

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18431

研究課題名(和文)大腸発癌リスクを予測するヒストン修飾異常解明と個別化予防の確立

研究課題名(英文)Identification of histon modifications to predict colorectal cancer risk

研究代表者

原田 拓 (Harada, Taku)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60468030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：MSI大腸がんの前がん病変であるSSA/Pの分子異常としてDNAメチル化異常が知られている。SSA/Pの多くは右側結腸に存在し、多発することも多い。SSA/P症例の正常右側大腸粘膜では、H3K27me3でマークされている遺伝子数が非SSA/P症例と比較して有意に多かった。またSSA/P症例の正常大腸粘膜でH3K27me3を示す遺伝子は、SSA/Pにおいて高頻度にDNAメチル化を示した。一方、非SSA/P症例ではこのような傾向は認めなかった。右側大腸粘膜のH3K27me3修飾の蓄積がSSA/PのDNAメチル化異常のpre-markとなり、SSA/P発生に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that genes marked by bivalent chromatin domain in ESCs are significantly associated with H3K27me3 in noncancerous colonic mucosa of patients with CIMP-positive tumors. Moreover, a large number of genes marked by H3K27me3 in noncancerous colonic mucosa were specifically methylated in CIMP-positive CRCs. In contrast, such enrichment of H3K27me3 was not observed in colonic mucosa of patients with CIMP-negative tumors. We identified a series of genes, which were marked by H3K27me3 in the background colonic mucosa of CIMP-positive CRCs and were aberrantly methylated in CIMP-positive CRCs. Our results suggest that H3K27me3 may act as a pre-mark in the noncancerous colon mucosa of patients at a high risk of CIMP-positive cancer.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸がん エピジェネティクス DNAメチル化 ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の発生において遺伝子変異のみならず、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピゲノム異常の重要性が明らかにされている。

近年、大腸鋸歯状病変である Sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P)において、高率な BRAF 変異、CpG アイランドメチル化の多発(CpG island methylator phenotype, CIMP)など、マイクロサテライト不安定性(MSI)大腸癌に特徴的な分子異常が明らかにされ、前癌病変として注目されるようになった。

SSA/P の多くは右側結腸に存在し、多発することも多く、背景大腸粘膜に SSA/P 発生の素地となる分子異常の存在が示唆される。

近年、大腸癌細胞において DNA メチル化異常を受ける遺伝子の多くは、胚性幹細胞(ES 細胞)において転写活性化のマークであるヒストン H3K4 のトリメチル化(H3K4me3)と、転写抑制のマークである H3K27 トリメチル化(H3K27me3)が共存した bivalent な状態にあることが報告されている。

これらの知見からヒストン修飾と DNA メチル化の間には密接な関連があり、ヒストン修飾が DNA メチル化の pre-mark となっている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

大腸発癌フィールド形成に関わるヒストン修飾異常を解明し、大腸癌リスク予測マーカーとして臨床応用することを目的とする。

3. 研究の方法

SSA/P 症例と非 SSA/P 症例の正常右側大腸粘膜と腫瘍を対象として、DNA メチル化とヒストン修飾異常の統合解析を行った。

網羅的 DNA メチル化は Infinium HumanMethylation450 array を用いて解析した。

ヒストン修飾はヒストン H3K4me3 および H3K27me3 に対する抗体を用いて ChIP を行った。Real-time RCR により ChIP 実験の成否を確認した後に、高速シーケンサーを用いて ChIP シークエンス解析を行った。

バイオインフォマティクス解析により大腸癌高リスク群とされる SSA/P 症例の正常大腸粘膜に特徴的なヒストン修飾パターンを示す遺伝子を抽出した。

同定した候補遺伝子におけるヒストンメチル化、DNA メチル化を ChIP-qPCR、パイロシーケンサーを用いて多数検体を用いて解析した。

4. 研究成果

SSA/P 症例の正常大腸粘膜におけるヒスト

ン修飾(H3K4me3 と H3K27me3)を解析した。ES 細胞において Bivalent 修飾を受け、かつ癌細胞で DNA メチル化する遺伝子の多くは、SSA/P 症例の背景大腸粘膜において H3K27me3 でマークされていた。また正常大腸粘膜において H3K27me3 でマークされている遺伝子の約 60%が、ES 細胞では Bivalent 修飾を受けていた。

次に SSA/P 症例および非 SSA/P 症例の正常大腸粘膜におけるヒストン修飾(H3K4me3 と H3K27me3)を比較検討した。SSA/P 症例の正常右側大腸粘膜では、H3K27me3 でマークされている遺伝子数が非 SSA/P 症例と比較して有意に多かった。また SSA/P 症例の正常大腸粘膜で H3K27me3 を示す遺伝子は、SSA/P において高頻度に DNA メチル化を示した。一方、非 SSA/P 症例ではこのような傾向は認めなかった。

これらの結果は背景大腸粘膜における H3K27me3 が、SSA/P の DNA メチル化異常の pre-mark となっている可能性を示唆している。

次に SSA/P の背景粘膜に特徴的な 5 遺伝子を抽出し、SSA/P と非 SSA/P 症例の正常大腸粘膜 65 検体を対象に ChIP-qPCR 解析(H3K4me3 と H3K27me3)を行った。

SSA/P 症例の右側結腸では高頻度に H3K27me3 が検出されたが(p<0.01)、左側結腸は H3K27me3 を示さなかった。右側大腸粘膜の H3K27me3 修飾の蓄積が SSA/P の DNA メチル化異常の pre-mark となり、SSA/P 発生に関与している可能性が示唆された。

一方で抽出した遺伝子の H3K4me3 はほとんど検出されなかった。

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 5 件)

1. Kai M, Yamamoto E, Sato A, Yamano HO, Niinuma T, Kitajima H, Harada T, Aoki H, Maruyama R, Toyota M, Hatahira T, Nakase H, Sugai T, Yamashita T, Toyota M, Suzuki H. Epigenetic silencing of diacylglycerol kinase gamma in colorectal cancer. *Mol Carcinog.* 2017 Feb 20. doi: 10.1002/mc.22631. [Epub ahead of print] 査読あり
2. Kai M, Niinuma T, Kitajima H, Yamamoto E, Harada T, Aoki H, Maruyama R, Toyota M, Sasaki Y, Sugai T, Tokino T, Nakase H, Suzuki H. TET1 Depletion Induces Aberrant CpG Methylation in Colorectal Cancer Cells. *PLoS One.* 2016 Dec

15;11(12):e0168281.doi:
10.1371/journal.pone.0168281.
eCollection 2016. 査読あり

3. Sawada T, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Harada T, Maruyama R, Ashida M, Aoki H, Matsushita HO, Yoshikawa K, Harada E, Tanaka Y, Wakita S, Niinuma T, Kai M, Eizuka M, Sugai T, Suzuki H. Assessment of epigenetic alterations in early colorectal lesions containing BRAF mutations. *Oncotarget*. 2016 Jun 7;7(23):35106-18. doi: 10.18632/oncotarget.9044. 査読あり
4. Kamimae S, Yamamoto E, Kai M, Niinuma T, Yamano HO, Nojima M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada E, Harada T, Maruyama R, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H. Epigenetic silencing of NTSR1 is associated with lateral and noninvasive growth of colorectal tumors. *Oncotarget*. 2015 Oct 6;6(30):29975-90. doi: 10.18632/oncotarget.5034. 査読あり
5. 山本 英一郎, 山野 泰穂, 田中 義人, 青木 敬則, 原田 拓, 木村 友昭, 菅井 有, 鈴木 拓. 【大腸鋸歯状病変の取り扱い】大腸鋸歯状病変の分子生物学的特徴. 胃と腸 50:1649-1656, 2015. 査読なし

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Kitajima H, Maruyama R, Yamamoto E, Niinuma T, Aoki H, Harada T, Kai M, Nakase H, Tokino T, Suzuki H. Identification of a Long Noncoding RNA Associated with Chronic Gastritis and Gastric Cancer. The 35th Sapporo International Cancer Symposium 2016:2016 June 24-25: Sapporo, Japan
2. 青木敬則, 山本英一郎, 山野泰穂, 萬 顕, 石黒一也, 原田 拓, 新沼 猛, 甲斐正広, 足立 靖, 遠藤高夫, 菅井 有, 鈴木 拓. 大腸鋸歯状腺腫の進展に関わる DNA メチル化異常の同定. 第 75 回日本癌学会学術総会: 2016 年 10 月 6-8 日: 横浜

3. 北嶋洋志, 丸山玲緒, 山本英一郎, 新沼 猛, 青木敬則, 原田 拓, 甲斐正広, 仲瀬裕志, 時野隆至, 鈴木 拓. 慢性胃炎および胃癌に関する長鎖 noncodingRNA の同定. 第 75 回日本癌学会学術総会: 2016 年 10 月 6-8 日: 横浜
4. 澤田 武, 山本英一郎, 山野泰穂, 野島正寛, 原田 拓, 青木敬則, 新沼 猛, 丸山玲緒, 甲斐正広, 片岡洋望, 菅井 有, 鈴木 拓, 城卓志. BRAF 遺伝子変異を伴う大腸癌病変と背景粘膜のメチル化解析. 第 74 回日本癌学会学術総会: 2015 年 10 月 8-10 日: 名古屋
5. 原田拓, 鈴木拓, 山野泰穂. JDDW2015 腸管洗浄液のメチル化解析による大腸癌診断法の検討. 2015 年 10 月 9 日 東京
6. 丸山 玲緒, 原田 拓, 桑川 昂平, 山本 英一郎, 山野 泰穂, 新沼 猛, 野島正寛, 篠村恭久, 今井浩三, 鈴木 拓. 大腸がんにおける non-coding RNA 遺伝子のエピゲノム解析と臨床への応用. 第 35 回日本分子腫瘍マーカー研究会: 2015 年 10 月 7 日: 名古屋

〔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:
出願年月日:
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

原田 拓 (Harada Taku)
札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60468030

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：