

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05964

研究課題名(和文) イヌの新規ゲノムワイドDNAメチル化解析：腫瘍性疾患特異的DNAメチル化の同定

研究課題名(英文) Genome-wide DNA methylation analysis in dogs: Identification of tumor-specific DNA methylation

研究代表者

山崎 淳平 (Yamazaki, Jumpei)

北海道大学・獣医学研究院・特任准教授

研究者番号：20732902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：正常イヌ2頭由来の16種類の正常組織、イヌの悪性黒色腫28症例と正常犬の口腔内粘膜組織、イヌの肝細胞癌12症例と正常犬の肝細胞ならびにステロイド投与群由来サンプルについて次世代シーケンサーによる解析を行ったところ、約100,000-150,000箇所のCpGサイトのDNAメチル化の定量的な解析が可能であった。

これにより、各正常組織特有のDNAメチル化パターンの存在、悪性黒色腫症例や肝細胞癌症例における正常組織と比較したDNAメチル化状態の明らかな違いが認められた。臨床的には違いが明確でない悪性黒色腫や肝細胞癌症例がDNAメチル化パターンによって複数群に分類されることが初めて明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで研究されてきたイヌの腫瘍疾患におけるDNAメチル化の異常は、かなり局所的な解析によるものにとどまっていたが、本研究によってその解析範囲が大幅に改善されたことで広範な異常が存在することが明らかとなり、イヌの腫瘍疾患における分子生物学的なメカニズムの理解が刷新されたことは学術的意義が深い。また本研究の成果による、獣医診療におけるバイオマーカー樹立や新規治療法の策定などの臨床応用への可能性が示唆された点においては、コンパニオンアニマルとしてのイヌ、およびともに暮らす人間のより良い暮らしといった社会的意義につながる。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide analysis of DNA methylation by next-generation sequencing for 16 canine somatic tissues, 28 malignant melanomas with normal mucosae, and 12 hepatocellular carcinomas with normal liver cells with or without steroid treatment were performed to obtain quantitative DNA methylation levels of 100,000-150,000 CpG sites in the dog genome. We found that the normal tissue types were clearly defined by principal component analysis and hierarchical clustering analysis with DNA methylome. DNA methylation patterns were clearly different between malignant melanoma and normal mucosae. Same is true between HCC and normal liver cells. These findings suggest molecular subtypes defined by aberrant DNA methylation occurred in these tumor patients, which have never been elucidated in the clinical settings.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

遺伝子配列の変化を伴わずに表現型の変化をもたらす現象であるエピジェネティックなメカニズムは、幹細胞や組織の分化など様々な点で重要な因子である。特にDNAにおけるCpG配列のシトシンへのメチル基転移の修飾であるDNAメチル化は、プロモーター領域のクロマチン構造の変化をもたらすことにより、遺伝子発現の低下と相関するなど生物学的に重要な機構である。さらに近年急激に発展を遂げた次世代シーケンサーによりプロモーター領域以外のDNAメチル化もゲノムワイドに検討することが可能になり、これにより様々な部位におけるDNAメチル化の重要性も次第に明らかになってきている。

しかしながら、獣医領域における知見は非常に乏しい。特にヒトにおける先行研究にて報告されている遺伝子に関して単にイヌの疾患に外挿し、さらには局所的に個々の遺伝子座のDNAメチル化の検討をしているに過ぎず、当然のことながらこの手法ではイヌにおいて真に重要なDNAメチル化部位を特定する検出力に乏しい。よって、未だ明らかでない「イヌの腫瘍疾患における異常なDNAメチル化」が重要な問いである以前にそもそも、「イヌの、どの細胞の、ゲノム上のどの部位が、どのようなメチル化状態であるか」といった、参照可能な基本的情報の多くを欠いているため、これらを用いた臨床的に有用なマーカーの確立やメカニズムの解明の一助とするには程遠いのが現状であった。

2. 研究の目的

そこで、各正常細胞固有のゲノムワイドなDNAメチル化情報基盤を構築することが、イヌにおけるDNAメチル化研究においてまず不可欠である。またさらに様々な疾患へ応用するためには、対応する各疾患由来の細胞と比較することが重要である。本研究はこれらをカバーし、ゲノムワイドなDNAメチル化情報の基盤構築とそれを元にした疾患メカニズムの解明や包括的な臨床応用を目的とし、イヌの疾患研究におけるブレークスルーを達成する。

3. 研究の方法

本研究では、イヌにおけるDNAメチル化のゲノムワイド解析を、臨床的に多く遭遇し、その診断、治療、予後に関するさらなる発展が期待されている重要かつ代表的な3つの腫瘍性疾患（肝臓癌、移行上皮癌、悪性黒色腫）を対象に行った。DNAメチル化レベルの比較対象として、対応する正常組織（正常肝臓、膀胱移行上皮、口腔粘膜）を用いて、イヌにおける各腫瘍特異的DNAメチル化の同定を行った。また同時に、イヌの各種正常組織細胞におけるゲノムワイドDNAメチル化情報基盤の整備について、共同研究者より譲渡を受けた正常イヌ2頭由来の16種類の正常組織（肺、心臓、胃、十二指腸、回腸、大腸、肝臓、膵臓、副腎、腎臓、脾臓、筋肉、皮膚、口腔粘膜（色素有と無）、骨髄）を入手した。

各種腫瘍症例から得られる腫瘍サンプルにおける腫瘍細胞の占有比率や構成を確認後、各疾患20症例（並行して対応する正常組織を5検体）の対象細胞由来のゲノムDNAを採取した。このゲノムDNAをDNAメチル化に対する感受性の違いを持つ2種の制限酵素（SmaI, XmaI）によって処理し、次世代シーケンスを用いて定量的にかつゲノムワイドにDNAメチル化を解析可能である、申請者自身がすでにイヌにおいて樹立したCanine DREAM (Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation)法を用いて、それぞれ100,000 CpG配列を目標としたDNAメチル化解析を行った。このうちDNAメチル化の程度が、「疾患症例サンプルと対応する正常犬由来細胞との比較において差が認められる」CpG配列に注目した。特に、プロモーター領域だけでなくDREAM法の利点を生かした遺伝子内のエクソンやイントロン、または遺伝子外領域についても網羅的に検討を行った。

4. 研究成果

まず正常イヌ2頭由来の16種類の正常組織を対象としてCanine DREAM解析を行うために、上記DNA処理の後、次世代シーケンスを行ったところ、全32サンプルで約150,000箇所以上のCpGサイトのDNAメチル化レベルデータを取得することが可能であった。またこのうち、全サンプルに共通する約130,000箇所のCpGサイトにおけるDNAメチル化レベルが比較解析可能であった。これら約130,000箇所のうち、約6400箇所が遺伝子プロモーター、約9000箇所がエクソン、約55,000箇所がイントロンに存在しており、それ以外の約60,000箇所が遺伝子外における局在を示していた。全体的なDNAメチル化パターンとして、52%-65%のCpGサイトが高メチル化し、23%-28%のCpGサイトが低メチル化しているなど、16組織に相似する所見が得られた。これは他の動物種とも共通するDNAメチル化パターンである。しかしながら、Principal Component Analysis および Hierarchical Clustering Analysis によって各正常組織特有のDNAメチル化パターンの存在を見出すことが可能であった（図1）。詳細な解析の結果、解析部位の約17%におけるメチル化パターンによって各組織の違いが規定されていることが判明した。また、遺伝子プロモーター領域におけるDNAメチル化は遺伝子発現との相関が得られた。本成果は今後の獣医領域におけるエピジェネティクス研究における礎となることが期待される。

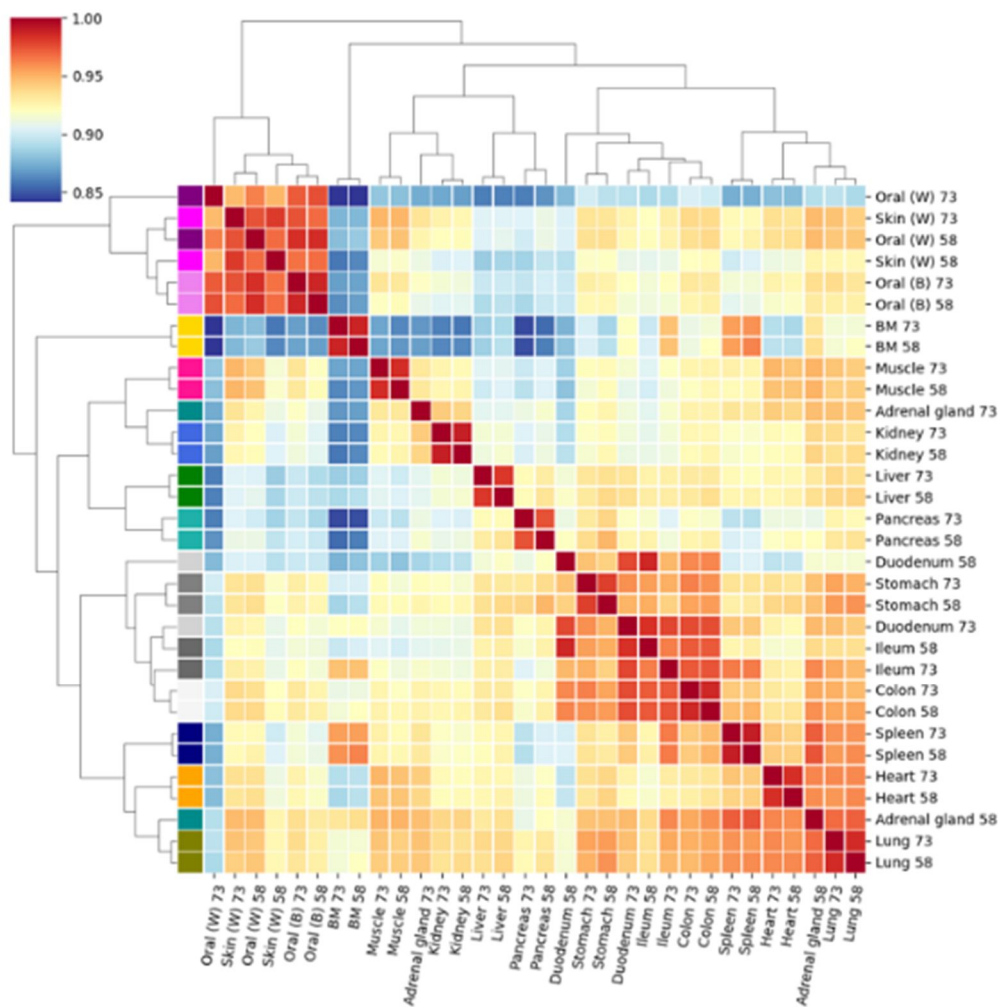


図 1 各正常組織の DNA メチル化パターン

次に、イヌの口腔粘膜型悪性黒色腫 28 症例と正常犬の口腔内粘膜組織 4 種類をサンプルとして同じく Canine DREAM 法により解析した。これにより各サンプルによって約 130,000 ~ 180,000 箇所の CpG サイトにおける DNA メチル化レベルが解析可能であった。これらサンプルの相関解析およびクラスタリング解析によって、悪性黒色腫症例と正常粘膜組織群の間に DNA メチル化状態の明らかな違いが認められた (Ishizaki et al. Res Vet Sci. 2020)。また、臨床的には違いが確立されていない悪性黒色腫症例が DNA メチル化パターンによって 2 群に分類されること、若干ながらも予後との相関が認められた (図 2)。

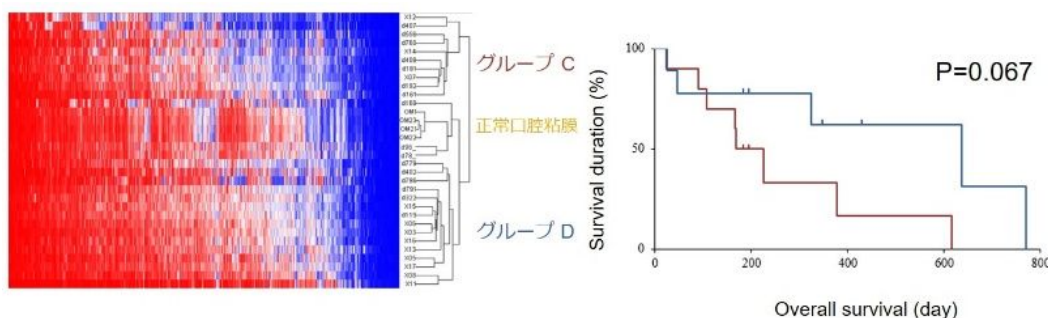


図 2 悪性黒色腫の DNA メチル化パターンによる予後の違い

また、さらなる詳細な解析によって、リンパ腫など他の腫瘍に比べて悪性黒色腫では脱メチル化の程度が圧倒的に高いことが示された。現在、この脱メチル化が関連すると思われる EMT やインターフェロン経路、レトロトランスポゾン再活性化などに焦点をあて (Ishizaki et al. Vet Comp Oncol. 2020) これらメカニズムによるイヌ悪性黒色腫の分子生物学的な細分類の可能性について評価中である。

続いて、イヌの肝細胞癌 12 症例と健常犬由来正常肝細胞ならびにクッシング症候群を模したステロイド投与群由来サンプル 10 サンプルについても Canine DREAM 法による検討を行った。その結果、臨床的には画一的な肝細胞癌 12 症例がゲノムワイド DNA メチル化パターンの観点

からすると複数群に分かれることが示唆された。現在、悪性黒色腫と同じくそのメカニズムの詳細な解析を行っている。また、ステロイド投与群を解析に加えることで、正常群、ステロイド群、肝細胞癌群における連続的な DNA メチル化の変化が AKAP7、ADGRD1、KDR、FGF18 などの

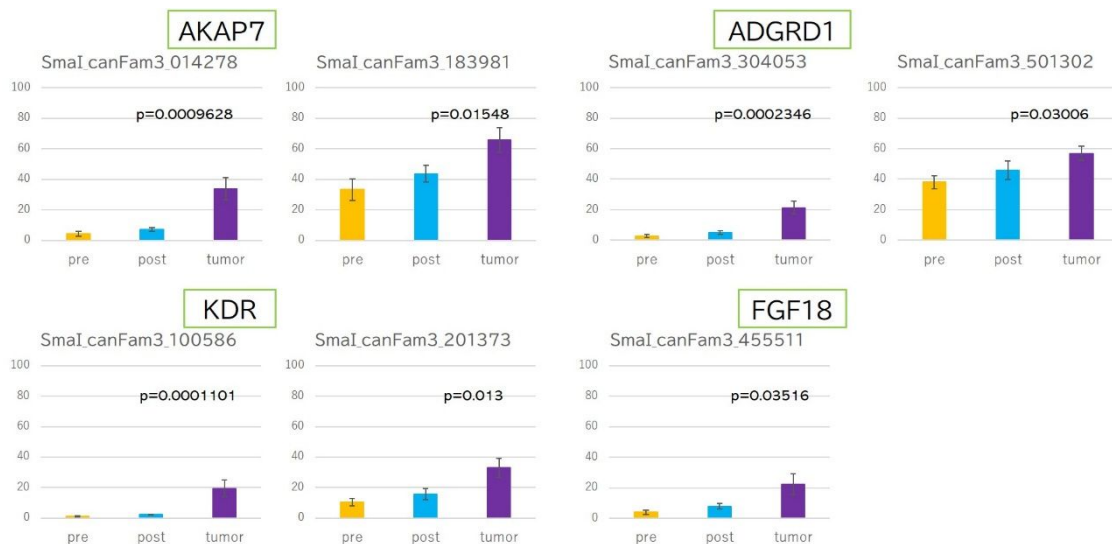


図 3 肝細胞癌における DNA メチル化の連続的变化

遺伝子プロモーター領域において一部捉えられた (図 3)。現在、これら遺伝子における DNA メチル化の変化が臨床的にクッシング症候群から肝細胞癌へと転換する裏付けとして確証を得るために詳細な解析を行っている。

イヌの移行上皮癌に関しては現在、共同研究者へのサンプル収集依頼の段階にあり今後の解析を予定している。

本研究によって、対応する正常細胞に比べて、総じてイヌの腫瘍疾患(悪性黒色腫、肝細胞癌)における異常な DNA メチル化が存在することが事実となっただけでなく、そのパターンによって分子生物学的に細分類が可能であることが示唆された。またこれらパターンが臨床的なパラメータに部分的に関連していることが示されたことは、臨床的には同一疾患と診断されつつも腫瘍発生メカニズム、治療への反応性、予後の差異の解明に有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 OHTA Hiroshi, YAMAZAKI Jumpei, JELINEK Jaroslav, ISHIZAKI Teita, KAGAWA Yumiko, YOKOYAMA Nozomu, NAGATA Noriyuki, SASAKI Noboru, TAKIGUCHI Mitsuyoshi	4. 巻 82
2. 論文標題 Genome-wide DNA methylation analysis in canine gastrointestinal lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 632 ~ 638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0547	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishizaki Teita, Yamazaki Jumpei, Meagawa Shinji, Yokoyama Nozomu, Aoshima Keisuke, Takiguchi Mitsuyoshi, Kimura Takashi	4. 巻 18
2. 論文標題 Long interspersed nucleotide element 1 hypomethylation in canine malignant mucosal melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 854 ~ 860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamazaki Jumpei, Toyomaki Haruya, Nakayama Shouta M.M., Yabe John, Muzandu Kaampwe, Jelinek Jaroslav, Yokoyama Shoko, Ikenaka Yoshinori, Takiguchi Mitsuyoshi, Ishizuka Mayumi	4. 巻 286
2. 論文標題 Genome-wide DNA methylation analysis of dogs with high lead exposure living near a lead mining area in Kabwe, Zambia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 117229 ~ 117229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envpol.2021.117229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamazaki Jumpei, Matsumoto Yuki, Jelinek Jaroslav, Ishizaki Teita, Maeda Shingo, Watanabe Kei, Ishihara Genki, Yamagishi Junya, Takiguchi Mitsuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 DNA methylation landscape of 16 canine somatic tissues by methylation-sensitive restriction enzyme-based next generation sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89279-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishizaki T., Yamazaki J., Jelinek J., Aoshima K., Kimura T.	4. 巻 132
2. 論文標題 Genome-wide DNA methylation analysis identifies promoter hypermethylation in canine malignant melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 521 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rvsc.2020.08.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 山崎淳平	4. 巻 5
2. 論文標題 エピジェネティック治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Oncology	6. 最初と最後の頁 34-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 石崎禎太、山崎淳平、青島圭佑、木村享史
2. 発表標題 イヌの悪性黒色腫自然発症例に認められた広範なDNA 脱メチル化
3. 学会等名 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Teita Ishizaki, Jumpei Yamazaki, Keisuke Aoshima, Takashi Kimura
2. 発表標題 Genome-wide quantitative DNA methylation analysis in canine malignant melanoma
3. 学会等名 VCS Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎淳平
2. 発表標題 イヌ腫瘍の新たなメカニズム～異常DNAメチル化～
3. 学会等名 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石崎禎太、山崎淳平、中川貴之、青島圭佑、木村享史
2. 発表標題 イヌの悪性黒色腫におけるDNAメチル化の網羅的解析
3. 学会等名 第15回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎淳平
2. 発表標題 イヌのがんにおける異常DNAメチル化解析
3. 学会等名 遺伝研研究会「コンパニオンアニマルのゲノム医療」（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	市居 修 (ICHI I OSAMU) (60547769)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Coriell Institute for Medical Research			
米国	MD Anderson Cancer Center	Department of Pediatrics		