、TP53 遺伝子の変異を調べた。

3 症例で検出された 3 種の遺伝子変異部位をそれぞれ検出可能な制限酵素を探し出し、そのための遺伝子増幅プライマーを再設計した (表 1)。これらを用いて正常腺管と癌腺管における遺伝子増幅産物の消化を行った。これを 2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、正常腺管と癌腺管の間で制限酵素による切断パターンの違いがあることを確認した。

3-4. 癌間質候補における TP53 遺伝子変異の解析

上記のプライマーと制限酵素を用いて、癌間質候補の組織片を対象に TP53 遺伝子の変異の有無を調べた。癌腺管と同様の切断パターンが検出されない組織片を、腺管が混入しない純粋な癌間質と判断し、それらを混合して DNA 量を増やし、以後の解析に用いた。

3-5. DNA メチル化網羅解析

2 症例 (1687, 1727) の正常腺管、正常間質、癌腺管、癌間質を対象に、Infinium Methylation EPIC (Illumina, San Diego, CA) による DNA メチル化の網羅解析を行った。全 854,251 箇所の CpG 部位における DNA メチル化レベルを 0 (完全非メチル化) から 1 (完全メチル化) の値 (値) で示した。組織間での DNA メチル化状態を比較するため、各 CpG 部位における 値の差を求めた。その値が 0.5 以上または -0.5 以下となる CpG 部位の数より、DNA メチル化状態の違いを評価した。

4. 研究成果

4-1. 腺管および間質の分離

腺管分離法を用いて癌組織より分離した癌腺管および癌間質の実体顕微鏡像を図 1 に示した。



癌腺管

癌間質

図1 癌腺管と癌間質の実体顕微鏡像 (症例1687)

4-2. 腺管および間質における TP53 遺伝子変異の解析

症例 1687 の癌腺管では、TP53 遺伝子 exon 7 内の codon 248 における CGG TGG ホモ変異が検出された (図 2a)。同部位は野生型 TP53

においてのみ、制限酵素 MspI に認識され切断されることが確認された。合計 80 サンプルの癌間質候補の中では MspI で切断される 3 サンプルが検出され、癌間質に由来するゲノム DNA が得られたことがわかった (図 2b)。

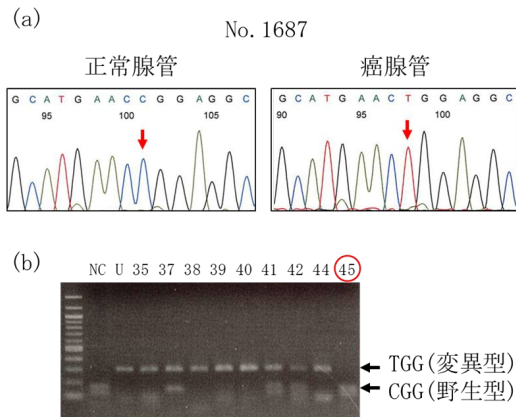


図2 症例1687におけるTP53遺伝子解析
(a) direct sequencingの結果、癌腺管ではexon 7のcodon 248においてCGG→TGGのホモ変異が検出された。(b)制限酵素MspIにより野生型遺伝子のみが切断されるため、サンプル45が野生型遺伝子のみをもつ癌間質の組織片であることが確認できた。左端のレーンは100 bp ladderの分子量マーカー、NCは正常腺管、Uは未切断のPCR産物を示す。

症例 1727 の癌腺管では、TP53 遺伝子 exon 5 内の codon 176 における TGC TAC ホモ変異が検出された (図 3a)。制限酵素 RsaI で認識される配列が含まれるような forward プライマーを設計し、PCR 産物を得た。その結果、変異型 TP53 遺伝子においてのみ、RsaI に認識され切断されることが確認された。合計 12 サンプルの癌間質候補の中では RsaI で未切断となる 6 サンプルが検出され、癌間質に由来するゲノム DNA が得られたことがわかった (図 3b)。

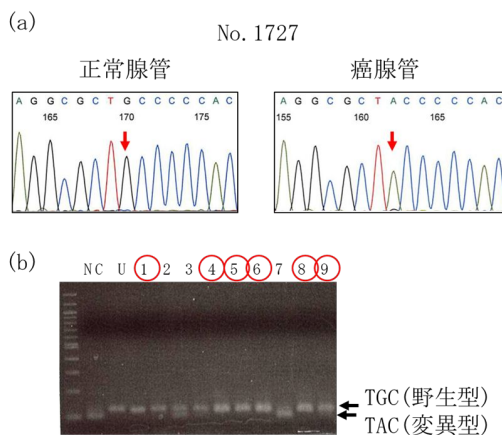


図3 症例1727におけるTP53遺伝子解析
(a) direct sequencingの結果、癌腺管ではexon 5のcodon 176においてTGC→TACのホモ変異が検出された。(b)制限酵素RsaIにより変異型遺伝子のみが切断されるため、サンプル1、4、5、6、8、9が野生型遺伝子のみをもつ癌間質の組織片であることが確認できた。左端のレーンは100 bp ladderの分子量マーカー、NCは正常腺管、Uは未切断のPCR産物を示す。

症例 1663 の癌腺管では、TP53 遺伝子 exon 8 内の codon 273 における CGT TGT ホモ変異が検出された (図 4a)。制限酵素 HhaI で認識される配列が含まれるような reverse プライマーを設計し、PCR 産物を得た。その結果、野生型 TP53 遺伝子においてのみ、HhaI に認識され切断されることが確認された。合計 18 サンプルの癌間質候補の中では HhaI で切断される 2 サンプルが検出され、癌間質に由来するゲノム DNA が得られたことがわかった (図 4b)。

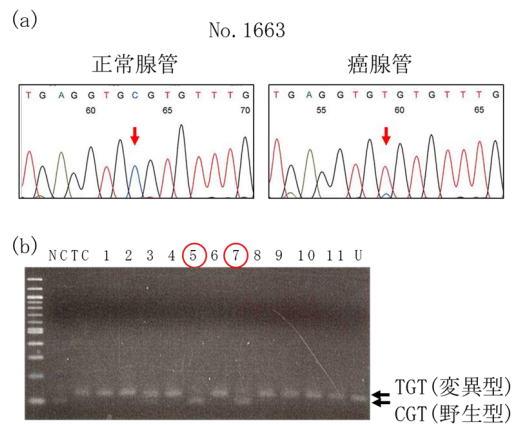


図4 症例1663におけるTP53遺伝子解析
(a) direct sequencingの結果、癌腺管ではexon 8のcodon 273においてCGT→TGTのホモ変異が検出された。(b)制限酵素HhaIにより野生型遺伝子のみが切断されるため、サンプル5、7が野生型遺伝子のみをもつ癌間質の組織片であることが確認できた。左端のレーンは100 bp ladderの分子量マーカー、NCは正常腺管、TCは癌腺管、Uは未切断のPCR産物を示す。

4-3. DNA メチル化網羅解析

DNA メチル化の網羅解析の結果、正常腺管、正常間質、癌腺管、癌間質の各組織の間で、全 854,251 部位のメチル化レベル (β 値) の平均値および標準偏差には顕著な差は認められなかった (図 5a、5b)。

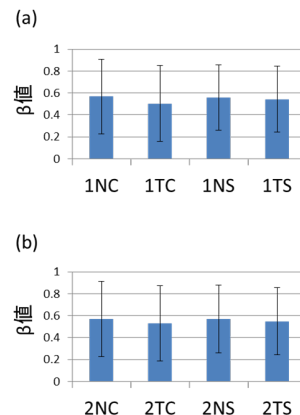


図5 2症例におけるDNAメチル化網羅解析の結果
症例1687 (a)および1727 (b)の各組織における、全854,251部位のβ値の平均値と標準偏差を示す。NC (正常腺管)、TC (癌腺管)、NS (正常間質)、TS (癌間質)。

次に、比較したい組織間で、各 CpG 部位における 値の差を求めた。同じ組織どうしを 2 症例の間で比較すると、 値の差が大きい CpG 部位数は癌腺管で多く、DNA メチル化状態の差が大きかった (図 6、1TC-2TC)。同じ症例について 4 種の組織間で比較すると、癌間質と癌腺管 (TS-TC)、癌腺管と正常腺管 (TC-NC) および正常間質と正常腺管 (NS-NC) の間で、 値の差が大きい部位数が多く、DNA メチル化状態の差が大きかった。一方、癌間質と正常間質 (TS-NS) の間では、DNA メチル化状態の差は相対的に小さかった。

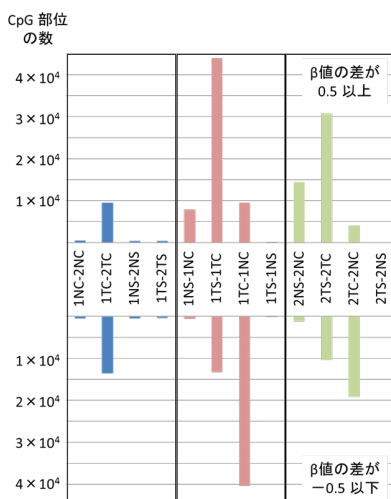


図6 組織間でのDNAメチル化状態の比較
比較する組織間で各CpG部位のβ値の差を求め、その差が0.5以上(上段)または-0.5以下(下段)となるCpG部位の数を示した。青色のカラムは同じ組織どうしを2症例間で比較した結果、赤色および緑色のカラムは、同じ症例(それぞれ1687、1727)における組織間で比較した結果を示す。

本研究では、大腸癌間質組織における DNA メチル化状態を調べるために、腺管分離法を用いて、腺管および間質組織の分離・回収を試みた。癌組織では正常組織とは異なり、腺管と間質が複雑に入り乱れた不秩序な形態をとるため、分離が困難となることが予想された。我々は癌腺管でのみ検出される TP53 癌抑制遺伝子の変異を指標にすることで、癌腺管の含まない癌間質の分離を行うことができた。癌抑制遺伝子では対立遺伝子の両方が不活性化されることが多く、実際に今回の 3 症例でも癌腺管における野生型 TP53 遺伝子は検出されなかった。従って、癌腺管では変異型のみ、癌間質では野生型のみ TP53 遺伝子を確認することにより、分離された組織の純度が高いことを証明することができた。TP53 や APC の遺伝子変異は多くの大腸癌症例において観察されるため、遺伝子変異を指標とした今回の手法は、他の研究にも有用と思われる。

また、大腸癌組織の正常腺管と間質および癌腺管と間質において、DNA メチル化状態のプロファイルを明らかにすることができた。網羅解析された全 854,251 箇所の CpG 部位におけるメチル化レベルの平均値と変動の大

きさは、組織間で顕著な差は認められなかった。だが、対応する CpG 部位どうしでメチル化レベル(値)の差を算出すると、組織によっては大きな差を見出すことができた。例えば、同じ組織どうしを 2 症例の間で比較した場合には、癌腺管どうしのみにおいて顕著な差が認められた。これは、メチル化あるいは脱メチル化される遺伝子のパターンが癌症例ごとに異なり、癌の個性を生み出す原因となることを示唆する結果であった。

また、同じ症例の異なる組織間においても、DNA メチル化状態の違いが検出された。この結果からも、正常および癌の両組織において、腺管と間質組織の回収が正確に行えたことが証明された。癌腺管と正常腺管の間で検出された DNA メチル化レベルの異なる遺伝子は、癌の発育・進展に重要な役割を果たす癌抑制遺伝子等の候補となる。正常組織と癌組織の純粋な上皮腺管を対象に網羅解析して比較した研究はこれまで少なく、検出感度が高い本研究手法では、新規の癌関連遺伝子の発見が期待できる。一方、癌間質と正常間質の間では、 値の差が 0.5 より大きくなる CpG 部位の数は比較的少なかった。だが、一部の CpG 部位で観察された DNA メチル化レベルの差は、間質組織において重要なはたらきをする遺伝子の存在を推測させた。今後は症例数を増やし、より正確な DNA メチル化プロファイルを評価することが必要と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1) Sugai T, Takahashi Y, Eizuka M, Sugimoto R, Fujita Y, Habano W, Otsuka K, Sasaki A, Yamamoto E, Matsumoto T, Suzuki H. Molecular profiling and genome-wide analysis based on somatic copy number alterations in advanced colorectal cancers. *Molecular Carcinogenesis* (査読あり) 2018 年 57(3):451-461.

DOI:10.1002/mc.22769

2) Sugai T, Yoshida M, Eizuka M, Uesugii N, Habano W, Otsuka K, Sasaki A, Yamamoto E, Matsumoto T, Suzuki H. Analysis of the DNA methylation level of cancer-related genes in colorectal cancer and the surrounding normal mucosa. *Clinical Epigenetics* (査読あり) 2017 年 9:55

DOI:10.1186/s13148-017-0352-4.

3) Sugai T, Eizuka M, Takahashi Y, Fukagawa T, Habano W, Yamamoto E, Akasaka R, Otsuka K, Matsumoto T, Suzuki H. Molecular subtypes of colorectal cancers determined by PCR-based analysis. *Cancer Science* (査読あり) 2017 年 108(3):427-434.

DOI:10.1111/cas.13164.

4) Takahashi Y, Sugai T, Habano W, Ishida K, Eizuka M, Otsuka K, Sasaki A, Takayuki Matsumoto, Morikawa T, Unno M, Suzuki H.

Molecular differences in the microsatellite stable phenotype between left-sided and right-sided colorectal cancer. International Journal of Cancer (査読あり) 2016年 139(11):2493-501.

DOI:10.1002/ijc.30377.

5) Habano W, Kawamura K, Iizuka N, Terashima J, Sugai T, Ozawa S. Analysis of DNA methylation landscape reveals the roles of DNA methylation in the regulation of drug metabolizing enzymes. Clinical Epigenetics (査読あり) 2015年 7:105.

DOI:10.1186/s13148-015-0136-7.

〔学会発表〕(計 3件)

1) 神馬瑠子、博多修子、幅野 涉、小澤正吾、寺島 潤 : AhR function in human lung cancer cells. 第76回日本癌学会学術総会 2017年

2) 博多修子、寺島潤、幅野涉、小澤正吾 : DNAメチル基転移酵素阻害剤併用によるヒト大腸がん細胞株のイリノテカン感受性増強とアポトーシス関連タンパクの発現変動 . 第75回日本癌学会学術総会 2016年

3) 幅野涉、寺島潤、小澤正吾 : DNAメチル化模様から推測した薬物代謝酵素の発現制御におけるDNAメチル化の役割. 第30回日本薬物動態学会年会 2015年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

幅野 涉 (Habano, Wataru)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 5 0 3 3 2 9 7 9

(3) 連携研究者

菅井 有 (Sugai, Tamotsu)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 2 0 1 8 7 6 2 8