

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2008～2012

課題番号：20221009

研究課題名（和文）癌における転写制御変異の統合的解析

研究課題名（英文）Integrated analysis of transcriptional regulation in cancer

研究代表者

油谷 浩幸（ABURATANI HIROYUKI）

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：10202657

研究成果の概要（和文）： 網羅的なゲノム・エピゲノム解析技術を確立するとともに、癌細胞における転写制御の異常に関する統合的解析を行った。増殖、分化に関わる転写因子の標的分子の同定に加えて、ヒストン修飾、DNA メチル化、クロマチンアクセスなどエピゲノム修飾が分化や細胞老化プロセス、ウイルス感染においてダイナミックに変動することが明らかとなった。一方、肝細胞癌、膵癌をはじめとするがん細胞ゲノムに生じた体細胞変異を同定した。

研究成果の概要（英文）： With comprehensive genomic and epigenomic analysis, we investigated aberrant regulation of transcription in cancer cells. We identified the target genes directly driven by the transcription factors involved in cellular differentiation and growth, and revealed that epigenomic landscape is dynamically altered during cellular differentiation, oncogene-induced senescence and viral infection. Finally we reported somatic mutations in pancreatic cancer cell lines and hepatocellular carcinoma genome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	39,000,000	11,700,000	50,700,000
2009年度	36,200,000	10,860,000	47,060,000
2010年度	29,800,000	8,940,000	38,740,000
2011年度	32,200,000	9,660,000	41,860,000
2012年度	24,200,000	7,260,000	31,460,000
総 計	161,400,000	48,420,000	209,820,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ゲノム、エピゲノム、がん、転写制御、クロマチン

1. 研究開始当初の背景

多重な転写制御系を理解するためには、それぞれの転写因子およびその複合体のゲノム上での局在、クロマチン構造の変化、転写活性の多様性を測定し、転写応答にどのように反映されるかを解析する必要がある。一方、2006年のiPS細胞の発見によって、転写因子導入による体細胞から幹細胞へのリプログラミング現象が明らかとなったことから、細胞の癌化機構を考える上で、遺伝子変異の蓄積のみならず、クロマチンの変

化を考慮することが重要であると予想された。従来網羅的解析に用いられたゲノムタイリングアレイはデータの再現性及び解析コストの面でスループットが低く、エピゲノム標識を多数解析することは実質的に困難であった。研究提案を行った2007年はまさに次世代シーケンサー技術が利用可能になった時期であり、本技術による解析によって得られた網羅的クロマチン標識情報から転写制御機構を解明することを目的とする研究を計画した。

2. 研究の目的

癌細胞における増殖シグナルに関わる転写因子の標的遺伝子群の同定、発生・分化制御に関わるエピジェネティック制御の解析を通して、癌における転写制御変異の統合的解析を進める。さらにデータ産生と並行して新たなゲノム解析技術の積極的な導入、新規データ解析手法の開発を通して「Genetics」と「Genomics」の統合、すなわちヒトゲノムに存在する配列多様性と転写制御との関連の解明への展とを目指した。

(1) 染色体機能解析

①細胞増殖に関わる主要なシグナル系の転写因子について結合部位の同定を行う。

②ES 細胞や多能性細胞から終末分化した細胞への分化プロセスにおいて生じるエピゲノム修飾を明らかにすることによって、細胞の運命付けに関わる制御メカニズムを解明する。腫瘍を構成する細胞のなかには「癌幹細胞」と呼ばれる複製能、造腫瘍能の高い前駆細胞が少数存在するとされており、癌幹細胞集団を分子レベルで定義づけ、これらの細胞群を標的とする治療法開発へとつなげる。

③高次制御機構の解明：インスレータ蛋白 CTCF によるエピゲノム標識の区域化、染色体領域間の相互作用など高次構造による制御を解明するための技術開発をおこなう。

④ノンコーディング RNA を含む転写産物(トランスクリプトーム)の同定

(2) ゲノム多様性に基づく転写制御領域の同定

薬剤刺激や増殖刺激時における転写活性のアレル間の多様性に注目して2本の染色体間の機能の違いをもたらす責任制御領域を決定する。

(3) 転写制御ネットワークの統合解析

細胞が癌化するプロセスにおいて種々の遺伝子あるいはゲノム変異が蓄積し、転写ネットワークに破綻を生じる。多重の転写シグナルからの制御情報が遺伝子発現プロファイルに反映される。発癌に関わる主要なシグナル経路の転写因子の標的遺伝子群の同定、エピジェネティックな制御、遺伝子変異を統合解析することにより個々のパスウェイの活性化、クロストークの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) がんエピゲノム解析

MeDIP(メチル化 DNA 免疫沈降)および Infinium 法による DNA メチル化プロファイル解析を行った。ヒストン修飾および転写因子の局在については ChIP-seq 法により行った。

(2) クロマチン相互作用解析

ChIA-PET 法によるクロマチン相互作用の同定、FAIRE 解析 (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory

Elements)による chromatin accessibility の同定手法を確立した。

(3) 細胞分化に伴うエピゲノム標識の変化

幹細胞から成人細胞への分化時の DNA メチル化の変動を Infinium 解析および、質量分析、全ゲノム Bisulfite seq によって行った。3T3-L1 細胞から脂肪細胞、P19CL6 細胞から心筋細胞への分化系を用いてヒストン修飾の変化、chromatin accessibility の変化を解析した。

(4) 癌の統合ゲノム解析

膀胱癌細胞株、肝細胞癌腫瘍検体において遺伝子変異、トランスクリプトーム、コピー数、メチル化情報を収集し、統合解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 膀胱癌15例の全exomeによる変異解析ではKRAS(100%)、SMAD4(60%)、TP53

(80%)、p16(67%)の4遺伝子の変異に加えて、ミスマッチ修復遺伝子MLH1の片側アレルの欠失によりindel変異頻度の上昇が認められ、haploinsufficiencyをもたらすと考えられる。同様の影響は腎細胞癌でも確認された。(Genome Research 2012)

(2) chromatin accessibilityを反映するFAIRE解析 (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements)によりオープンクロマチン領域に高頻度に認められた配列モチーフから、脂肪細胞分化を制御する転写因子として新たにNF1を同定した。(PLoS genetics 2011)

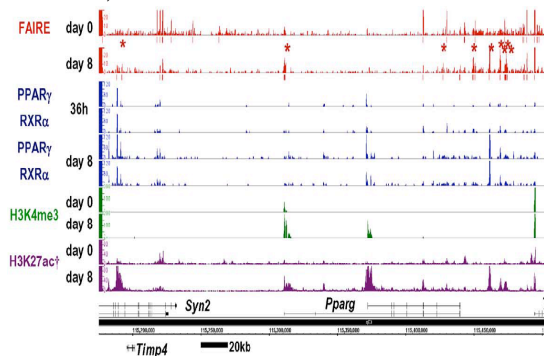


図 PPARG 遺伝子座のクロマチン標識の変動

(3) TP53、 β -catenin、smad2/3 (Koinuma 2009) および smad4 (Mizutani 2011)、smad1/5 (Morikawa 2011)、HNF4 α (Daigo 2011)、HIF1 α (Mimura 2012)、AR (Takayama 2009&2011)、STAT6 (Tozawa 2011)、COUP-TFII (Okamura PNAS 2009)、GATA2 (Kanki 2011) など増殖、分化に関わる転写因子の標的領域を ChIP-seq 法により同定した。新たな癌抑制遺伝子となる p53 標的分子として PHLDA3

を同定した(Kawase Cell 2009)。

- (4) EBウイルス胃癌ではDNAメチル化が高度に生じており、胃癌細胞株へのEBV感染によってゲノム全体にDNAメチル化が誘導されることを示した。DNAメチル化誘導機構を解明する上でも貴重な実験系と考えられた。(Cancer Res 2011)
- (5) Ras誘導性細胞老化時におけるエピゲノム解析により、K27me3消失により発現上昇する分泌蛋白遺伝子Bmp2、新たにH3K27me3を獲得し発現低下する遺伝子としてBmp2-Smad1シグナルの阻害因子であるNogとSmad6を同定した。Smad1のChIP-seq解析からSmad6は直接標的であることが判明し、Smad6によるネガティブフィードバックループの破綻が細胞老化の一因と認められた。(PLoS genetics 2011)
- (6) 16種類のヒト成人及び胎児組織、多能性幹細胞DNAについて約27,000箇所のCpGサイトのメチル化を調べたところ、GC含量の低いプロモーター領域は非CpGのメチル化も含めてES細胞では高メチル化状態にあり、iPS細胞では再び高メチル化レベルにリプログラムされていた。低CpGプロモーターは組織特異的な発現を示す遺伝子に多く、分化に伴い低メチル化がプロモーター領域から次第に拡大することが認められた。(Hum Mol Genet 2011)

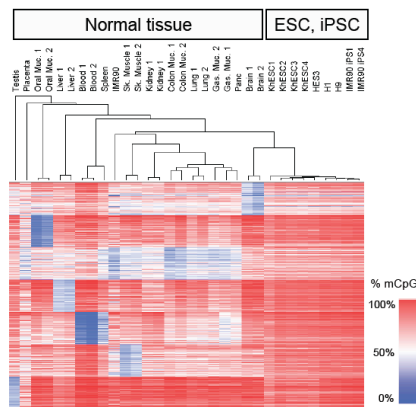


図 組織特異的DNA脱メチル化

- (7) 悪性膠芽腫のゲノムコピー数解析により同定した染色体13q21のホモ欠失領域に含まれる遺伝子DACHIが、脳腫瘍細胞の増殖を低下させ、皮下及び脳室内での腫瘍形成を抑制することを示し、DACHIが膠芽腫の腫瘍抑制遺伝子であることを示した。(PNAS 2011)
- (8) 肝細胞癌のコピー数解析により、早期肝癌ではコピー数変化が乏しく、進展に伴い染色体異常が蓄積することが判明した。8p23に位置するCSMD1遺伝子のホモ欠失を同定した(Midorikawa 2009)。肝細胞癌の全ゲノ

ム解析を行うべく、がんゲノム解析のパイプラインを構築して塩基置換や構造変異を検出した(Totoki 2011)。

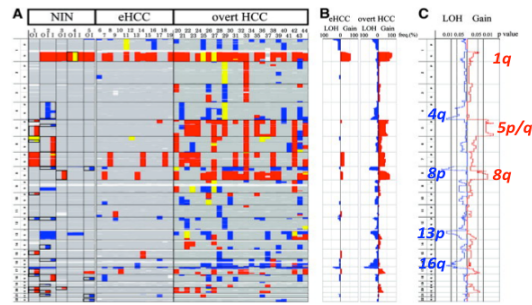


図 肝細胞癌のアレル別コピー数解析

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 47 件)

- ① Midorikawa Y, Tsuji S, Takayama T, Aburatani H. Genomic approach towards personalized anticancer drug therapy. Pharmacogenomics. 13(2):191-9. 2012 doi:10.2217/pgs.11.157.
- ② Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. Genome Research 22(2):208-19. 2012 doi: 10.1101/gr.123109.111.
- ③ Yagi K, Takahashi H, Akagi K, Matsusaka K, Seto Y, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. Intermediate methylation epigenotype and its correlation to KRAS mutation in conventional colorectal adenoma. Am J Pathology 180(2):616-25. 2012 doi: 10.1016/j.ajpath.2011.10.010.
- ④ Matsuura K, Jigami T, Taniue K, Morishita Y, Adachi S, Senda T, Nonaka A, Aburatani H, Nakamura T, Akiyama T. Identification of a link between Wnt/β-catenin signalling and the cell fusion pathway. Nat Commun. 2:548. 2011 doi: 10.1038/ncomms1551.
- ⑤ Tsuji S, Midorikawa Y, Takahashi T, Yagi K, Takayama T, Yoshida K, Sugiyama Y, Aburatani H. Potential responders to

- FOLFOX therapy for colorectal cancer by Random Forests analysis. *Br J Cancer*. 106(1):126–32. 2012
doi: 10.1038/bjc.2011.505.
- ⑥ Kaneda A, Fujita T, Anai M, Yamamoto S, Nagae G, Morikawa M, Tsuji S, Oshima M, Miyazono K, Aburatani H. Activation of Bmp2-Smad1 signal and its regulation by coordinated alteration of H3K27 trimethylation in Ras-induced senescence. *PLoS Genetics* 7(11):e1002359. 2011
doi: 10.1371/journal.pgen.1002359.
 - ⑦ Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, Wakabayashi K, Yu J, Hirose-Yotsuya L, Take K, Sun W, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Fujita T, Aoyama T, Tsutsumi S, Ueki K, Kodama T, Sakai J, Aburatani H, Kadowaki T. Global Mapping of Cell-Type-Specific Open Chromatin by FAIRE-seq Reveals the Regulatory Role of the NFI Family in Adipocyte Differentiation. *PLoS Genetics* 7(10):e1002311. 2011
doi: 10.1371/journal.pgen.1002311.
 - ⑧ Isagawa T, Nagae G, Shiraki N, Fujita T, Sato N, Ishikawa S, Kume S, Aburatani H. DNA Methylation Profiling of Embryonic Stem Cell Differentiation into the Three Germ Layers. *PLoS ONE* 6(10): e26052. 2011 doi: 10.1371/journal.pone.0026052.
 - ⑨ Matsusaka K, Kaneda A, Nagae G, Ushiku T, Kikuchi Y, Hino R, Uozaki H, Seto Y, Takada K, Aburatani H, Fukayama M. Classification of Epstein-Barr virus positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. *Cancer Res*. 71(23):7187–97. 2011
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1349.
 - ⑩ Morikawa M, Koinuma D, Tsutsumi S, Vasilaki E, Kanki Y, Heldin CH, Aburatani H, Miyazono K. ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. *Nucleic Acids Res*. 39(20):8712–27. 2011 doi: 10.1093/nar/gkr572.
 - ⑪ Watanabe A, Ogiwara H, Ehata S, Mukasa A, Ishikawa S, Maeda D, Ueki K, Ino Y, Todo T, Yamada Y, Fukayama M, Saito N, Miyazono K, Aburatani H. Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(30):12384–9. 2011
doi: 10.1073/pnas.0906930108.
 - ⑫ Kanki Y, Kohro T, Jiang S, Tsutsumi S, Mimura I, Suehiro JI, Wada Y, Ohta Y, Ihara S, Iwanari H, Naito M, Hamakubo T, Aburatani H, Kodama T, Minami T. Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression. *EMBO J*. 30(13):2582–95. 2011
doi: 10.1038/emboj.2011.173.
 - ⑬ Mizutani A, Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, Imamura T, Miyazono K, Aburatani H. Cell-type specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 and hepatocyte nuclear factor 4{alpha} in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 286(34):29848–60. 2011
doi: 10.1074/jbc.M110.217745.
 - ⑭ Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, Ishikawa S, Tsutsumi S, Sonoda K, Totsuka H, Shirakihara T, Sakamoto H, Wang L, Ojima H, Shimada K, Kosuge T, Okusaka T, Kato K, Kusuda J, Yoshida T, Aburatani H & Shibata T. High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet*. 43(5):464–9. 2011
doi: 10.1038/ng.804.
 - ⑮ Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Nonaka A, Yoshida S, Matsusaka K, Midorikawa Y, Ishikawa S, Soejima H, Fukayama M, Suemori H, Nakatsuji N, Kume S, Aburatani H. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. *Hum Mol Genetics* 20(14):2710–21. 2011
doi: 10.1093/hmg/ddr170.
 - ⑯ International Cancer Genome Consortium. International network of cancer genome projects. *Nature*. 464(7291):993–8. 2010
doi: 10.1038/nature08987.
 - ⑰ Murayama-Hosokawa S, Oda K, Nakagawa S, Ishikawa S, Yamamoto S, Shoji K, Ikeda Y, Uehara Y, Fukayama M, McCormick F, Yano T, Taketani Y, Aburatani H. Genome-wide single nucleotide polymorphism arrays in endometrial carcinomas associate extensive chromosomal instability with poor prognosis and unveil frequent chromosomal imbalances involved in PI3-kinase pathway. *Oncogene* 29(13):1897–908. 2010
doi: 10.1038/onc.2009.474.
 - ⑱ Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura N, Inazawa J, Ohta T, Ichikawa H, Aburatani H, Tashiro F, Taya Y. PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt.

- Cell. 136(3):535-50. 2009.
doi: 10.1016/j.cell.2008.12.002.
- ⑮ Midorikawa Y, Yamamoto S, Tsuji S, Kamimura N, Ishikawa S, Igarashi H, Makuuchi M, Kokudo N, Sugimura H, Aburatani H. Allelic imbalances and homozygous deletion on 8p23.2 for stepwise progression of hepatocarcinogenesis. Hepatology. 49(2):513-22. 2009.
doi: 10.1002/hep.22698.
- ⑯ Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Taniguchi H, Miyazawa K, Sunamura M, Imamura T, Miyazono K, Aburatani H. ChIP-chip analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in TGF- β signaling. Mol Cell Biol. 29(1):172-86. 2009
doi: 10.1128/MCB.01038-08.
- 21 Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, Shibuya M, Akira S, Aburatani H, Maru Y. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. Nat Cell Biol. 10(11):1349-55. 2008
doi: 10.1038/ncb1794.

〔学会発表〕（計 44 件）

- ① 油谷浩幸 Cancer Genomics to Drug discovery. Next Generation Sequencing Applications Asia 3/28/2012 Singapore
- ② 油谷浩幸 Methylation dynamics in cancer. The 15th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference 2/23/2012 Bethesda
- ③ 油谷浩幸 Cancer genomics and epigenomics. International Scientific Coordination Network 11/24/2011 モンペリエ
- ④ 油谷浩幸 Genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency in pancreatic cancer. US-Japan Cancer Genomics and Epigenomics Workshop 10/24/2011 京都
- ⑤ 油谷浩幸 Current Challenges & New Technologies. 5th ICGC Scientific Workshop 7/10/2011 京都
- ⑥ 油谷浩幸 Next generation genomic analysis of hepatocellular carcinoma. International Symposium on Application of NGS on Genomics and Epigenomics 6/27/2011 台北
- ⑦ 油谷浩幸 Integrated genomic analysis of liver cancer. 3rd JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances

- in Liver Cancer Research 2011.3.2 舞浜
- ⑧ 油谷浩幸 Epigenomic analysis of liver cancer. 41th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund: Basic and Clinical Frontiers of cancer epigenetics. 2010.11.18 東京
- ⑨ 油谷浩幸 Genome-wide Profiling of Cell Type-Specific Chromatin Regulatory Elements in Adipocyte differentiation. The 5th Asian Epigenomics Meeting 2010.6.21 Jeju, Korea
- ⑩ 油谷浩幸 Genomic and epigenomic alterations in liver cancer. Cold Spring Harbor Asia meeting James Watson symposium on Cancer 2010.4.8 Suzhou, China
- ⑪ 油谷浩幸 Epigenetic dynamics 2009 International Conference on Genomics -Human and Beyond 2009.11.4 Shenzhen, China
- ⑫ 油谷浩幸 Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations in cancer.8th International Workshop on Advanced Genomics 2009.6.18 Tokyo
- ⑬ 油谷浩幸 Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations in liver cancer. Gordon Research Conference: Cancer Genetics & Epigenetics 1.30.2009 Ventura, CA USA
- ⑭ 油谷浩幸 Regulatory genomics: Epigenomic regulation of p53 pathway. Northeastern Asian Symposium on Cancer Epigenetics.11.7.2009 Jeju, Korea
- ⑮ 油谷浩幸 Epigenomic profiling: Global DNA methylation profiles in differentiation from ES cells. 7th Human Genome Organization (HUGO)-Pacific meeting 4.2.2008 Cebu, Phillipine

〔産業財産権〕

○出願状況（計 9 件）

名称：大腸癌を分離、層別化するためのDNAメチル化マーカー
発明者：八木浩一、金田篤志、油谷浩幸 特願 2009
権利者：東京大学ほか
種類：特許
番号：
出願年月日：2009.7.3
国内外の別：海外出願あり

○取得状況（計４件）

①名称：発現量多様性を有する遺伝子の同定法

発明者：油谷浩幸、石川俊平

権利者：東京大学ほか

種類：特許

番号：第 4111985 号

取得年月日：2008.4.18

国内外の別：海外出願あり

②名称：膵癌の診断薬および治療薬

発明者：油谷浩幸、岩成宏子、河野功

権利者：東京大学ほか

種類：特許

番号：5090342

取得年月日：2012.9.21

国内外の別：海外出願あり

③名称：腎癌の診断薬および治療薬

発明者：油谷浩幸、深山正久、森川鉄平、河野功、杉山暁

権利者：東京大学ほか

種類：特許

番号：5115921 号

取得年月日：2012.10.26

国内外の別：海外出願あり

④名称：抗ROBO1抗体を含むPET用腫瘍診断剤

発明者：岩成宏子、油谷浩幸、浜窪隆雄、河野功、熊倉嘉貴、伊藤浩孝、先浜俊子、百瀬敏光

権利者：東京大学ほか

種類：特許

番号：5117765 号

取得年月日：2012.10.26

国内外の別：海外出願あり

〔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

油谷 浩幸 (ABURATANI HIROYUKI)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：10202657

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

石川 俊平 (ISHIKAWA SHUMPEI)

東京大学・医学部・准教授

研究者番号：50418638

堤 修一 (TSUTSUMI SHUICHI)

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：30345152