

研究種目：特定領域研究  
研究期間：2005～2009  
課題番号：17013090  
研究課題名（和文） 胃がんでの DNA メチル化異常ゲノム網羅的解析によるがん抑制遺伝子の同定と機能解析  
研究課題名（英文） Identification of tumor suppressor genes in gastric cancers by genome-wide analysis of DNA methylation and its functional analysis  
研究代表者  
牛島 俊和 (USHIJIMA TOSHIKAZU)  
国立がんセンター（研究所及び東病院臨床開発センター）・発がん研究部・部長  
研究者番号：90232818

## 研究成果の概要（和文）：

DNA メチル化異常誘発の分子機構及びその誘発因子には不明な点が多い。CpG アイランド (CGI) 内の散在性 CpG メチル化が誘発される頻度が異なる胃がん細胞株各 2 系統を用い、散在性メチル化は CGI 全体の高密度なメチル化につながることを示した。高転写の遺伝子のメチル化も誘発することを示した。*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染によるメチル化異常誘発には遺伝子特異性が存在し、遺伝子の低転写がその特異性に重要であることを明らかにした。スナネズミモデルを用いた解析から、メチル化異常の誘発には炎症の種類が重要であることを示した。

## 研究成果の概要（英文）：

Molecular mechanisms of methylation induction and its inducing factors are still unclear. We showed that the increased methylation of scattered CpG sites could lead to dense methylation of an entire CGI, and could methylate even genes with high expression. We also showed that specific genes were methylated in gastric mucosae with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection, and that low gene transcription is an important factor to determine the specificity. Using the Mongolian gerbil model, we showed that the types of inflammations are important for induction of aberrant DNA methylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	8,600,000	0	8,600,000
2006年度	8,300,000	0	8,300,000
2007年度	8,300,000	0	8,300,000
2008年度	8,300,000	0	8,300,000
2009年度	8,300,000	0	8,300,000
総計	41,800,000	0	41,800,000

研究分野：がん

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト胃がんには、がん抑制遺伝子の不活化機構として、遺伝子突然変異よりも遺伝子サイレンシングの方が高頻度であるなど、DNAメチル化異常が深く関与する。研究代表者は、ゲノム網羅的にプロモーター領域 CpG アイランド(CGI)のメチル化によりサイレンシングされる遺伝子を同定するために、methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法を開発し、各種ヒトのがん(乳がん、膵がん、悪性黒色腫、神経芽細胞腫)で、プロモーター領域 CGI のメチル化によりサイレンシングされる遺伝子を同定してきた。

胃がんについては、細胞株を用いた MS-RDA 法により、2 系統の胃がん細胞株(MKN28 及び MKN74)で異常にメチル化された遺伝子プロモーター領域 CGI 9 個を同定した。このうち、既知の報告から、がん抑制遺伝子の可能性が高いと予想される 2 個について機能解析を行った。その結果、*LOX* 遺伝子は、足場依存性の増強、造腫瘍性の抑制を認め、がん抑制遺伝子であることを示した。

一部の胃がん細胞株では、DNA メチル化異常が多く CGI に認められるが、その分子機構は分かっていない。ヒト胃がんのがん抑制遺伝子 *Lysyl oxidase (LOX)* を同定する過程で、(a)一部のヒト胃がん細胞株では、CpG アイランド内の幾つかの CpG 部位に散在性のメチル化が持続的に誘発されること(散在性メチル化増加)、(b)散在性メチル化増加は、一定の頻度で、CpG アイランド全体の高密度メチル化を誘発することを見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1)胃がんにおける DNA メチル化異常の誘発機構として、散在性 DNA メチル化の意義を明らかにすること、(2)胃粘膜メチル化される遺伝子に、遺伝子特異性があるかないか、また、あるとしてその原因となる分子機構を解明すること、(3)胃粘膜における炎症の種類と DNA メチル化異常誘発能の関連を明らかにすること、を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト胃粘膜材料

*H. pylori* 感染者(健常者と胃がん患者)及び非感染者(健常者と胃がん患者)の胃粘膜を生検により採取した。

### (2) スナネズミでの胃炎誘発

各群 8 匹の 5 週齢雄スナネズミに、*H.*

*pylori* の経口投与、MNU の飲水投与、飽和食塩水の強制胃内投与、または、50%エタノールの間欠投与を、20 週間実施した。屠殺後、胃粘膜全層及び胃粘膜上皮を採取し、胃粘膜上皮での DNA メチル化レベル、胃粘膜全層での組織学的に炎症を検索した。

### (3) メチル化サイレンシングされた遺伝子の検索

4 系統の胃がん細胞株(AGS, KATOIII, HSC39 及び HSC57)を、低濃度の 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)で処理した。具体的な処理濃度は、それぞれの胃がん細胞株で DNA メチル基転移酵素 DNMT1 を高度に低下させ、かつ、細胞増殖抑制が軽度な濃度を設定した。発現誘導される遺伝子をオリゴヌクレオチドマイクロアレイによりスクリーニングし、処理前にはほとんど発現せず、処理後に高度に発現誘導される遺伝子を検索した。

### (4) 遺伝子発現解析

DNA メチル基転移酵素等の遺伝子発現は定量的 RT-PCR 法により解析した。

### (5) DNA メチル化解析

ヒト胃がん細胞株でメチル化されうる遺伝子 48 個についてメチル化特異的 PCR(MSP)法により解析した。

スナネズミ胃粘膜では、別の研究で同定した 8 個の CGI について、メチル化レベルを定量的 MSP 法により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 散在性メチル化増加の分子機構解析

散在性メチル化の産生増加を示す胃がん細胞株 2 系統(AGS, KATO-III)と、示さない胃がん細胞株 2 系統(HSC39, HSC57)について、サイレンシングされた遺伝子数を測定した。具体的には、これら細胞株を、脱メチル化剤 5-aza-dC により処理、発現回復する遺伝子をオリゴヌクレオチドマイクロアレイにより解析した。処理前は発現がほとんどなく、処理後に 16 倍以上上昇した遺伝子数は、AGS, KATO-III, HSC39, HSC57で、それぞれ 44, 97, 21, 9 個であった。プロモーター領域 CGI のメチル化状態を解析したところ、メチル化によりサイレンシングされる遺伝子数は、それぞれ 24, 41, 4, 1 個と推計された。従って、散在性メチル化が多い細胞株では、サイレンシングされた遺伝子が多いことがゲノムレベルで確認された。

サイレンシングが確認された遺伝子のうち 13 個について、正常な胃での転写量を検討したところ、転写量が多い遺伝子 8 個は散在性メチル化の増加を示す細胞株でのみメチル化されていたのに対し、転写量が少ない遺伝子 5 個は何れの細胞株でもメチル化されていた。従って、散在性メチル化の増加は、プロモーター領域 CGI において、転写によるメチル化からの防御に打ち勝って、高密度メチル化を誘発することが示唆された。

更に、散在性 DNA メチル化の増加と各種 DNA メチル化酵素 (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) の発現との関連を解析したところ、散在性 DNA メチル化が増加した細胞株では DNMT3B の過剰発現を認めた。そこで、DNMT3B を胃癌細胞株 MKN28 で過剰発現させると、散在性メチル化が増加し、低頻度ながら CGI 全体の高密度メチル化につながることも認めた。

## (2) *H. pylori* による DNA メチル化異常誘発の遺伝子特異性

これまで、ヒト胃癌の強力な誘発因子である *H. pylori* 感染者の胃粘膜には、複数の遺伝子の DNA メチル化異常が蓄積していることを明らかにしてきた。しかし、*H. pylori* 感染がどのような遺伝子に DNA メチル化異常を誘発するのかについては、明らかになっていなかった。そこで、ヒト胃癌細胞株でメチル化される遺伝子 48 個について、*H. pylori* 感染者及び非感染者の胃粘膜でのメチル化の有無を MSP 法により解析した。その結果、*H. pylori* 感染により容易にメチル化される遺伝子と、ほとんどメチル化されない遺伝子とが存在した。従って、*H. pylori* 感染による DNA メチル化異常誘発には、遺伝子特異性が存在することが明らかになった。

遺伝子特異性を決定している因子として遺伝子転写量を考え、感受性及び抵抗性遺伝子の発現レベルを定量的 RT-PCR 法により測定した。その結果、抵抗性遺伝子の方が有意に高い転写レベルを示すことを見出した。さらに、*H. pylori* 感染により DNA メチル基転移酵素の発現上昇が誘導されるか否かを、定量的 RT-PCR 法と Western blot 法により解析したが、発現上昇は認められなかった。DNA メチル化異常誘発要因により誘発されるメチル化異常には遺伝子特異性があり、その特異性を決定している因子として遺伝子転写量が深く関与することが明らかになった。

## (3) 各種の炎症のメチル化誘発能

スナネズミを用いた研究により、*H. pylori* 感染が原因となって DNA メチル化異常が誘発されること、その誘発には、炎症が重要な役割を果たしていることを示してきた。そこで、炎症の種類により DNA メチル化異常誘発能が異なるか否かを明らかにする目的で、*H.*

*pylori* (CagA 陽性) 感染、*H. pylori* (CagA 陰性) 感染、*H. felis* 感染、食塩、エタノールにより胃粘膜に長期間炎症を誘発した。DNA メチル化レベルは、解析した 8 個の CGI で同様の傾向を示し、*Helicobacter* を感染させた 3 群でのみ DNA メチル化が誘発された。細胞増殖は全ての群で誘発され、食塩投与群で最も強かった。従来、細胞増殖の誘発が炎症による DNA メチル化異常誘発の主要な機構とされてきたが、細胞増殖の誘発のみでは、DNA メチル化異常は誘発されないことが示された。

更に、DNA メチル化異常の誘発能と関連する遺伝子を探索したところ、DNA メチル化異常が誘発された 3 群では、*Il1b*, *Nos2* そして *Tnf* の発現が上昇していた。CagA の有無は、DNA メチル化異常の誘発には大きく関係しなかった。

## 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 14 件)

- ① Ushijima T, Watanabe N, Shimizu K, Miyamoto K, Sugimura T and Kaneda A. Decreased fidelity in replicating CpG methylation patterns in cancer cells. *Cancer Res*, 65: 11-17, 2005. 査読有
- ② Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M and Ushijima T. Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci*, 97: 64-71, 2006. 査読有
- ③ Murayama A, Sakura K, Nakama M, Yasuzawa-Tanaka K, Fujita E, Tateishi Y, Wang Y, Ushijima T, Baba T, Shibuya K, Shibuya A, Kawabe Y and Yanagisawa J. A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. *EMBO J*, 25: 1081-1092, 2006. 査読有
- ④ Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Horii A, Ushijima T and Sasaki H. Genome-wide profiling of promoter methylation in human. *Oncogene*, 25: 3059-3064, 2006. 査読有
- ⑤ Moriguchi K, Yamashita S, Tsujino Y, Tatematsu M and Ushijima T. Larger numbers of silenced genes in cancer cell lines with increased de novo methylation of scattered CpG sites. *Cancer Lett*, 249: 178-187, 2007. 査読有
- ⑥ Ushijima T. Epigenetic field for

- cancerization. *J Biochem Mol Biol*, 40: 142-150, 2007. 査読有
- ⑦ Enomoto S, Maekita T, Tsukamoto T, Nakajima T, Nakazawa K, Tatematsu M, Ichinose M and Ushijima T. Lack of association between CpG island methylator phenotype in human gastric cancers and methylation in their background non-cancerous gastric mucosae. *Cancer Sci*, 98: 1853-1861, 2007. 査読有
- ⑧ Takasu S, Tsukamoto T, Ushijima T, Yamashita S, Ogasawara N, Ban H, Yanai T, Masegi T and Tatematsu M. Cyclin D1 overexpression in *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced rat gastric adenocarcinomas. *Exp Toxicol Pathol*, 59: 171-175, 2007. 査読有
- ⑨ Nakajima T, Yamashita S, Maekita T, Niwa T, Nakazawa K and Ushijima T. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae. *Int J Cancer*, 124: 905-910, 2009. 査読有
- ⑩ Nakajima T, Enomoto S, Yamashita S, Ando T, Nakanishi Y, Nakazawa K, Oda I, Gotoda T and Ushijima T. Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. *J Gastroenterol*, 45: 37-44, 2009. 査読有
- ⑪ Ando T, Yoshida T, Enomoto S, Asada K, Tatematsu M, Ichinose M, Sugiyama T and Ushijima T. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer*, 124: 2367-2374, 2009. 査読有
- ⑫ Ogasawara N, Tsukamoto T, Mizoshita T, Inada KI, Ban H, Kondo S, Takasu S, Ushijima T, Ito K, Ito Y, Ichinose M, Ogawa T, Joh T and Tatematsu M. RUNX3 expression correlates with chief cell differentiation in human gastric cancers. *Histol Histopathol*, 24: 31-40, 2009. 査読有
- ⑬ Ushijima T and Yamashita S. Methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA). *Methods Mol Biol*, 507: 117-130, 2009. 査読有
- ⑭ Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M and Ushijima T. Inflammatory processes triggered by *H. pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res*, 70: 1430-1440, 2010. 査読有
- [学会発表] (計 15 件)
- ① 前北隆雄、中沢和之、中島 健、三原真美、清水靖仁、杉村隆、斎藤大三、一瀬雅夫、牛島俊和 ヘリコバクター・ピロリ感染による異常DNAメチル化の高度の蓄積 第64回日本癌学会学術総会 2005年9月
- ② Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M and Ushijima T. A chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. Annual Meeting of American Association for Cancer Research. Washington DC, April, 2006
- ③ 牛島俊和 エピジェネティックな異常の起源と加速 *Helicobacter pylori* によるDNAメチル化異常誘発とCpGアイランド特異性 日本癌学会 65回総会シンポジウム 2006年9月
- ④ 牛島俊和 *Helicobacter pylori* による胃粘膜でのDNAメチル化異常誘発 日本分子生物学会 2006 フォーラム 2006年12月
- ⑤ Ushijima T, Nakajima T and Enomoto S. Epigenetic field defect for gastric cancers. Gordon Research Conference. Il Ciocco, May, 2007
- ⑥ Ushijima T and Nakajima T. Epigenetic field defect for gastric cancers, and its use as a cancer risk marker. The 11th Annual Meeting of Taiwan Cooperative Oncology Group. Taipei, December, 2007
- ⑦ Hosoya K, Yamashita S, Ando T, Nakajima T, Nakanishi Y, Itoh F and Ushijima T. Expression and methylation changes of APC 1A and 1B in gastric carcinogenesis. 67<sup>th</sup> JCA meeting. Nagoya, October 28, 2008
- ⑧ Nakajima T, Yamashita S, Maekita T, Niwa T, Nakazawa K and Ushijima T. DNA methylation induction by *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae and target gene specificity. 67<sup>th</sup> JCA meeting. Nagoya, October 28, 2008
- ⑨ Ushijima T. The presence of strong target gene specificity in induction of DNA methylation, and its mechanisms. 18th Cancer Research Institute cancer symposium on "DNA and Histone Methylation in Cancer". Seoul, June 5, 2009
- ⑩ Ushijima T. The presence of strong target gene specificity in induction of DNA methylation, and its mechanisms. Epigenetics in Development and Diseases Conference: 4th Asian Epigenomics Meeting. Singapore, August 25, 2009
- ⑪ Ushijima T. Instructive induction of aberrant DNA methylation, and epigenomic analysis

of its underlying mechanisms. Epigenetics  
2009 Australian Scientific Meeting.  
Melbourne, December 2, 2009

- ⑫ Ushijima T. The presence of strong target gene specificity in induction of DNA methylation, and its mechanisms. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月 3 日
- ⑬ Ushijima T. Instructive induction of aberrant DNA methylation, and epigenomic analysis of its underlying mechanisms. 第 32 回日本分子生物学会年会シンポジウム, 横浜, 2009 年 12 月 10 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牛島 俊和 (USHIJIMA TOSHIKAZU)  
国立がんセンター (研究所及び東病院臨床  
開発センター)・発がん研究部・部長  
研究者番号: 90232818

### (2) 研究分担者

守口 和基 (MORIGUCHI KAZUKI)  
国立がんセンター (研究所及び東病院臨床  
開発センター)・発がん研究部・研究員  
研究者番号: 30294523  
2005 年度のみ

阿部 雅修 (ABE MASANOBU)  
国立がんセンター (研究所及び東病院臨床  
開発センター)・発がん研究部・研究員  
研究者番号: 10392333  
2005 年度から 2006 年度

山下 聡 (YAMASHITA SATOSHI)  
国立がんセンター (研究所及び東病院臨床  
開発センター)・発がん研究部・室長  
研究者番号: 80321876  
2007 年度のみ

渡邊 直子 (WATANABE NAOKO)  
国立がんセンター (研究所及び東病院臨床  
開発センター)・発がん研究部・研究員  
研究者番号: 80255364  
2007 年度から 2009 年度

浅田 潔 (ASADA KIYOSHI)  
国立がんセンター (研究所及び東病院臨床  
開発センター)・発がん研究部・主任研究官  
研究者番号: 50311410  
2008 年度から 2009 年度

### (3) 連携研究者

無し