

平成22年 5月24日現在

研究種目：基盤研究 (S)
研究期間：2005～2009
課題番号：17109008
研究課題名 (和文) エピジェネティックな異常による消化器癌発生の分子機構と診断・治療への応用
研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of epigenetic alterations in gastrointestinal cancer and application to diagnosis and therapy
研究代表者
今井 浩三 (IMAI KOHZOH)
札幌医科大学学長
研究者番号：60117603

研究成果の概要 (和文)：

発癌におけるエピジェネティックな異常の分子機構に関して未知の点が多い。DNA メチル化は、RAS や WNT、p53、microRNA など細胞内シグナルに重要な遺伝子の不活化に関与する。また、細胞老化に関連する IGFBP7 の不活化が、CIMP 陽性腫瘍が細胞老化を回避する機構として重要であることを明らかにした。DNA メチル化は大腸粘膜剥離液などの検体から検出可能で、癌の診断に有用であると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Molecular mechanisms how this epigenetic alterations contribute to development of tumors remains to be determined. DNA methylation also leads to silencing of genes involved in cell signaling, which in turn leads to dysregulation of the oncogenic signaling such as Ras, WNT, and microRNA. We found that epigenetic inactivation of IGFBP7 plays a critical role in escaping senescence in CIMP positive colorectal cancers. We also found that epigenetic information can be used to detect cancer cells from colorectal mucosal solution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	17,900,000	5,370,000	23,270,000
2006年度	16,900,000	5,070,000	21,970,000
2007年度	16,800,000	5,040,000	21,840,000
2008年度	16,800,000	5,040,000	21,840,000
2009年度	16,800,000	5,040,000	21,840,000
総計	85,200,000	25,560,000	110,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：DNA メチル化、エピジェネティクス、ヒストン修飾、個別化医療

1. 研究開始当初の背景

DNAメチル化やヒストン修飾異常などのエピジェネティックな異常は、がん抑制遺伝子不活化の機構として重要である。しかし、異常メチル化が起こるメカニズムや、メチル化により不活化される遺伝子の癌の発生と進展における役割については未知の点が多い。メチル化により不活化される遺伝子は数百存在すると考えられ、メチル化の標的遺伝子の同定は、発癌の分子機構の解明に重要と考えられる。また、DNAメチル化は癌特異的な変化であり、腫瘍マーカーとしても有用と考えられる。DNAメチル化は遺伝子の一次構造の変化を伴わない、エピジェネティックな異常であるため、メチル化阻害剤により不活化されている遺伝子の発現を誘導することが可能である。申請者らはこれまで、DNAメチル化により不活化されているアポトーシス関連遺伝子を同定し、癌の発生と進展における役割を明らかにしてきた。しかし、癌において異常メチル化されている遺伝子の多くはその役割や異常の頻度、意義が不明であり、癌の診断・治療への応用にはさらなる解析が必要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、独自に開発したゲノムスクリーニング技術を用いて、消化器癌において、異常メチル化される遺伝子を明らかにし、診断および治療法開発へ応用するべく研究を行った。また、便や血清などの検体中のDNAを用いてメチル化を検出することにより、新しい消化器癌診断法の開発を行う。さらに、DNAメチル化をマーカーとして、癌の早期診断や術後再発のモニタリング、高発リスク患者群におけるスクリーニングへの応用を試みる。本研究で得られると予想される遺伝子の脱メチル化の細胞内動態の情報は、新規メチル基酵素阻害剤の開発や、薬剤耐性の分子機構解明に重要な知見となりうる。また、ヒストン脱アセチル化阻害剤による消化器癌治療の可能性についても検討する。

3. 研究の方法

DNAメチル化のスクリーニングには、methylated CpG island amplification microarray (MCAM)法を用いた。個々の遺伝子の定量的メチル化解析は、Bisulfite-pyrosequencing法により行った。定量的かつ網羅的DNAメチル化解析と、癌遺伝子癌抑制遺伝子変異のプロファイルを統合的解析し、大腸癌の発がん経路におけるDNAメチル化の役割を解析した。さらに、DNMT1およびDNMT3Bをノックアウトした大腸癌細胞やDicer機能を消失した大腸癌細胞を用いて、DNAメチル化や遺伝子発現の網羅的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 消化器癌におけるエピジェネティックな異常の役割

大腸癌および胃癌におけるDNAメチル化を網羅的に解析し、WNTの負の制御因子である、SFRP、Rasの負の制御因子であるRASSF2が高頻度に異常メチル化により不活化され、消化器癌におけるWNTやRasシグナル活性化に関与することを明らかにした(Nat Genet, 2004; Gastroenterol, 2005; Oncogene 2007)。また、p53の遺伝子変異がない大腸癌および胃癌において、p53の標的遺伝子であるDFNA5、C10orf58、BNIP3の異常メチル化が、p53機能の異常に関与することを明らかにした。さらに、分裂期チェックポイント遺伝子CHFRの機能解析により、CHFRがNF- κ Bの負の制御因子であり、CHFRのエピジェネティックな不活化がNF- κ B依存性のIL-8の発現亢進を介して、癌の浸潤転移・血管新生に関与することを明らかにした(図1)。

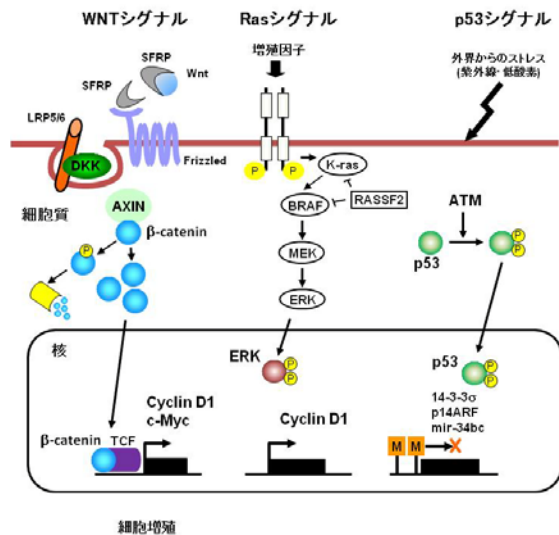


図1. WNTやRas、p53などのシグナル関連遺伝子のDNAメチル化は、大腸癌の発生に重要である。

(2) 大腸癌細胞においてDNAメチル化で不活化されるmicroRNAの網羅的解析

大腸癌細胞においてエピジェネティックに不活化されるmiRNAをスクリーニングし、癌関連miRNAを同定するため、大腸癌細胞株HCT116において、5-aza-dCによるDNAメチル化酵素(DNMT)阻害、あるいはDNMTノックアウトにより発現誘導されるmiRNAをTaqMan RT-PCRにより解析した(Cancer Res, 2008)。HCT116細胞において、157種類中37種類のmiRNAがDNAメチル化阻害により発現上昇した。miR-34b/cの発現低下はメチル化と強く相関し、DNAメチル化阻害によりヒ

ストン H3K4 メチル化が上昇した。miR-34b/c のメチル化は大腸癌細胞株の 100%、大腸癌臨床例の 90%に認められた。マイクロアレイ解析の結果、HCT116 において、miR-34b/c の導入によって発現低下する遺伝子群と、DAC 処理によって発現低下する遺伝子群との間に共通性が認められ、それらの中には miR-34b/c の標的候補である MET、CDK4、CCNE2 が含まれていた。これらの結果から、miR-34b/c は大腸癌において重要な役割をもつ tumor suppressive microRNA であることが示唆された(図 2)。

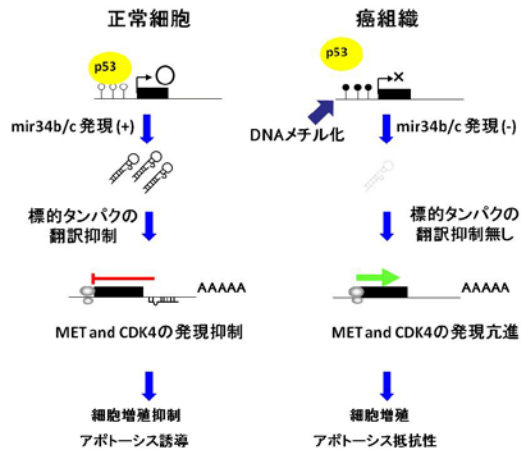


図 2. mir34b/b の異常メチル化により、標的遺伝子である MET や CDK4 の発現が亢進する。

3) CIMP 陽性大腸癌の起源の同定

われわれはこれまで、一部の腸癌においてゲノムワイドなメチル化の異常、CpG island methylator phenotype (CIMP)を認めること、CIMP がミスマッチ修復酵素、hMLH1 の異常メチル化を介して、マイクロサテライト陽性大腸癌の発生に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。本研究では、Methylated CpG island amplification microarray (MCAM) 法を用いて、大腸癌および大腸腺腫におけるメチル化プロファイルを作成した。その結果、BRAF 遺伝子や K-ras 遺伝子の変異を有する腫瘍では、ゲノムワイドなメチル化を認め、特に隆起型の形態を有する腫瘍においてメチル化が亢進していた。これらの腫瘍は、組織学的に過形性ポリープから鋸歯状腺腫を経て癌化するタイプが多く、CpG アイランドメチレーターフェノタイプの原病変と考えられた。また、IGFBP7 の異常メチル化は、BRAF 変異により発生した腫瘍が細胞老化を回避する機構として重要であることを明らかにした(図 3)。

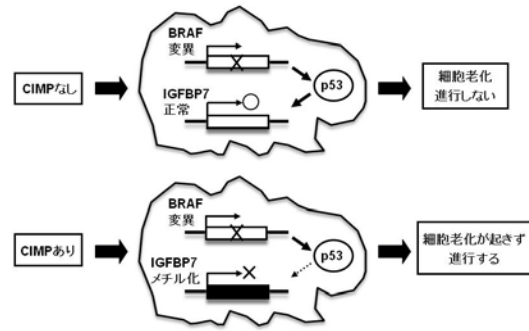


図 3. CIMP 陽性癌では、IGFBP7 の異常メチル化により、BRAF 変異により誘導される細胞老化が起こらず、癌化が進行する。

4) DNA メチル化を指標とした消化器癌診断法の開発

大腸癌の浸潤度予測は内視鏡的切除か外科手術科の治療法選択に重要であるが、現在、行われている内視鏡時の形態観察に加え、より客観的な分子マーカーの開発が急務である。われわれは、大腸癌表面の粘液中から DNA を抽出し、メチル化解析を行うことに成功した。粘液中のメチル化レベルは、浸潤性大腸癌において、非浸潤性大腸癌において高値を示し、癌の進捗診断に有用な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 29 件)

1. Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, Akashi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Sugai T, Shen L, Issa JPP, Shinomura Y, Tokino T, Toyota M. IGFBP7 is p53 responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. *Carcinogenesis*, 31: 342-349, 2010. 査読有り.
2. Yamashita M, Toyota M, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto E, Kamimae S, Watanabe Y, Kai M, Akashi H, Maruyama R, Sasaki Y, Yamano H, Sugai T, Shinomura Y, Imai K, Tokino T, Itoh F. Epigenetic inactivation of interferon regulatory factor genes in gastric cancer. *Cancer Sci*, in press, 査読有り.
3. Taniguchi H, Fernandez AF, Setien F, Ropero S, Ballestar E, Villanueva A, Yamamoto H, Imai K, Shinomura Y, Esteller M. Epigenetic inactivation of the circadian clock gene BMAL1 in hematological malignancies. *Cancer Res*, 69: 8447-8454, 2009. 査読有り.
4. Nojima M, Maruyama R, Yasui H, Suzuki H, Maruyama Y, Tarasawa I, Sasaki Y,

- Asaoku H, Sakai H, Hayashi T, Mori M, Imai K, Tokino T, Ishida T, Toyota M, Shinomura Y. Genomic Screening for Genes Silenced by DNA Methylation Revealed an Association between RASD1 Inactivation and Dexamethasone Resistance in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*, 15 : 4356-4364, 2009. 査読有り.
5. Sasaki Y, Negishi H, Koyama R, Anbo N, Ohori K, Idogawa M, Mita H, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. p53 family members regulate the expression of the apolipoprotein D gene. *J Biol Chem*, 284: 872-883, 2009. 査読有り.
 6. Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Shinomura Y, Tokino T, Imai K. Cancer Epigenomics : Implications of DNA methylation in personalized therapy. *Cancer Sci*, 100 : 787-791, 2009. 査読有り.
 7. Toyota M, Suzuki H, Yamamoto E, Yamano H, Imai K, Shinomura Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations in cancer. *Epigenomics*, 1: 291-299, 2009. 査読有り.
 8. Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and BTG4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res*, 68: 4123-4132, 2008. 査読有り.
 9. Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, Dohi T. DNA hypermethylation contributes incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer. *Gastroenterol*, 135: 142-151, 2008. 査読有り.
 10. Ting A, Suzuki H, Cope L, Schuebel K, Lee B, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Baylin SB. A requirement for DICER to maintain full promoter CpG Island hypermethylation in human cancer cells. *Cancer Res*, 68: 2570-2575, 2008. 査読有り.
 11. Sasaki Y, Ohshima Y, Koyama R, Maruyama R, Akashi H, Mita H, Toyota M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Identification of flotillin-2, a major protein on lipid rafts, as a novel target of the p53 family members. *Mol Cancer Res*, 6: 395-406, 2008. 査読有り.
 12. Imai T, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Ogi K, Sogabe Y, Kashima L, Maruyama R, Nojima M, Mita H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Shinomura Y, Hiratsuka H, Tokino T. Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 99, 958-966, 2008. 査読有り.
 13. Maruyama R, Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Yamamoto E, Nojima M, Fujikane T, Sasaki Y, Yamashita T, Watanabe Y, Hiratsuka Y, Hirata K, Itoh F, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Cytoplasmic RASSF2A is a proapoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 29: 1312-1318, 2008. 査読有り.
 14. Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Suzuki H, Mita H, Toyota M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. The histone deacetylase inhibitor FK288 enhances adenovirus-mediated p53 family gene therapy in cancer models. *Mol Cancer Ther*, 7: 779-787, 2008. 査読有り.
 15. Takagi H, Sasaki S, Suzuki H, Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Yamamoto H, Omata M, Tokino T, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol*, 43: 378-389, 2008. 査読有り.
 16. Yamamoto E, Toyota M, Suzuki H, Kondo Y, Imai K, Sanomura T, Murayama Y, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Ashida M, Fujii K, Sasaki Y, Hayashi N, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in helicobacter pylori-related enlarged fold gastritis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17: 2555-2564, 2008. 査読有り.
 17. Suzuki H, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M, DNA methylation and cancer pathways in gastrointestinal tumors. *Pharmacogenomics*, 9 : 1917-1928, 2008. 査読有り.
 18. Suzuki H, Toyota M, Caraway H, Gabrielson E, Ohmura T, Fujikane T, Nishikawa N, Sogabe Y, Nojima M, Sonoda T, Mori M, Hirata K, Imai K, Shinomura Y, Baylin SB, Tokino T. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *British J Cancer*, 98: 1147-1156, 2008. 査読有り.
 19. Nishikawa N, Toyota M, Suzuki H, Homma T, Fujikane T, Ohmura T, Nishidate T,

- Ohe-Toyota M, Maruyama R, Sonoda T, Sasaki Y, Urano T, Imai K, Hirata K, Tokino T. Gene amplification and overexpression of PRDM14 in breast cancer, *Cancer Res*, 67: 9649-9657, 2007. 査読有り.
20. Schuebel KE, Chen E, Cope Lm Glockner SC, Suzuki H, Yi JM, Chan TA, Van Neste L, Van Criekinge W, van den Bosch S, van Engeland M, Ting AH, Jair K, Yu W, Toyota M, Imai K, Ahuja N, Herman JG, Baylin SB. Comparing the DNA hypermethylation with gene mutations in human colorectal cancer. *Plos Genet*. 3: 1709-1723, 2007. 査読有り.
21. Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Maruyama R, Kusano M, Nishikawa N, Watanabe Y, Sasaki Y, Abe T, Yamamoto E, Tarasawa I, Sonoda T, Mori M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Identification of DFNA5 as a target of epigenetic inactivation in gastric cancer. *Cancer Sci*, 98: 88-95, 2007. 査読有り.
22. Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, Tokino T, Mori M, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene*, 26: 4699-4713, 2007. 査読有り.
23. Watanabe Y, Toyota M, Kondo Y, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Sasaki Y, Sekido Y, Hiratsuka H, Shinomura Y, Imai K, Itoh F, Tokino T. Expression profiling of PRDM family genes identified PRDM5 as a target of epigenetic silencing in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 13: 4786-4794, 2007. 査読有り.
24. Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, Takagi H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M, Sonoda T, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors., *Carcinogenesis*, 28: 2459-2466, 2007. 査読有り.
25. Kusano M, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Aoki F, Fujita M, Hosokawa M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Genetic, epigenetic and clinicopathological features of gastric cancers with CpG island methylator phenotype and an association with Epstein-Barr virus. *Cancer*, 106, 1467-1479, 2006. 査読有り.
26. Maruyama R, Aoki F, Toyota M, Sasaki Y, Akashi H, Mita H, Suzuki H, Akino K, Ohe-Toyota M, Maruyama Y, Tatsumi H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Comparative genome analysis identified the vitamin D receptor gene as a direct target of p53-mediated transcriptional activation. *Cancer Res*, 66: 4574-4583. 2006. 査読有り.
27. Murai M, Toyota M, Suzuki H, Satoh A, Akino K, Mita H, Tokino T, Imai K. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 11: 1021-1027, 2005. 査読有り.
28. Murai M, Toyota M, Satoh A, Suzuki H, Akino K, Mita H, Ishida T, Tokino T, Imai K. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in hematopoietic tumors. *British J Cancer*. 92: 1165-1172, 2005. 査読有り.
29. Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M, Issa JP, Hinoda Y, Imai K, Tokino T. The RAS effector RASSF2 is a novel tumor suppressor in colorectal cancer. *Gastroenterol*, 129: 156-169, 2005. 査読有り.
- [学会発表] (計 9 件)
1. Toyota M, Imai K. The role of epigenetic changes in cancer immunotherapy. US-Japan Workshop on Immunological Molecular Markers in Oncology, March 23-24, 2009, Hawaii, USA.
2. Toyota M, Imai K. Epigenetic gene silencing and microRNA in human colon cancer. Symposium, 36th Congress of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Oct 5-9, 2008, Tokyo.
3. Toyota M, Imai K. The role of DNA methylation changes in signaling pathway. AACR Special Conference on Cancer Research: Cancer Epigenetics, May 28-31, 2008, Boston, USA.
4. Toyota M, Imai K. Epigenetic silencing of genes involved in signaling pathways in gastric cancer. Symposium, 35th Congress of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Sept 15-19, 2007, Plaque, Czech Republic.
5. Suzuki H, Toyota M, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes

- in gastrointestinal tumors. 35th Congress of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Sept 15-19, 2007, Plaque, Czech Republic.
6. Toyota M, Suzuki H, Maruyama R, Akino K, Watanabe Y, Sasaki Y, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. Identification of DFNA5 as a target of epigenetic inactivation in gastric cancer. 98th Annual Meeting of American Association for Cancer Research. Los Angeles, April 14-18, 2007.
 7. Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Tokino T, Imai K. Epigenetic silencing of genes involved in signaling pathway. Symposium, The 7th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Jan 21-25 2007, Hawaii, USA.
 8. Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Imai K. DNA methylation changes in cancer: application to diagnosis and therapy. Symposium, 34th Congress of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Sept 16-20, 2006, Pasadena, USA.
 9. Toyota M, Terasawa K, Sagae S, Ogi K, Suzuki H, Maruyama R, Shinomura Y, Saito T, Imai K, Tokino T. Epigenetic inactivation of TCF2 in human tumors, 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research. Apr 1-5 2006, Washington DC, USA.

[図書] (計3件)

1. Toyota M, Suzuki H, Maruyama R, Tarasawa I, Yamamoto E, Tokino T, Imai K, Shinomura Y. The role and clinical implication of DNA methylation in gastrointestinal cancer. Recent Advances in Gastrointestinal Carcinogenesis. pp115-123, Edited by Bamba H and Ota S, Transworld Research Network, Kerala, India, 2006. 査読無し.
2. 今井浩三、豊田 実. エピジェネティクス-メチル化とヒストン修飾. がんの分子標的治療. 鶴尾隆. 編集. 南山堂. pp145-pp149. 2008. 査読無し.
3. 豊田 実、今井浩三、篠村恭久. 消化管と遺伝子異常. 消化管病理標本の読み方改訂2版. 中村真一. 編集. 日本メディカルセンター. pp213-222, 2008. 査読無し.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 癌の検出方法および検出用キット、ならびに癌治療剤.

発明者: 今井浩三

権利者: 札幌医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-121671

出願年月日: 2008年5月7日出願

国内外の別: 国内

名称: 胃粘膜洗浄液を利用した疾患関連マーカー検出法.

発明者: 今井浩三

権利者: 札幌医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2006-134878

取得年月日: 2006年5月12日出願

国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

名称: 新規遺伝子 ACMG1 のメチル化を指標とする胃癌の診断方法.

発明者: 豊田 実、今井 浩三、株式会社ジェネティックラボ

権利者: 豊田 実、株式会社ジェネティックラボ

種類: 特許

番号: 特許第 4426549 号

取得年月日: 2009年12月18日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 浩三 (IMAI KOHZOH)

札幌医科大学・学長

研究者番号: 60117603

(2) 研究分担者

篠村 恭久 (SHINOMURA YASUHISA)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90162619

豊田 実 (TOYOTA MINORU)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70270676

山本博幸 (YAMAMOTO HIROYUKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40332910

有村 佳昭 (ARIMURA YOSHIKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80305218

鈴木 拓 (SUZUKI HIROMU)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20381254

(3) 連携研究者

無し