

平成 21 年 6 月 25 日現在

| | |
|------------------|--|
| 研究種目若手研究 (B) | |
| 研究期間 : 2007~2008 | |
| 課題番号 : 19790276 | |
| 研究課題名 (和文) | 発がんリスク評価を目指した諸臓器の前がん状態における DNA メチル化異常の研究 |
| 研究課題名 (英文) | Carcinogenic risk estimation based on DNA methylation alteration in precancerous conditions of various human cancers |
| 研究代表者 | |
| | 新井 恵吏 (ARAI ERI) |
| | 国立がんセンター(研究所および東病院臨床開発センター)・病理部・研究員 |
| | 研究者番号 : 40446547 |

研究成果の概要 : 組織検体においてゲノム網羅的 DNA メチル解析を施行し, ゲノム規模の DNA メチル化異常が, 腎・肝における多段階発がん過程に前がん段階から寄与することを示した. 前がん状態における DNA メチル化プロファイルはがんに継承され, がんの悪性度や症例の予後を規定する可能性がある. 慢性肝炎・肝硬変症で経過観察中の患者において, 肝細胞がん発生リスク評価指標となる DNA メチル化プロファイルを同定した. 発がんリスク評価の実用化のため, 速やかに前向き試験に着手したい.

交付額

(金額単位: 円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,000,000 | 0 | 2,000,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 390,000 | 3,690,000 |

研究分野: 病理学, エピジェネティクス

科研費の分科・細目: 人体病理学

キーワード: DNA メチル化, 多段階発がん, 前がん状態, 発がんリスク, 予後予測, 腎がん, 尿路上皮がん, 肝細胞がん

1. 研究開始当初の背景

ヒトのがんの多くが, 長い時間と複数の段階を経て発生すると認識されている. 諸臓器のがんの手術材料を顕微鏡的に観察したとき, がんの近傍に前がん病変を認めたり, 早期のがんの病巣の中に組織学的異型度の高い進行したがんの成分が観察されることは, 発がん過程が多段階的に進行することの反映と理解される.

研究代表者の所属研究室は, 代表的なエピ

ジェネティック機構である DNA メチル化異常が, 染色体不安定性やマイクロサテライト不安定性といったジェネティックな事象に先行して, 多段階発がん過程の早期すなわち前がん段階から認められることを, 種々の臓器で年来報告してきた (Kanai Y. Jpn J Cancer Res, 1996 など). 特に肝炎ウイルス感染を伴う慢性肝炎ないし肝硬変症など, ウイルスの持続感染や遷延する慢性炎症を伴う前がん状態には, DNA メチル化異常が好発する. が

ん関連遺伝子の不活化や染色体不安定性の惹起を介して多段階発がんの早期過程の鍵を握る DNA メチル化異常は、発がんリスク評価の優れた指標になり得ると考えられていた。

しかしながら研究開始時点までに、臨床検体で DNA メチル化異常を解析した内外の刊行論文の過半が、単独のあるいは少数のがん関連遺伝子における DNA メチル化の亢進の有無を個々のがんで報告するものであった。多段階発がん過程において DNA メチル化調節機構が破綻すれば、個々の遺伝子の CpG アイランドのみならず、DNA メチル化異常はゲノム規模で生じると推測される。したがって、検診ないし診療の現場での実用に耐える発がんリスク評価指標を確立するには、ゲノム全体に生じた DNA メチル化パターンの変化を俯瞰して、その中からもっとも鋭敏な指標となる DNA メチル化プロファイルを同定しなくてはならないと考えられた。

2. 研究の目的

がん診療のブレイクスルーのためには、既に確立したがんを診断・治療するにとどまらず、多段階発がん過程の進行を早期に阻止しなければならない。このために、前がん状態でおこる分子事象を明らかにし、発がんリスクを評価して、前がん段階から介入することが望まれる。

DNA メチル化異常は多段階発がん過程に前がん段階から寄与し、概して異常の頻度が高い。また、DNA 鎖上に共有結合によって保存されており、前がん段階における軽微な変化であっても、臨床検査として安定的に検出する。よって、前がん段階に特徴的な DNA メチル化プロファイルを指標とすれば、発がん予防ならびにがんの早期診断にブレイクスルーをもたらさう。発がんリスク評価を実用化できると期待される。

本研究では、前がん段階にある多数の組織検体において DNA メチル化状態をゲノム網羅的に解析し、前がん段階における DNA メチル化異常の意義の理解を進めるとともに、適切な指標となる DNA メチル化プロファイルを同定して、発がんリスク評価法を確立することを目的とする。

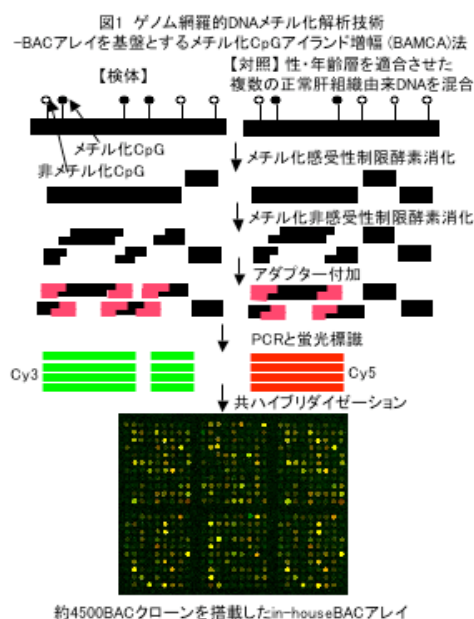
3. 研究の方法

(1) 腎細胞がん症例に対する腎摘除術標本の、腎細胞がんから充分離れた部位より、非がん腎組織 51 検体を採取し、組織学的に特記すべき所見を認めないことを確認した。同一症例より、腎細胞がん組織 51 検体を採取した。比較のために、尿管がんなどによって腎摘除術を受けた非腎細胞がん症例の、正常腎組織 8 検体を採取した。肝細胞がん症例に対する肝部分切除術標本などより、非がん肝組織

39 検体ならびに肝細胞がん組織 44 検体を採取した。比較のため、大腸がん肝転移などによって肝部分切除術を受けた、肝炎ウイルス感染や慢性肝炎や肝硬変症を伴わない非肝細胞がん症例の、正常肝組織 36 検体を採取した。肝炎ウイルス感染を伴いながら、肝細胞がんを発症していない症例の非がん肝組織 7 検体を加えた。これら総計 236 検体の新鮮凍結組織より高分子量 DNA を抽出した。

(2) BAC アレイを基盤としたメチル化 CpG アイランド増幅法 (BAMCA 法) により、ゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行った。BAMCA 法は、制限酵素のメチル化感受性の違いを利用してメチル化 DNA 断片のみを増幅し、異なる蛍光色素で標識した検体 DNA と対照 DNA を BAC アレイに共ハイブリダイゼーションさせて、対照に対する検体の DNA メチル化の変化を蛍光強度比として検出する方法である (図 1)。

DNA メチル化には組織特異性・臓器特異性が存在とされているため、対照 DNA として、末梢血などではなく、非腎細胞がん症例ならびに肝炎ウイルス感染や慢性肝炎や肝硬変症を伴わない非肝細胞がん症例の正常組織を用いた。さらに、DNA メチル化の状態は加齢に伴って変化すると認識されているので、検体を採取した症例と性ならびに年齢の平均値を概ね一致させた症例を複数選択し、これらの症例より得られた正常肝組織より抽出したゲノム DNA を混合して対照とした。



(3) 平成 19 年 8 月 16 日改正文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い、国立がんセンター倫理委員会に研究の承認を得、倫理面に充分配慮して研究を進

めた。手術材料の残余の組織などの研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し、文書で同意を得ている。試料の採取に当たっては、患者の治療方針決定のための病理組織標本を迅速に作製して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせなかった。全ての分子病理学的解析は、連結可能匿名化し、患者の個人情報保護に充分配慮して進めた。すなわち、個人識別番号と匿名化番号の対応表は、研究所内におかれた匿名管理者によって終始厳重に管理され、診療情報と同時に閲覧されることはなかった。実験室においては、終始患者個人を特定することなく研究を進めた。

4. 研究成果

(1) 腎の前がん状態における DNA メチル化異常の意義

腎細胞がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん腎組織では既に、正常腎組織に見られた個体差や加齢の範囲を越えて、多数の BAC クローンにおいて DNA メチル化の減弱あるいは亢進が認められた。腎細胞がんは通常、背景腎実質に向けてスキラスに浸潤することはなく、厚い線維性瘍被膜に完全に被覆されて存在し、境界明瞭である。非がん腎組織は腎細胞がん組織から十分な距離を置いて採取することが可能で、非がん腎組織に検出された DNA メチル化の変化はがん細胞の混入によるものではない。腎細胞がん組織では、腎細胞がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん腎組織に比して、DNA メチル化の減弱あるいは亢進を認める BAC クローン数がさらに有意に増加し、DNA メチル化の減弱あるいは亢進の程度も更に亢進した。

ゲノム規模の DNA メチル化の変化に着目して、正常腎組織と腎細胞がん症例より得られた非がん腎組織を、組織学的に特記すべき所見を示さなくても区別できたことから、DNA メチル化の観点からは、腎細胞がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん腎組織は既に前がん状態にあると考えられた。ウイルスの持続感染や慢性炎症などの明確な背景を伴わず組織学的に認識し難いことから、従来前がん状態がほとんど議論されてこなかった腎においてすら、DNA メチル化に着目すれば前がん状態の存在が認識できることは注目される。

腎細胞がん症例より得られた組織学的に特記すべき所見を示さない非がん腎組織において、全 BAC クローンの蛍光強度比の実測値を用い、階層的クラスタリング（教師なし法）を行った。組織学的に特記すべき所見を示さない非がん腎組織の DNA メチル化状態に基づいて、全 51 症例はクラスター AN (46

症例)とクラスター BN (5 症例)に大別された(図 2)。組織学的に特記すべき所見を示さない非がん腎組織の DNA メチル化状態にもとづくクラスター分類と、その症例に生じた腎細胞がんの、肉眼型(がんの浸潤性・転移性をよく反映することが経験的に知られている)・静脈侵襲の有無・腎静脈本幹の腫瘍栓の有無・診断時の病期との間に有意な相関があることが分かった。クラスター BN 症例にはより悪性度の高いがんが認められ、有意に予後不良であった(図 3)。すなわち前がん状態における DNA メチル化プロファイルがその症例に生じるがんの悪性度ならびに症例の予後すら規定する可能性があると考えられた。

腎細胞がん組織において、全 BAC クローンの蛍光強度比の実測値を用い、階層的クラスタリング(教師なし法)を行った。腎細胞がん組織の DNA メチル化状態に基づいて、全 51 症例はクラスター AT (43 症例)とクラスター BT (8 症例)に大別された。腎細胞がん組織の DNA メチル化状態にもとづくクラスター分類と、腎細胞がんの、静脈侵襲の有無・腎静脈本幹の腫瘍栓の有無・診断時の病期との間に有意な相関があることが分かった。クラスター BT 症例にはより悪性度の高いがんが認められ、有意に予後不良であった。すなわち DNA メチル化プロファイルがそのがんの悪性度と予後を規定する、すなわちゲノム規模の DNA メチル化異常が腎細胞がんの悪性進展に寄与する可能性があると考えられた。

組織学的に特記すべき所見を示さない非がん腎組織の DNA メチル化状態にもとづくクラスター BN が、腎細胞がんの DNA メチル化状態にもとづくクラスター BT に完全に包含されることが分かった。ウイロコクソン検定を行い、 $P < 0.01$ をもって、クラスター BN をクラスター AN から区別するのに有用な BAC クローンと、クラスター BT をクラスター AT から区別するのに有用な BAC クローンを抽出した。大勢を占める 724 クローンが両者に共通であるのみならず、クラスター BN においてクラスター AN に比し DNA メチル化亢進を認める 311 BAC クローンにおいては、クラスター BT においてもクラスター AT に比して DNA メチル化亢進を認め、クラスター BN においてクラスター AN に比し DNA メチル化減弱を認める 413 BAC クローンにおいては、クラスター BT においてもクラスター AT に比して DNA メチル化減弱を認め、1 クローンの例外も見られなかった(図 4)。

代表的な BAC クローンの蛍光強度比の実測値を用いて検証したところ、前がん状態における DNA メチル化プロファイルは、腎細胞がんにもそのまま受け継がれて、腎細胞がんの悪性度を高めている可能性があると考えられた。前がん状態における DNA メチル化が

単に変化しているのではなく、多段階発がん過程の早期から有意な寄与をなしている可能性が示唆された。ゲノム網羅的な DNA メチル化解析を種々の臓器に展開することにより、DNA メチル化プロファイル指標とした発がんリスク評価を行うと期待された。

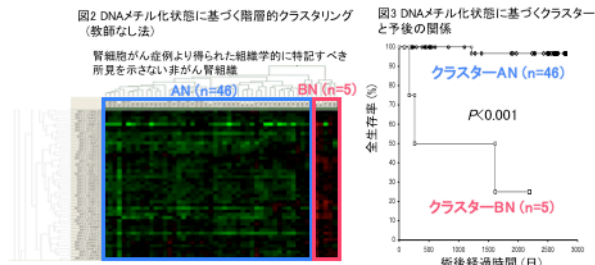
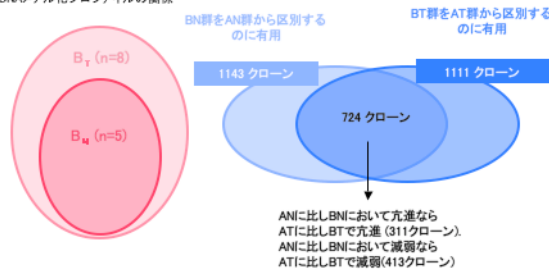


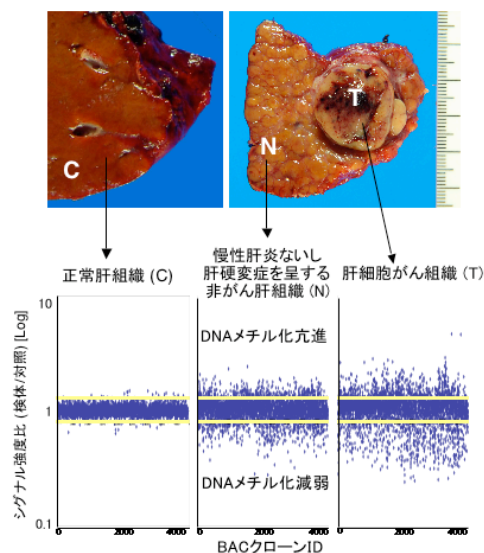
図4 組織学的に特記すべき所見を示さない非がん腎組織ならびにその症例に生じた通常型腎細胞がんの DNAメチル化プロファイルの関係



(2) 慢性肝障害患者における肝細胞がん発生リスク評価指標の確立:

肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織では既に、非肝細胞がん症例より得られた慢性肝炎ないし肝硬変症を伴わない正常肝組織に見られた個体差や加齢の範囲を越えて、多数の BAC クローンにおいて DNA メチル化の減弱あるいは亢進が認められた。肝細胞がんにおいては、DNA メチル化の減弱あるいは亢進を認める BAC クローンの数がさらに増加し、DNA メチル化の減弱あるいは亢進の程度もさらに亢進した (図 5)。

図5 肝組織検体におけるBAMCA法による蛍光強度比の散布図の例



炎症や線維化に伴う変化や肝細胞がんの悪性進展に寄与する DNA メチル化の変化を排除して、発がんリスク評価の指標を得るために、前がん状態において DNA メチル化状態が変化し、その変化が肝細胞がん継承されるような DNA メチル化の変化に着目した。すなわち、正常肝組織と肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織との間でウイルコクソン検定を行い、DNA メチル化状態に有意な差のある 512BAC クローンを抽出した。このうち肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織で DNA メチル化が亢進する BAC クローンは 265、DNA メチル化が減弱する BAC クローンは 247 あった。次に、DNA メチル化が亢進する 265BAC クローンについて、肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織と肝細胞がん組織の間でウイルコクソン検定を行ったところ、再度有意差のあった BAC クローンは 119、有意差のなかった BAC クローンは 146 であった。119BAC クローンのうち、正常肝組織から前がん状態にある肝組織を経て肝細胞がんへと段階的に DNA メチル化が亢進するのは、41BAC クローンであった。DNA メチル化が減弱する 247BAC クローンについて、肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織と肝細胞がん組織の間でウイルコクソン検定を行ったところ、再度有意差のあった BAC クローンは 116、有意差のなかった BAC クローンは 131 であった。116BAC クローンのうち、正常肝組織から前がん状態にある肝組織を経て肝細胞がんへと段階的に DNA メチル化が減弱するのは、40BAC クローンであった。以上より、前がん状態において DNA メチル化が変化しその変化が肝細胞がんにおいて維持される BAC クローン数は 277、前がん状態において DNA メチル化が変化し多段階発がん過程の進展に伴ってさらに変化する BAC クローン数は 81 とみなせる。合計 358BAC クローンを、発がんリスク評価指標の候補と考えた。

358BAC クローンについて、サポートベクターマシナリアルゴリズムによるスポットランキングを行い、正常肝組織と肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を十分な感度と特異度を持って区別することができる。上位 25BAC クローンを選択した。これらの 25BAC クローンにおける蛍光強度比の実測値を用いて階層的クラスタリングを行うと、学習セットの正常肝組織と肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を、誤りなく区別することができた。

25BAC クローンそれぞれについて、学習セットの肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を正常肝組織から区別するための、感度と特異度が最大となるように、カットオフ値を設定した。このカットオフ値を用いた基準を 14BAC クローン以上において満た

した場合、その検体は発がんリスクが高いとみなすことにした。この判定基準により、学習セットにおける肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を感度・特異度とも100%で発がんリスクの高いと診断することができる。

この判定基準の妥当性を検証するため、検証セットの非がん肝組織を評価したところ、検証セットの肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織を、感度・特異度とも96%で、発がんリスクが高いと診断することができた。さらに肝炎ウイルス感染を伴う肝細胞がんを発症していない症例から得られた非がん肝組織と、肝細胞がん症例より得られた非がん肝組織の間で、25BAC クローンにおけるDNAメチル化状態が有意に異なっていた。他方では、肝細胞がん症例より得られた慢性肝炎を呈する非がん肝組織と肝細胞がん症例より得られた肝硬変症を呈する非がん肝組織との間で、25BAC クローンにおけるDNAメチル化状態に有意な差を認めなかった。これらの知見は、本指標が単に肝炎ウイルス感染や炎症・繊維化の度を反映するものではなく、真に発がんリスクを反映する可能性を示唆している。今後臨床家と共同して前向き検証を行い、インターフェロン療法の適応を決定するために採取された肝生検標本などを用いた発がんリスク評価として実用化することを目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- ① Arai E., Ushijima S., Gotoh M., et al. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, In press, 2009. (査読有)
 - ② Arai E., Ushijima S., Fujimoto H., et al. Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome. *Carcinogenesis*:30:214-21, 2009. (査読有)
 - ③ 新井恵吏. ゲノム網羅的DNAメチル化解析に基づく発がんリスク評価とがんの個性診断. *病理と臨床* 27巻7号: 641-7, 2009. (査読無)
 - ④ 新井恵吏, 金井弥栄. DNAメチル化異常の分子病理診断への展開. *医学のあゆみ* 229巻10号:995-1000, 2009. (査読無)
 - ⑤ Arai E., Ushijima S., Tsuda H., et al. Genetic clustering of clear cell renal cell carcinoma based on array-CGH: Its association with DNA methylation alteration and patient outcome. *Clin Cancer Res*; 14:5531-9, 2008. (査読有)
- ⑥ 新井恵吏, 金井弥栄. 前がん状態におけるDNAメチル化異常. *最新医学* 63巻, 788-94, 2008. (査読無)
- 〔学会発表〕(計8件)
- ① 新井恵吏, 牛島抄織, 藤元博行他. 種々の組織亜型の腎腫瘍におけるDNAメチル化プロファイル. 日本エピジェネティクス研究会第3回年会, 2009.5.22-23, 東京.
 - ② Arai E., Ushijima S., Fujimoto H., et al. Genome-wide DNA methylation alterations and copy number alterations during renal carcinogenesis. AACR 100th annual meeting 2009, 2009.4.19-23, in Denver, CO.
 - ③ 赤塚慎也, 大原浩貴, 新井恵吏(13名中12番目)他. アレイCGHを用いた酸化ストレス誘発ラット腎癌における染色体変化の解析. 日本癌学会第67回学術総会, 2008.10.28-30, 名古屋.
 - ④ Arai E., Ushijima S., Tsuda H., et al. Regional DNA hypermethylation and copy number alterations during renal carcinogenesis. AACR special conference, Cancer epigenetics, 2008.5.28-31, in Boston, MA.
 - ⑤ 新井恵吏, 牛島抄織, 藤元博行他. 前がん状態におけるDNAメチル化プロファイルは通常型腎細胞がん継承されてその悪性度ならびに予後と相関する. 日本エピジェネティクス研究会第2回年会, 2008.5.9-10, 三島.
 - ⑥ 新井恵吏, 金井弥栄, 牛島抄織他. ゲノム構造異常に基づく腎細胞がんの新しい分類はDNAメチル化異常ならびに腫瘍の悪性度・症例の予後と相関する. 日本癌学会第66回学術総会, 2007.10.3-5, 横浜.
 - ⑦ 新井恵吏, 金井弥栄, 牛島抄織他. 肝多段階発がん過程におけるDNAメチル化の変化のゲノム網羅的解析. 日本病理学会カンファレンス2007旭川, 2007.7.27-28, 旭川.
 - ⑧ 新井恵吏, 金井弥栄, 牛島抄織他. 腎がんの発生過程におけるDNAメチル化の変化のゲノム網羅的解析. 日本エピジェネティクス研究会第1回年会, 2007.6.15-16, 大阪.
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計3件)
- ① 名称: BACクローンをを用いる尿路上皮癌の発生リスク評価方法及び予後予測方法
発明者: 金井弥栄, 新井恵吏, 西山直隆, 稲澤譲治

権利者：金井弥栄，新井恵史，西山直隆，稲澤譲治

種類：特許権

番号：特願 2009-58156

出願年月日：2009 年 3 月 11 日

国内外の別：国内

②

名称：BACクローンを用いる肝細胞癌の発生リスク評価方法及び予後予測方法

発明者：金井弥栄，新井恵史，稲澤譲治

権利者：金井弥栄，新井恵史，稲澤譲治

種類：特許権

番号：特願 2008-329872

出願年月日：2008 年 12 月 25 日

国内外の別：国内

③

名称：BACクローンを用いる腎細胞癌の予後予測方法

発明者：金井弥栄，新井恵史，廣橋説雄，稲澤譲治

権利者：金井弥栄，新井恵史，廣橋説雄，稲澤譲治

種類：特許権

番号：特願 2008-233491

出願年月日：2008 年 9 月 11 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 恵史 (ARAI ERI)

国立がんセンター(研究所および東病院

臨床開発センター)・病理部・研究員

研究者番号：40446547