

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390423
 研究課題名（和文） 網羅的エピゲノム解析技術システムを用いた卵巣癌化機構の解明について
 研究課題名（英文） Evidence for an epigenetic mechanisms in ovarian cancer by the whole-genome tiling array system.
 研究代表者 有馬 隆博（ARIMA TAKAHIRO）
 東北大学・未来医工学治療開発センター・准教授
 研究者番号：80253532

研究成果の概要（和文）：

卵巣癌細胞、組織を用い、網羅的なエピジェネティックな修飾の変化（DNA メチル化異常）と病因、病態（年齢、進行期、組織型）について関連性の検討を行ない、癌抑制遺伝子、インプリンティング遺伝子群の早期変異について明らかにした。発症予防の観点から、生活習慣などの環境要因についても検討した。さらに、新規メチル化異常測定系の開発に着手し、その性能評価を行なった。

研究成果の概要（英文）：

We examined the epigenetic mechanisms (DNA methylation abnormality) in ovarian cancer by the whole-genome tiling array system and analysed the association between the etiology and conditions of a patient (age, staging, histological type). We found early stage variation for some tumor suppressor genes and imprinted genes. From the viewpoint of onset prevention, we examined the environmental factors, such as meals and life-styles. Furthermore, we developed a novel methylation analysis system, PCR-Luminex methods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：卵巣癌、エピジェネティクス、症例対照研究、ChIP-on-Chip、DNA メチル化、インプリント遺伝子

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、早期発見が困難で癌の進展は極めて早く、予後不良の癌である。これまで候補アプローチと試行錯誤により標的遺伝子

を定め、卵巣癌の比較的早期に見られるエピジェネティックな修飾の異常について世界に向けて発信してきた。また、東北大学医学部産婦人科は臨床面でも、手術や化学療法な

どの集学的治療に関し、国内の中心的な役割を担ってきた実績もある。そこで、本研究では癌化機構を解明するため、ゲノムタイアリングアレイと ChIP-on-Chip 技術を導入し、網羅的・系統的なエピゲノム解析の研究基盤を確立し、病理組織分類に応じた卵巣癌の発癌機構の病態を解明することを目的とする。

また、卵巣癌患者の食生活や生活習慣の疫学調査は、症例と年齢や居住地をマッチさせた健常人を対照として行う。交絡要因について補正を行うことにより、精度の高い研究結果を得る。これらの結果は新しい卵巣癌の診断法の開発や創薬治療への足がかりへと繋げる。

2. 研究の目的

本研究では卵巣癌化機構の解明するため、最新のゲノムタイアリングアレイと ChIP-on-Chip 技術を導入する。この技術により、網羅的・系統的なエピジェネティックスの研究基盤を確立し、卵巣癌の病態を解明することを目的とする。さらに、この解析結果をもとに、新しい診断マーカーの開発に新たな癌治療戦略を拓くことを目標とする。具体的には、4つの項目を明らかにする。

- (1) 卵巣癌細胞株を用い、ChIP-on-Chip システム解析による、網羅的・系統的なエピジェネティックスの解析；エピジェネティックな変異を認める分子群を同定し、機能上、構造上の分類による検討を加える。
- (2) 摘出卵巣癌組織を用い、(1)で明らかとなった標的遺伝子のエピジェネティックスの解析を行い、異常の頻度、程度を患者情報に照らし合わせ分析する。
- (3) 比例対照試験による食生活や生活習慣に関する疫学調査は、症例と年齢や居住地をマッチさせた健常人を対照とする解析を行う。交絡要因について補正を行うことにより、精度の高い研究結果を得る。
- (4) 早期診断や病態診断の実用化に向けて標的遺伝子を対象に新規 DNA メチル化簡易検査法（診断法）を臨床導入する。

3. 研究の方法

(1) 卵巣癌患者の登録；症例、対照の登録を実施（症例：対照＝1：2）

症例：東北大学医学部産婦人科の関連病院において手術を施行した卵巣癌患者（症例数 50 例）対照：症例と年齢や居住

地をマッチングさせた人（対照数 100 例）。既に確立した登録システムを運用し、症例の登録、および生活習慣等に関する記述式アンケート調査、食物摂取頻度調査票（FFQ）を用いた食品項目の摂取頻度調査を行った。

(2) ChIP-on-Chip システムによる解析；代表的な卵巣癌細胞株（PA1, SKOV）を用い正常卵巣上皮細胞株と比較解析し、網羅的・系統的なエピジェネティックスの解析を行った。卵巣癌細胞株より DNA を抽出。DNA は制限酵素処理後、抗メチル化シトシン抗体で免疫沈降し、抗体に結合する DNA をビオチン標識。200-300bp のヒトプロモーター配列、エンハンサー配列、転写調節領域を含むおよそ 20000 個のスポットを解析するゲノムタイアリングアレイでメチル化に富む領域をストレプトアビジンで標識し、ハイブリダイズすることでメチル化のプロファイリングを行った（図 1）。

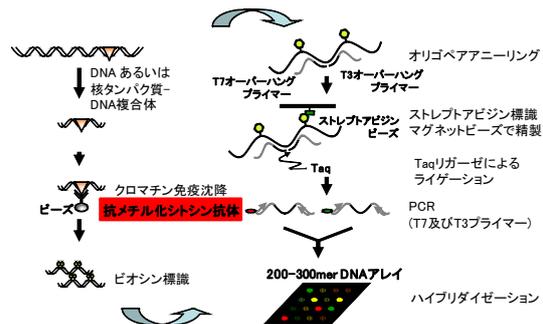


図 1 ChIP-on-Chipシステムの概略図

(3) 癌サンプルを用いた解析；細胞株は培養中にエピジェネティックな修飾を受けることがある。そのため、ChIP-on-Chip で

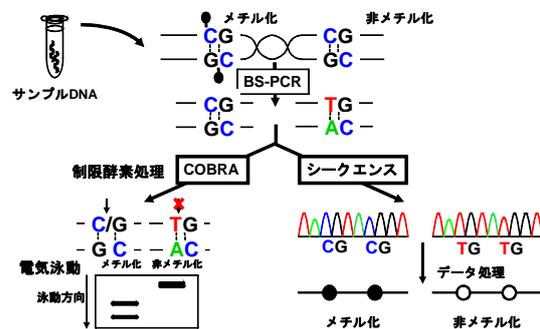


図 2 COBRA法の原理

得られた結果について実際に多数例（110 検体）の癌サンプルで DNA メチル化は Bisulphite-PCR 法（COBRA 法）を用いて確認した（図 2）。

バイサルファイト処理により、ゲノム中の非メチル化

シトシンのみがウラシルに変換される。その結果、変換された DNA は自己相補性がなくなる。二つの DNA 鎖のうち片方に特異的なプライマーを用いて PCR をすると、ウラシル (元はシトシン) はチミンに、メチル化シトシンはシトシンに置き換わる。これらの変換の違いを利用して、CpG 配列を含む制限酵素認識部位で酵素処理を行うことにより、メチル化・非メチル化の判定を行う。

LOH と LOI の解析； 卵巣癌患者の末梢血 DNA と癌組織 DNA と RNA を抽出し、制限酵素多型を利用し、LOH (loss of heterozygosity；ヘテロ接合性の消失) と LOI (loss of imprinting；インプリントの解除) の解析を行なった。またその結果は年齢、組織型、進行度、転移の有無、治療抵抗性、予後など臨床病態との相関について検討した。

(4) 疫学的解析； エピジェネティクスは栄養、環境で変化しうる可塑性を持ち合わせる。そのため生活習慣や食物摂取に関するアンケートを基に多変量解析し、卵巣癌発症のリスクファクターと罹患予防について検討した。

(5) 診断に関する基礎的検討； 以上の結果をふまえ、エピジェネティックな変異を指標とし、早期診断や病態診断の実用化に向けて新規 DNA メチル化診断法を導入、開発を行なった。

4. 研究成果

(1) ChIP-on-Chip システムによる解析； 癌細胞株 (PA1, SKOV) を使い、抗メチル化

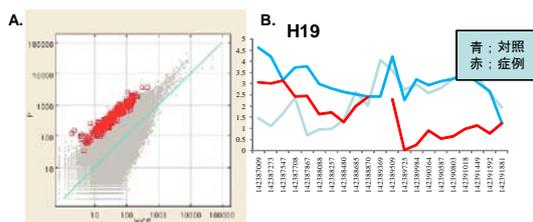


図3 ChIP-on-Chipシステムによるエピジェネティックな分子機構の解明

AはChIP-on-Chipによる解析結果を示す。Bはタイリングアレイの結果より連続した値をグラフ化したもの (H19遺伝子領域)

シトシン抗体で免疫沈降後、抗メチル化シトシン抗体に結合する DNA のプロファイリングを行った (図3)。

その結果、癌細胞で有意にメチル化の変化を受ける (8-16 倍以上) 107 領域を同定し

た。この領域には、癌抑制遺伝子のプロモーター (P14, P16)、既知のインプリント制御領域、DNA 修復遺伝子 (14-3-3s 遺伝子) 発現調節領域も含まれていた。エストロゲン関連遺伝子とインプリンティング遺伝子群は共通に有意な変異を示した。

(2) 癌サンプルを用いた解析；

①エストロゲン受容体遺伝子、エストロゲン応答遺伝子の DNA メチル化の解析
癌症例と対照の DNA を使い、エストロゲンレセプター (ER α) 遺伝子、ダイオキシンレセプター遺伝子 (DR) およびプロゲステロンレセプター遺伝子 (PR) のプロモーター領域の DNA メチル化パターンの解析を行った。ER α は 320bp 20 の CpG 部位 (メチル化部位)、DR は 359bp 22 の CpG 部位、PR は 250bp 23CpG 部位について調べた (図4)。

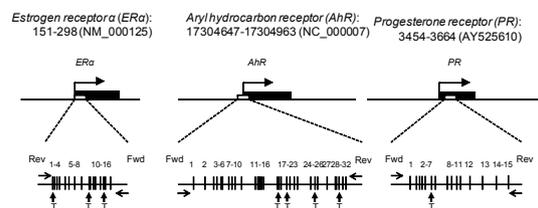


図4 エストロゲン関連遺伝子のメチル化解析

卵巣癌に関わるシグナル伝達関連遺伝子の領域の略図。エストロゲン受容体遺伝子、ダイオキシン受容体遺伝子、プロゲステロン受容体遺伝子のプロモーター近辺の CpG アイランド領域。解析した範囲は GenBank に登録された、accession ナンバー上の塩基配列番号で記した。黒棒と矢印は各遺伝子と転写方向を示す。白棒はメチル化解析した領域を示し、PCR で増幅した領域を下に拡大した。縦棒は CpG 配列の位置を示し、その上に CpG の番号を記し、下には制限酵素認識部位を示した (T: TaqI)。小さい矢印はバイサルファイト PCR に用いたプライマー (Fwd, Rev) の位置を示す。

制限酵素を利用する COBRA 法と Sequence 法にて行った結果、いずれも有意な差は認めなかった。さらに、年齢、症状、重症度で比較したが、いずれも有意な差は認めなかった。

② インプリント遺伝子の解析

同様にインプリント遺伝子についても解析を行った (図5)。

卵巣癌ならびに正常卵巣検体におけるヒトインプリン
ト遺伝子の COBRA 解析。各検体から抽出したゲノム DNA をバイサルファイト処理し、各 PCR を実行した。父由来対立遺伝子がメチル化される遺伝子 *H19*、*GTL2* と母由来対立遺伝子がメチル化される遺伝子 *PEG1*、*LIT1*、*ZAC*、*PEG3*、*SNRPN* をそれぞれ解析した。各 PCR 産物は各制限酵素 (*TaqI*、*HhaI*) で処理された。エラーバーは \pm SD を示した。

COBRA 法を応用して、子宮体がん 110 検体における DNA メチル化インプリント状態を解析した。対照実験として、正常 22 検体について同様に解析した。癌の解析の結果、*H19* で 38.1% (SD \pm 19.2)、*GTL2* で 41.2% (\pm 21.9)、*PEG1* で 41.9% (\pm 15.2)、*LIT1* で 41.7% (\pm 18.4)、*ZAC* で 35.4% (\pm 13.4)、*PEG3* で 44.7% (\pm 16.0)、*SNRPN* で 22.5% (\pm 9.9) のメチル化を示した。また正常組織の結果、*H19* で 44.3% (SD \pm 14.4)、*GTL2* で 43.4% (\pm 14.5)、*PEG1* で 36.4% (\pm 15.0)、*LIT1* で 50.7% (\pm 16.6)、*ZAC* で 35.4% (\pm 13.0)、*PEG3* で 40.4% (\pm 14.2)、*SNRPN* で 21.8% (\pm 7.6) のメチル化を示した (図 3)。また正常組織メチル化の平均より 2SD 以上を示すものを異常な高メチル化状態、2SD 以下を示すものを異常な低メチル化状態と定義し、癌検体において、メチル化状態を示す症例について解析した。その結果、高メチル化異常は *H19* で 7 症例、*GTL2* で 10 症例、*PEG1* で 4 症例、*LIT1* で 3 症例、*ZAC* で 3 症例、*PEG3* で 6 症例、*SNRPN* で 8 症例みられた。一方で低メチル化異常は *H19* で 9 症例、*GTL2* で 12 症例、*PEG1* で 1 症例、*LIT1* で 12 症例、*ZAC* で 2 症例、*PEG3* で

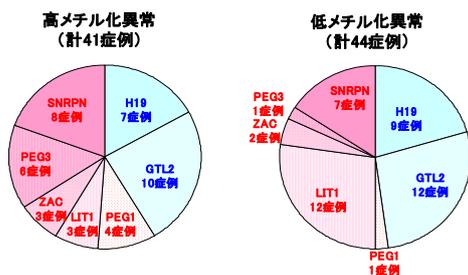


図 6 卵巣癌のメチル化インプリント異常

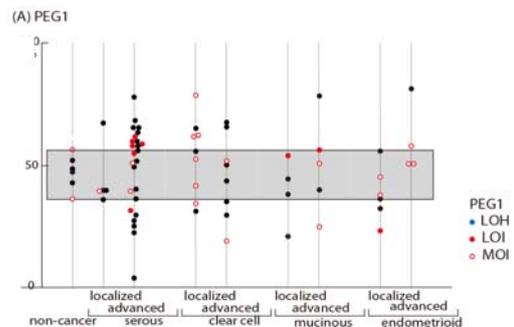
1 症例、*SNRPN* で 7 症例みられた (図 6)。卵巣癌 110 検体における高メチル化ならびに低メチル化異常の症例。正常組織メチル化の平均より 2SD 以上を示すものを異常な高メチル化状態、2SD 以下を示すものを異常な低メチル化状態と定義した。高メチル化異常を示した症例の円グラフは左、低メチル化異常を示した症例の円グラフは右に示した。

③ LOH と LOI の解析

さらに、卵巣癌発症の分子機構を探るため、前述のインプリント遺伝子を標的遺伝子として、どのような機序で癌化が起こるのか検討した。多くの癌発症にヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity : LOH) が知られている。また、インプリント遺伝子の場合、通常発現のみられるアレルは片親性で維持されているが、癌化に伴い、インプリントの解除 (loss of imprinting : LOI) がみられる。また、いずれも DNA メチル化が原因となっていることも判明している。そこで、解析した卵巣癌の LOH、LOI、MOI (maintenance of imprinting) の頻度とメチル化の変化について解析した (表 1)。

④ 組織型、進行期、年齢による解析

LOH、LOI、MOI (maintenance of imprinting) の頻度は、組織型、進行期、年齢により比較した。その結果、癌早期からメチル化の変化の伴い、LOI の頻度が亢進している領域 (*H19*、*PEG1*) がみられた。これらの遺伝子は、癌抑制遺伝子として機能する事が知られており、卵巣癌発症に関わる重要な遺伝子で



あると示唆された (図 7)。

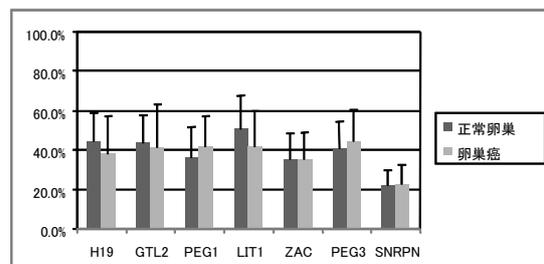


図 5 卵巣癌の DNA メチル化インプリント解析

(3) 卵巣癌の疫学的解析；

① 高危険因子の解析

癌の発生日リスクに関する疫学研究を行う場合、独立した因子を評価するためには、がん発生に関わるその他の高危険因子で補正する必要がある。本研究では、症例群と対照群で発生に関与すると考えられる生活習慣、栄養素についてオッズ比を求めた。両群の平均年齢は症例 56.1 歳、対照群 49.5 歳であった。BMI に関しては、20.04未満を1.0とすると、21.64-23.92、23.93 以上のオッズ比は 1.24、1.92 であり統計学的に有意に増加していた ($p=0.01$)。授乳歴に関しては、授乳したことがある場合はない場合にくらべてオッズ比が 0.37 (97%信頼区間 0.17-0.82) と低くなり統計学的に有意にリスクが低下していた ($p=0.013$)。経口避妊薬の使用に関しては、服用したことがある場合はない場合にくらべてオッズ比が 0.16 (95%信頼区間 0.04-0.66) と低くなり、統計学的に有意にリスクが低下していた ($p=0.01$)。独立した危険因子は高齢と BMI が高いことであり、経口避妊薬の使用と授乳歴はリスクを低くすることが明らかになった。

② 栄養素と卵巣癌との関連についての研究

食事との関連について、肉類・魚類・野菜・揚げ物・天ぷら摂取頻度項目について解析した。野菜摂取頻度の上昇により腫瘍のリスクが低下した ($p=0.062$)。しかし、摂取総カロリーや BMI、高血圧症などの交絡因子を考慮し解析すると有意差は消失した。一方、栄養素の解析ではレチノールおよびナイアシンの摂取量が腫瘍のリスク上昇と関連していた ($P=0.012$, $P=0.028$)。統計学的有意差はなかったものの、ビタミン A の摂取量がリスクを上昇させる傾向にあり ($P=0.064$)、ビタミン C の摂取量はリスクを低下させる傾向にあった ($P=0.065$)。我が国における卵巣癌の漸増の原因を探求する意味でも、病因を解明することは重要であり、本研究の結論が国民の生活、行政指導に有益な情報をもたらすものと考えられる。しかし本研究のような前方視的な研究にあつては、中途での解析は研究結果に影響する恐れがあるた

めに解析を行ってはいないとされている。前述したように、現在のサンプルサイズでは十分な統計学的パワー(検出力)が得られないため、腫瘍の病因について結論を導き出すことはできず、結論は今後さらに詳細な解析を行った後に報告する。

(4) 新規 DNA メチル化診断法の開発；

独自にインプリンティング異常解析法を東北大学より特許出願し(特願：代表者)、PCR-Luminex 法を用いた新規メチル化解析システムを開発に成功した(図8、共同研

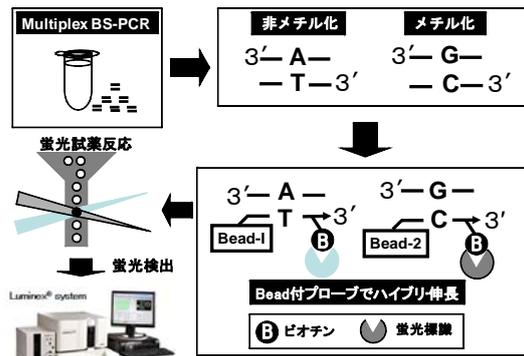


図8 新規DNAメチル化解析システムの開発(共同開発)。

PCR-Luminex 法はフローサイトメトリーを利用したマイクロビーズアレイ技術である蛍光ルミネックス法を用いた技術である。これまでに、一塩基置換を検出可能なことから SNP 検査等に応用されてきた。この技術を用い、本法ではバイサルファイト (BS: 亜硫酸水素塩) 処理で塩基置換した非メチル化をメチル化アレルと区別し、定量化を行う。BS は DNA の非メチル化 CpG 部位は TpG に置換し、非メチル化 CpG 部位は CpG のまま置換しない。その結果労力とコストの削減が可能となり、96 検体の測定が約 1 時間と短時間で処理可能である。効率良く増幅可能なプライマーの設計は、特許

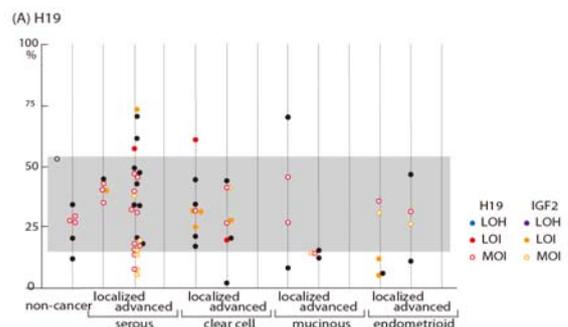


図7 DNAメチル化とLOH(LOI)との関連

申請した。また、蛍光の測定に用いるルミネックス装置は既に保有しており、特異的なハイブリダイゼーションによる1塩基の違いを検出するためのプローブ配列、ハイブリダイゼーション溶液の調整も行った。また、データ解析は定量化可能にし、今後実用化を目指している。従来法 COBRA法と比較し、性能評価を行い、安定した結果が得られている。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計13件)

- ① Hiura H, Sugawara A, Ogawa H, John RM, Miyauchi N, Miyanari Y, Horiike T, Li Y, Yaegashi N, Sasaki H, Kono T, Arima T. A tripartite paternally methylated region within the *Gpr1-Zdbf2* imprinted domain on mouse chromosome 1 identified by meDIP-on-chip. *Nucleic Acids Research* in press 2010. 査読有
- ② Maeda T, Oyama J, Sasaki M, Arima T, Makino N. The correlation between the clinical laboratory data and the telomere length in peripheral blood leukocytes of Japanese female patients with hypertension. *The Journal of Nutrition, Health and Aging(JNHA)*. in press. 2010. 査読有
- ③ Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, Sasaki H, Yaegashi N, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human Mol. Genet* 16, 2542-2551 2007. 査読有
- ④ Suga S, Kato K, Ohgami T, Yamayoshi A, Adachi S, Asanoma K, Yamaguchi S, Arima T, Kinoshita K, Wake N. An inhibitory effect on cell proliferation by blockage of the MAPK/Estrogen Receptor/MDM2 signal pathway in gynecologic cancer. *Gynecologic Oncology* 105, 341-350 2007. 査読有

【学会発表】(計24件)

- ① Arima T. 「Genome-wide screening of imprinted genes by meDIP-on-chip」
International symposium of NM-GCOE.

(2009/7/12) senndai .

- ② Arima T. 「genomic imprinting and placentation」 FOAD (fetal origin of adult disease) symposium (2009/2/11) Seoul, Korea.

〔産業財産権〕

名称：インプリント異常発生リスクの判定方法
発明者：有馬 隆博、小林 久人
権利者：同上
種類：特許
番号：2008-007343
出願年月日：平成20年1月16日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有馬 隆博 (ARIMA TAKAHIRO)
東北大学・未来医工学治療開発センター・
准教授
研究者番号：80253532

(2) 研究分担者

八重樫 伸生 (YAEGASHI NOBUO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00241597

千坂 泰 (CHISAKA HIROSI)
東北大学・病院・講師
研究者番号：40323026

阿部 圭子 (ABE KEIKO)
東北大学・未来医工学治療開発センター・
技術補佐員
研究者番号：30444003

(3) 連携研究者

()

研究者番号：