

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19390201
 研究課題名 (和文) 新規エピゲノム解析技術の開発と消化器癌の個性診断・個別化治療への応用
 研究課題名 (英文) Development of a novel method for epigenome analysis and application to cancer diagnosis and order made therapy
 研究代表者
 豊田 実 (TOYOTA MINORU)
 札幌医科大学・医学部・教授
 研究者番号：70270676

研究成果の概要：

消化器癌においてジェネティックな異常に加え、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が関与する。ゲノム上の多数の遺伝子がエピジェネティックな異常を有すると考えられ、その全貌を明らかにすることは、消化器癌の診断および治療法開発の上で重要である。本研究では、ゲノム網羅的メチル解析法と多数の検体を定量的に解析する方法の開発を目指す。Methylated CpG island amplification (MCA)法により、メチル化している CpG island を効率よく増幅し、大腸癌細胞株から抽出した DNA から作成した MCA アンプリコンを Cy5 で、正常大腸組織より抽出した DNA から作成した MCA アンプリコンを Cy3 でラベルし、Agilent 社の whole genome promoter array にハイブリダイズすることにより得られたシグナルを解析し、高メチル化している遺伝子を同定した。また、得られた結果を、ゲノムブラウザ BLAT 上に表示し、クロマチン免疫沈降法 (ChIP on ChIP) のデータと比較することにより、DNAメチル化、ヒストン H3 リジン 4、リジン 27 のメチル化との統合解析を可能にした。DNMT あるいは Dicer を遺伝学的にノックアウトした大腸癌細胞を用いて、MCA microarray を行い、DNAメチル化およびヒストン修飾のプロファイルを作成した。本研究により開発された新しいエピゲノム法により消化器癌発生の分子機構の解明や、診断や治療の標的遺伝子の同定に有用と考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：消化器癌、DNA メチル化、エピジェネティクス、遺伝子診断、クロマチン

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の発癌モデルは、Vogelstein 博士が 15 年以上前に提唱した他段階発癌モデルに、マイクロサテライト不安定性と染色体不安定性を加えた経路が主流の考え方であり、大腸癌の発育形態や、臨床病理学的特長を説明するには至っていない。また、腫瘍免疫からの回避や分化の異常、低酸素に対する抵抗性などは遺伝子変異だけでは説明出来ず、エピゲノム異常の関与が示唆される。DNA メチル化により不活化される遺伝子の同定には、メチル化阻害剤により発現誘導される遺伝子を発現アレイを用いて網羅的解析を行う試みがなされてきた。しかし、この方法では、メチル化の候補遺伝子が DNA メチル化で不活化されているか、脱メチル化の結果二次的に発現誘導されるか鑑別出来ず、DNA メチル化を指標とした網羅的解析法の開発が急務である。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム網羅的なエピゲノム解析を可能にするため、マイクロアレイ法を用いたメチル化解析法を開発する。また、大量の検体を高速にかつ定量的に解析するため、Pyrosequencing 技術のメチル化解析への応用を目指す。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する。また、microRNA が DNA メチル化異常により不活化される可能性について DNMT 機能を消失した大腸癌細胞を用いて解析する。

3. 研究の方法

ゲノム DNA をメチル化感受性制限酵素およびメチル化非感受性制限酵素で切断し、アダプターをライゲーションし、PCR 法によりメチル化している CpG アイランドのみを特異的に増幅する。得られたアンプリコンを用いて 7,000 遺伝子のプロモーターをカバーするタイリングアレイを用いてメチル化の検出を行った。Bisulfite 処理した DNA を PCR 法により増幅し、Pyrosequencing 法を用いて定量的なメチル化解析を行った。ChIP on ChIP 法によりヒストン H3 リジン 4、ヒストン H3 リジン 27 のメチル化について、クロマチン免疫沈降法を用いて DNA を回収し、タイリングアレイによる解析を行った。

4. 研究成果

(1) DNA メチル化およびヒストン修飾のゲノム網羅的解析法の開発
研究代表者は、メチル化している CpG island を効率よく増幅する方法、Methylated CpG island amplification (MCA) 法を開発した。従来、MCA 法と representative difference analysis (RDA) 法の組み合わせにより、癌で高メチル化している遺伝子の同定が可能であったが、多数の遺伝子のメチル化の状態を多数の検体で解析することは困難であった。本研究では、大腸癌細胞株から抽出した DNA から作成した MCA アンプリコンを Cy5 で、正常大腸組織より抽出した DNA から作成した MCA アンプリコンを Cy3 でラベルし、Agilent 社の whole genome promoter array にハイブリダイズすることにより得られたシグナルを解析し、高メチル化している遺伝子を同定した(図 1)。また、複数症例で MCA array を同時に行うことにより、癌のメチル化プロファイルの作成が可能であった。

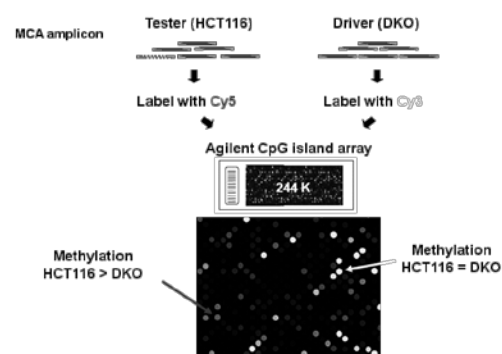


図 1. MCA array 法による DNA メチル化解析
大腸癌細胞株 HCT116 および DNA メチル化酵素 DNMT1、DNMT3B をノックアウトした細胞 DKO から、MCA アンプリコンを調整し、DNA メチル化の差を検出することが可能である。

ヒストン修飾を網羅的に解析する目的で、ChIP on ChIP 法によりヒストン H3 リジン 4、ヒストン H3 リジン 27 のメチル化について、クロマチン免疫沈降法を用いて DNA を回収し、タイリングアレイによる解析を行った。得られた結果を、ゲノムブラウザー BLAT 上に表示し、クロマチン免疫沈降法 (ChIP on ChIP) のデータと比較することにより、DNA メチル化、ヒストン H3 リジン 4、リジン 27 のメチル化との統合解析を可能にした(図 2)。

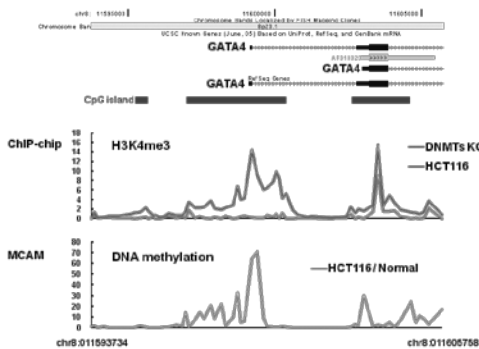


図 2. DNA メチル化とヒストン修飾の統合解析の例

ChIP-on-ChIP と MCA array の組み合わせにより、DNA メチル化とヒストン修飾異常の統合解析が可能となった。

Bisulfite sequencing 法と pyrosequencing 法を組み合わせることにより、定量的かつハイスループットなメチル化解析を試みた。Bisulfite-pyrosequencing 法を用いて、SFRP1、SFRP2、mir-34bc、LINE1 のメチル化解析に成功した(図 3)。

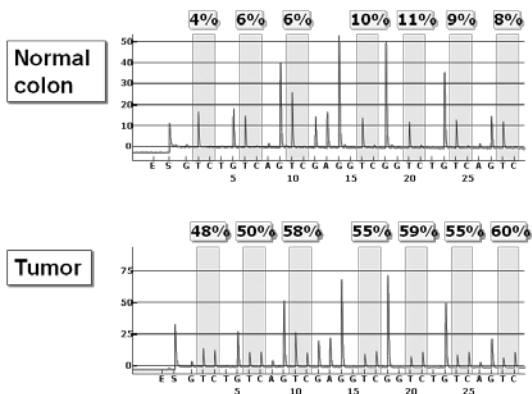


図 3. Bisulfite-pyrosequencing 法による mir-34bc のメチル化解析

正常組織では低レベルのメチル化しか検出出来ないのに対し、大腸癌において高レベルのメチル化を認めた。

Bisulfite-pyrosequencing 法を用いて、未分化型胃癌の発生母地とされる、Enlarged fold gastritis において、LINE1 の低メチル化が起きていることを明らかにした。また、50ng 程度の微量な DNA を用いた DNA メチル化検出が可能であり、血清や便などの微量な検体からの DNA メチル化検出が可能になった。

(2) エピゲノム解析による大腸癌の発がん経路の同定

発癌過程において、特定の遺伝子がメチル化されるのは、その遺伝子が不活化されること

により、細胞増殖に影響を与え、メチル化された細胞が選択的に増殖するためと考えられてきた。われわれは、DNA メチル化は個々の癌で同様に起こるのではなく、一部の癌においてゲノムワイドな CpG アイランドの高メチル化を示すことを報告した。このようながんは CpG island methylator phenotype (CIMP) を有すると考えられる(15)。CIMP は散発性腫瘍におけるマイクロサテライト不安定性の原因として重要であるばかりでなく、家族歴を伴う大腸癌で高率に認められることから、メチル化を制御する遺伝子の異常あるいは、メチル化異常を引き起こす環境要因の関与が示唆された。CIMP 陽性大腸癌の特徴として、K-ras や BRAF などの変異を高率に有し、RAS シグナルの異常を認めること、p53 の変異をほとんど認めないなどの特徴を有する(図 4)。CIMP 陽性かつマイクロサテライト不安定性陰性の大腸癌では、予後が悪い、癌の家族歴を有する割合が高いなどの特徴を有する。

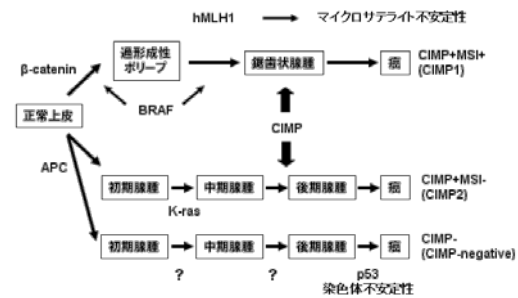


図 4. ジェネティック・エピジェネティックな異常を考慮した大腸癌の発癌経路

(3) 大腸癌における microRNA のエピジェネティックな不活化の網羅的解析

大腸がんにおいて DNA メチル化によりサイレンシングされている microRNA を TaqMan PCR 法で解析した。その結果、解析した 157 の microRNA のうち、37 個がメチル化阻害剤処理および DNMT の機能阻害によって発現が上昇することを明らかにした。メチル化の標的 microRNA のうち、mir-34b/c の不活化は大腸癌細胞株において高率に認められ、遺伝子サイレンシングとよく関連していた。

mir-34bc の DNA メチル化は大腸癌症例の 90%において認められ、診断のマーカーとして有用である可能性が示唆された(癌の検出方法および検出用キット、ならびに癌治療剤、特願 2008-121671、平成 20 年 5 月 7 日出願)。また、細胞増殖に関与する CDK6 や MET が mir-34b/c の標的であり、mir-34bc を大腸癌細胞株に遺伝子導入することにより、CDK6、MET の発現を抑制し、腫瘍細胞の増殖能を低下させることを明らかにした (Toyota et al., Cancer Res, 2008)。

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. Watanabe, Y, Kim, HS, Castoro, RJ, Chyng, W, Estecio, MR, Kondo, K, Guo, Y, Ahmed, SS, Toyota, M, Itoh, F, Suk, KT, Cho, MY, Shen, L, Jelinek, J and Issa, JP. Sensitive and specific detection of early gastric cancer using DNA methylation analysis of gastric washing. *Gastroenterol*, Published on line, Apr 17, 2009. 査読有り.
2. Kashima L, Toyota M, Mita H, Suzuki H, Idogawa M, Ogi K, Sasaki Y, Tokino T. CHFR, a potent tumor suppressor, downregulates interleukin-8 via inhibition of NF- κ B. *Oncogene*, 2009, in press. 査読有り.
3. 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*, 2009, in press. 査読有り.
4. Tomita M, Toyota M, Ishikawa C, Nakazato T, Okudaira T, Matsuda T, Uchihara J, Taira N, Ohshiro K, Senba M, Tanaka Y, Ohshima K, Saya H, Tokino T, Mori N. Overexpression of Aurora a by loss of CHFR gene expression increases the growth of HTLV-1-infected T cells through enhanced NF- κ B activity. *Int J Cancer*, 124 : 2607-2615, 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. Suzuki H, Toyota M, Kondo Y, Shinomura Y. Inflammation-related aberrant patterns of DNA methylation: detection and role in epigenetic deregulation of cancer cell transcriptome. *Methods Mol Biol*. 512: 55-69, 2009. 査読有り.
7. Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y. The Epigenome of colorectal cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*, 5 : 84-89, 2009. 査読有り.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Sogabe Y, Suzuki H, Toyota M, Ogi K, Imai T, Nojima M, Sasaki Y, Hiratsuka H, Tokino T. Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 32: 1253-1261, 2008. 査読有り.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. Jost E, Schmid J, Wilop S, Schubert C, Suzuki H, Herman JG, Osieka R, Galm O. Epigenetic inactivation of secreted Frizzled-related proteins in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol*, 142 : 745-753, 2008. 査読有り.
 22. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez N, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR, Issa JPJ. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies colon cancer corresponding to three different subclasses of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 18654-18659, 2007. 査読有り.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Ohshima Y, Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Toyota M, Yamashita T, Wada T, Nagoya S, Kawaguchi S, Yamashita T, Tokino T. Antitumor effect of adenovirus-mediated p53 family gene transfer on osteosarcoma cell lines. *Cancer Biol Ther*, 6: 1058-1066, 2007. 査読有り.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.

〔学会発表〕(計 11 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. 豊田 実、鈴木 拓、山本英一郎、山野泰徳、篠村恭久. 新規エピゲノム法の開発と消化器癌発生の分子機構. 第 5 回日本消化管学会総会、シンポジウム、2009 年 2 月 12-13 日. 東京
3. 豊田 実、鈴木 拓、篠村恭久、時野隆至. 癌におけるエピジェネティックな異常の網羅的解析. 第 31 回日本分子生物学学会第 81 回日本生化学会合同年会、シンポジウム、2008 年 12 月 9-12 日. 神戸
4. 豊田 実、鈴木 拓、篠村恭久、時野隆至、今井浩三. 大腸癌のシグナル経路異常における DNA メチル化の役割. 第 67 回日本癌学会総会、シンポジウム、2008 年 10 月 28-30 日. 名古屋
5. Toyota M, 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.
6. Toyota M, The role of DNA methylation changes in signaling pathway. AACR Special Conference on Cancer Research: Cancer Epigenetics, May 28-31, 2008, Boston, USA.
7. Toyota M, Epigenetic alterations in gastrointestinal cancer: functional consequences and clinical application. IARC Cancer Epigenetics Meeting, Dec 6-7, 2007, Lyon, France.
8. 豊田 実、消化器癌におけるエピジェネティックな異常の解析と臨床応用、日本消化器病学会東海支部第 107 回例会・第 18 回教育講演会、2007 年 11 月 17 日. 名古屋.
9. 豊田 実、山本英一郎、篠村恭久. 慢性胃炎におけるエピジェネティックな異常-DNA メチル化のおこるプロセス-第 49 回日本消化器病学会大会、2007 年 10 月 18-21 日. 神戸
10. 豊田 実、鈴木 拓、今井浩三、時野隆至、篠村恭久. The role of DNA methylation changes in signal transduction in gastric cancer. 第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 3-5

日. 横浜

11. Toyota M, 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.

〔図書〕(計 3 件)

1. Toyota M, Kashima L, Tokino T. CHFR as a potential anticancer target. Cancer Drug Discovery and Development Checkpoint Response in Cancer Therapy. pp163-176, Edited by Dai W, Humana Press, NJ, USA, 2008. Total pages 314.
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.
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. 中村眞一. 編集. 日本メディカルセンター. pp213-222, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

癌の検出方法および検出用キット、ならびに癌治療剤. 特願 2008-121671、平成 20 年 5 月 7 日出願

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

豊田 実. DNA methylation as a new target for therapy in cancer. 日本癌学会 2007 年度 JCA-Mauverney Award. 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 実 (TOYOTA MINORU)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70270676

(2) 研究分担者

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