

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年 5月19日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390345  
 研究課題名（和文） 消化器癌におけるタイリングアレイを用いた高解像度エピゲノム解析  
 研究課題名（英文） High-resolution epigenome analysis of cancer of the digestive system using tiling array  
 研究代表者  
 金田 篤志（KANEDA ATSUSHI）  
 東京大学先端科学技術研究センター・特任准教授  
 研究者番号：10313024

研究成果の概要（和文）：タイリングアレイを用いた DNA メチル化網羅的解析および質量分析機 MassARRAY を用いたメチル化定量解析により、大腸癌では3つの異なるエピジェノタイプを同定し、肝癌では C 型肝炎ウイルス陽性肝癌に特異的にメチル化される遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：Genome-wide mapping of DNA methylation using tiling array and quantitative analysis using MALDI-TOF mass spectrometry (MassARRAY), revealed three distinct epigenotypes in colorectal cancer and genes methylated preferentially in HCV-related hepatocellular carcinoma.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃十二指腸外科学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) DNA メチル化は最も重要なエピジェネティック変化の一つであり、癌抑制遺伝子不活化の主因となっている。DNA メチル化異常を詳細にゲノム上にマッピングし、癌のエピゲノム異常を解明することは、癌の複雑な遺伝子制御異常を明らかにするために急務となっている。

(2) これまで報告されてきたメチル化異常のゲノム解析法のほとんどはメチル化感受性

制限酵素を用いた手法であるが、解析部位が制限酵素認識部位に限られ、たとえば CCGG 部位を認識する HpaII は CpG 部位の 3.9% を認識するにすぎない。現在の研究室では高密度マイクロアレイを用いた詳細な DNA メチル化マッピング技術、MeDIP-chip 技術をすでに確立している

## 2. 研究の目的

(1) 消化器癌のエピゲノム異常解析と臨床症例層別化を行う。

(2) ゲノム異常、エピゲノム異常を統合したより戦略的な癌抑制遺伝子候補抽出を行う。

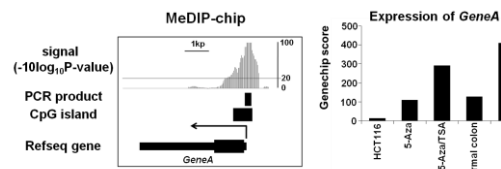
### 3. 研究の方法

(1) 大腸癌、肝癌などの消化器癌において MeDIP-chip 技術を用い、DNA メチル化マッピングを行う。これら癌細胞株に対し、脱メチル化剤 5-aza-2-deoxycytine 処理、ヒストン脱アセチル化阻害剤 Trichostatin A 処理を行う前後で発現アレイ解析し、遺伝子サイレンシングと発現回復を解析する。これらの解析から得られた候補メチル化マーカー遺伝子のメチル化状態を、大腸癌症例・肝癌症例において MassARRAY を用いて定量的に解析し、消化器癌症例層別化を行う。

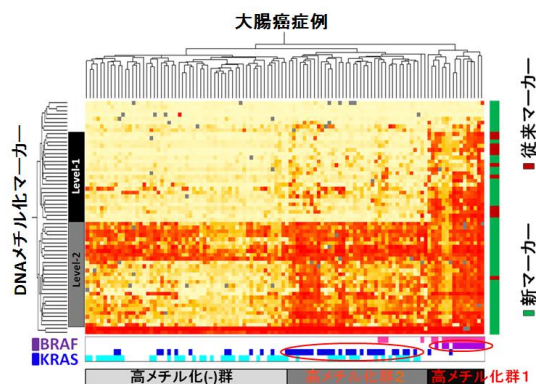
(2) これらの層別化と相関する、予後などの臨床病理学的因子を同定し、例えば予後マーカーを樹立する。また、できるだけ多くの症例においてメチル化しているマーカーを同定し、癌の存在診断マーカーを開発する。また、ゲノム異常との統合解析により、がん抑制遺伝子候補の同定など、新たな癌発生機序の同定を行う。

### 4. 研究成果

(1) 大腸癌細胞株 HCT116 と SW480 のゲノムワイドなメチル化及び発現データより新規サイレンシング候補遺伝子を同定した。



(2) 同定した遺伝子から 44 遺伝子を抽出し、既報のマーカー遺伝子を合わせて合計 60 個のメチル化マーカーを樹立した。149 症例の大腸癌におけるメチル化状態を

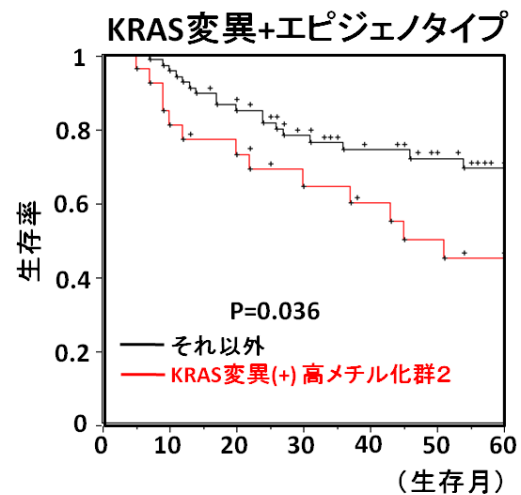


MassARRAY により定量的に解析し、階層的クラスタリングを行った。大腸癌は、BRAF 変異及びマイクロサテライト不安定性と相

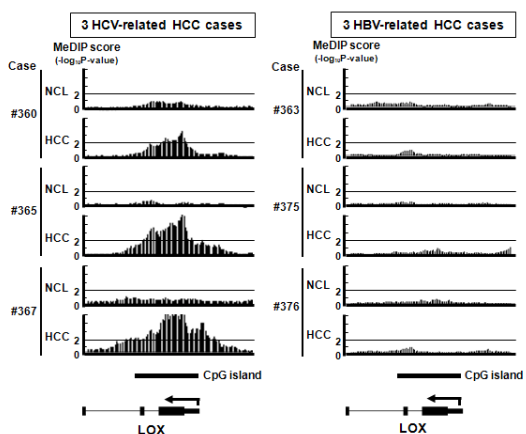
関する高メチル化群 1 (HME)、KRAS 変異と相関する高メチル化群 2 (IME)、及び低メチル化群 (LME) の 3 群のエピジェノタイプに分類された。癌遺伝子変異と特異的な DNA メチル化異常の相関は、発癌機序が全く異なる 3 群の大腸癌が存在することを示唆した。

(3) メチル化マーカーは 2 群に分類され、それらマーカーを用いて新概念のエピジェノタイプ予測モデルを構築した。

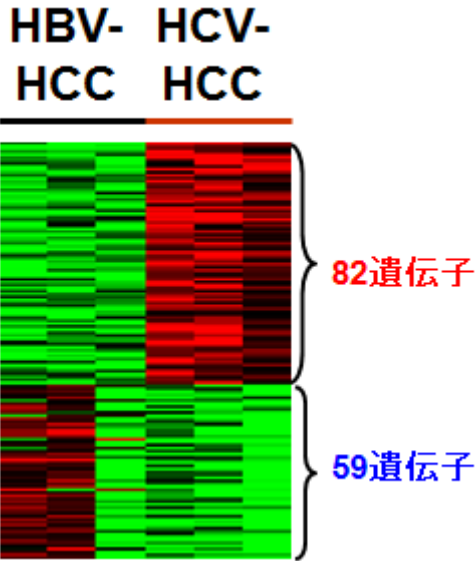
(4) KRAS 変異(+)高メチル化群 2 の大腸癌の予後が有意に不良であることを同定した。



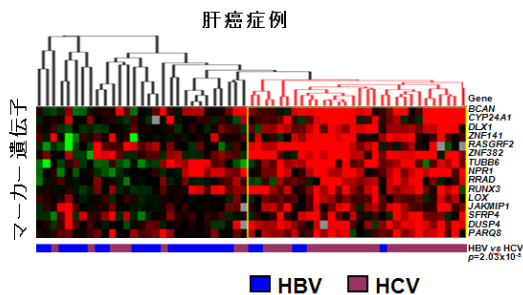
(5) 肝癌症例 6 例、およびそれらの背景非癌部、および正常肝 3 例、合計 15 サンプルについて、MeDIP-chip によりメチル化マッピングした。正常肝および背景肝ではメチル化されず、肝癌特異的にメチル化される遺伝子を抽出した。



(6) C 型肝炎ウイルス (HCV) 陽性肝癌あるいは B 型肝炎ウイルス (HBV) 陽性肝癌特異的にメチル化される候補遺伝子をそれぞれ 82 遺伝子、59 遺伝子抽出した。



(7) HCV 陽性肝癌特異的にメチル化される候補遺伝子のメチル化状態を、HBV 肝癌、HCV 肝癌におけるメチル化状態の解析から検証し、少なくとも 15 遺伝子が、年齢に関係なく HCV 陽性肝癌特異的にメチル化していることを確認した。15 マーカーのメチル化量を用いて肝癌症例を階層的クラスタリングによる層別化すると高メチル化群として HCV 陽性肝癌が抽出された。



## 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 6 件)

- ① Yagi K, Akagi K, Hayashi H, Nagae G, Tsuji S, Isagawa T, Midorikawa Y, Nishimura Y, Sakamoto H, Seto Y, Aburatani H, Kaneda A. Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. Clin Cancer Res, 16:21-33, 2010. Epub 2009 Dec 22
- ② Deng YB, Nagae G, Midorikawa Y, Yagi K, Tsutsumi S, Yamamoto S, Hasegawa

K, Kokudo N, Aburatani H, Kaneda A. Identification of genes preferentially methylated in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Cancer Sci, Epub 2010 Feb 27

- ③ 金田篤志: アレイを必要としないゲノム網羅的 DNA メチル化解析法, バイオテクノロジージャーナル 7: 416-21, 2007
- ④ 金田篤志: 質量分析機 (MassARRAY) による DNA メチル化定量解析, 実験医学, 別冊: 92-103, 2008
- ⑤ 金田篤志: エピゲノミクス——転写レギュローム, 医学の歩み・別冊: 57-64, 2008
- ⑥ 金田篤志: DNA メチローム解析研究の最新動向. 実験医学, in press.

[学会発表] (計 20 件)

- ① Atsushi Kaneda et al. Comprehensive epigenomic analysis of colorectal cancer using immunoprecipitation technique and tiling array. 第 66 回日本癌学会学術総会 2007. 10. 4 横浜
- ② 金田篤志ら. ゲノムタイリングアレイを用いた大腸癌 DNA メチル化解析. 第 1 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2007. 6. 16 大阪
- ③ 永江玄太, 金田篤志ら. 肝癌におけるゲノム・エピゲノム異常の統合的解析. 第 2 回日本エピジェネティクス研究会年会 2008 年 5 月 9 日. 静岡県三島
- ④ 鄧穎氷, 金田篤志ら. 肝癌における異常メチル化に伴った遺伝子発現抑制の網羅的解析. 第 2 回日本エピジェネティクス研究会年会 2008 年 5 月 9 日. 静岡県三島
- ⑤ 八木浩一, 金田篤志ら. MassARRAY による大腸癌の定量的メチル化解析. 第 2 回日本エピジェネティクス研究会年会 2008 年 5 月 9 日. 静岡県三島
- ⑥ Atsushi Kaneda. Chemoprevention strategy of intestinal tumor based on enhanced sensitivity to IGF2 signaling in IGF2 loss of imprinting. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008 年 10 月 29 日愛知県名古屋市
- ⑦ 永江玄太, 金田篤志ら. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations in liver cancer. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008 年 10 月 28 日愛知県名古屋市
- ⑧ 鄧穎氷, 金田篤志ら. Comprehensive analysis of transcriptionally repressed genes due to aberrant promoter hypermethylation in liver cancer. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008 年 10 月 28 日愛知県名古屋市
- ⑨ 八木浩一, 金田篤志ら. Epigenotyping of

colorectal cancer by quantitative methylation analysis using MassARRAY. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008 年 10 月 28 日愛知県名古屋市

- ⑩ 八木浩一、金田篤志ら. MassARRAY を用いた定量的メチル化解析による大腸癌の epigenotyping. 第 109 回日本外科学会定期学術集会. 2009 年 4 月 2 日福岡
- ⑪ 永江玄太、金田篤志ら. ヒトゲノムにおける網羅的メチル化解析法の比較検討. 第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2009 年 5 月 22 日東京
- ⑫ 鄧穎水、金田篤志ら. 肝癌発癌過程における DNA メチル化の変化と肝炎ウイルスの関係. 第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2009 年 5 月 22 日東京
- ⑬ 八木浩一、金田篤志ら. 大腸癌は 3 群のエピジェノタイプに分類される. 第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2009 年 5 月 22 日東京
- ⑭ 松坂恵介、金田篤志ら. 胃癌における DNA メチル化の網羅的解析. 第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2009 年 5 月 22 日東京
- ⑮ Atsushi Kaneda. Cancer Epigenotyping. Epigenomics, Sequencing and SNIpomics-2009. 2009 年 7 月 14 日 Boston, USA
- ⑯ 金田篤志ら. 癌エピジェノタイピング. 第 68 回日本癌学会学術総会. 2009 年 10 月 1 日横浜
- ⑰ 松坂恵介、金田篤志ら. 胃癌における DNA メチル化の網羅的解析. 第 68 回日本癌学会学術総会. 2009 年 10 月 1 日横浜
- ⑱ 鄧穎水、金田篤志ら. 肝癌過程における DNA メチル化の変化と肝炎ウイルスの関係. 第 68 回日本癌学会学術総会. 2009 年 10 月 1 日横浜
- ⑲ 八木浩一、金田篤志ら. 定量的メチル化解析により大腸癌は 3 群のエピジェノタイプに分類される. 第 68 回日本癌学会学術総会. 2009 年 10 月 2 日横浜
- ⑳ 永江玄太、金田篤志ら. 肝癌におけるゲノム・エピゲノム異常の包括的解析. 第 68 回日本癌学会学術総会. 2009 年 10 月 2 日横浜

[図書] (計 3 件)

- ① 金田篤志: 第 2 章—III 発癌におけるエピジェネティクス—DNA メチル化とクロマチン制御-. in 「がんプロフェッショナル養成講座 腫瘍病理学」(編: 深山正久)、株式会社文光堂、342-369, 2008
- ② 金田篤志, 八木浩一: 第 1 章 4-1) 胃癌の epigenetic change. 消化器外科 Vol 31 No. 5 特集「胃癌のすべて」(編: 上

西紀夫)、株式会社へるす出版、610-616, 2008

- ③ 金田篤志: 第 2 章 1-4) MassARRAY による DNA メチル化解析, 遺伝子医学 MOOK Vol 10 特集「DNA チップ/マイクロアレイ臨床応用の実験」(編: 油谷浩幸)、株式会社メディカルドゥ、168-175, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 癌細胞の存否を判定する方法および癌患者の予後を判定する方法

発明者: 金田篤志、八木浩一、油谷浩幸

権利者: 国立大学法人東京大学、シスメックス株式会社

種類: 特許

番号: 特願第 2009-158873 号

出願年月日: 2009 年 7 月 3 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 篤志 (KANEDA ATSUSHI)

東京大学先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号: 10313024

(2) 研究分担者

堤 修一 (TSUTSUMI SHUICHI)

東京大学先端科学技術研究センター・助教  
研究者番号: 30345152

(H19→H20: 連携研究者)

宇於崎 宏 (UOZAKI HIROSHI)

東京大学医学部附属病院・講師

研究者番号: 10296246

(H19→H20: 連携研究者)

(3) 連携研究者

H20 年度より上記の 2 名