

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2009

課題番号：20590325

研究課題名（和文）がんの発生・進展に関与する DNA メチル化・ヒストンメチル化修飾の解析

研究課題名（英文）Analyses of DNA methylation and histone methylation changes in human malignancies

研究代表者

近藤 豊（KONDO YUTAKA）

愛知県がんセンター（研究所）・分子腫瘍学部・室長

研究者番号：00419897

研究成果の概要（和文）：がん細胞で遺伝子の発現制御に関わるヒストンメチル化と DNA メチル化異常の解析を行った。胸部悪性腫瘍のうち、エピジェネティクス解析の報告がこれまでほとんどない悪性胸膜中皮腫を中心に解析し、がん関連遺伝子は、DNA メチル化とヒストン修飾がそれぞれの標的遺伝子を介してがんの悪性度に関与しており、両者を治療標的とすることで、より有効ながん治療に結びつく可能性を示した。さらに臓器特異的に DNA メチル化異常を示す遺伝子を見出しがんの診断への有用性を示した。

研究成果の概要（英文）：In the current study, to clarify the contribution of epigenetic abnormalities to the human tumorigenesis, we conducted high-throughput analysis of DNA methylation, lysine 27 trimethylation and genetic alterations in human malignancies. Using malignant mesothelioma as a model, we demonstrated a characteristic epigenetic profile of human mesothelioma and uncover multiple distinct epigenetic abnormalities that lead to the silencing of tumor-suppressor genes in mesothelioma and could serve as diagnostic or prognostic targets.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学、エピジェネティクス、遺伝子制御機構

1. 研究開始当初の背景

発がん過程においてエピジェネティクス機構の破綻が重要な役割を演じていることが明らかになりつつある。これまでにエピジ

エネティックなメカニズムのうち、DNA メチル化の異常が複数の遺伝子で報告され、発がんおよびがんの悪性化と密接に関与することが明らかとなった。さらに DNA メチル化に

加えてヒストン修飾やクロマチン再構築因子の異常が、がん細胞で確認され、これらの因子の相互関連が徐々に明らかにされつつある。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤やDNA脱メチル化剤などのエピジェネティクス異常の正常化を目指した治療が一部の腫瘍に対して有効な効果をあげていることを鑑みると、がん細胞におけるエピジェネティクス機構の解明は、エピジェネティクスを標的とする治療法の開発・確立、さらには個別化医療の実践の点から考えて重要な課題であると考えられる。

我々はこれまで、がん細胞においてDNAメチル化異常や、ヒストン修飾変化が遺伝子発現制御異常を介して発がん過程に与える影響を継続して研究してきた。その過程で、エピジェネティクス標的遺伝子の網羅的解析を行ない、①HP1タンパクによって認識されるヒストンH3リジン9-ジメチル化(H3K9-me2)は、DNAメチル化と協調して遺伝子発現抑制に関与する。②ポリコームタンパクによって認識されるヒストンH3リジン27-トリメチル化(H3K27me3)はDNAメチル化に非依存的に遺伝子発現抑制に関与する。また一部のH3K27-me3標的遺伝子はDNAメチル化の標的と重なっており、2つの経路には何らかの関連が示唆される。ことを見出した。

本研究ではこれまでの結果を発展させ、がん細胞、特に悪性胸膜中皮腫(中皮腫)におけるエピジェネティクス制御機構の意義に関して研究を行った。

2. 研究の目的

中皮腫は、アスベスト曝露と関連のある侵襲度の高い腫瘍である。アスベストの吸入は、周知の危険因子であり、中皮腫の早期診断が望まれるが、早期のステージでの臨床症状や有効な診断マーカーに乏しいことが早期診断を困難にしている。また、中皮腫は、時に病理学的に肺腺がんとの区別が問題となる。こうした問題に加え有効な治療がまだ存在しないために、治療にも拘らず、多くの患者が、診断から2年以内に死亡している。したがって、精確な早期診断に有効なマーカーを同定するために、中皮腫のさらなる分子機構の解析が必要とされている。

本研究では、中皮腫細胞における個々のエピジェネティクス機構の破綻を俯瞰し、発がん過程における個々のエピジェネティクス異常の役割を解明することを目的とする。さらに、エピジェネティクスを標的とする治療法の開発、さらには診断を含めた個別化医療にむけて、以下研究を行う。

(1) 中皮腫細胞におけるジェネティック、エピジェネティック異常が中皮腫の病態に与える影響について。

(2) エピジェネティクス修飾の違いによる遺伝子発現制御への影響。

(3) DNAメチル化標的遺伝子を用いたがん診断への応用。

3. 研究の方法

(1) 中皮腫20症例、肺腺がん20症例においてMethylated CpG island Amplification-microarray法(MCAM法)を用いて、6,157遺伝子のDNAメチル化標的遺伝子を網羅的に解析した。さらに中皮腫特異的にメチル化した3遺伝子について、Methylation-specific PCR(MSP法)を用いて感度・特異度の解析を行った。さらに中皮腫細胞株MESO1とMESO8を用いて、H3K27me3の標的遺伝子の解析をクロマチン免疫沈降-マイクロアレイ法(ChIP-chip法)を行った。遺伝子異常についてはアレイCGHを用いて解析した。

(2) 網羅的解析から得られた遺伝子について、エピジェネティクス修飾の違いによる、脱メチル化剤(5-aza-2'-deoxycytidine 2μM, 5μM)、ヒストン脱アセチル化阻害剤(HDACi, TSA 300nM)への反応の違いを解析した。

(3) 網羅的解析から得られたDNAメチル化標的遺伝子のうち、中皮腫と肺がんのメチル化プロファイルを比較することで、中皮腫特異的にメチル化し診断に有用な遺伝子マーカーの同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 中皮腫20症例、肺腺がん20症例においてMCAM法を用いてメチル化の網羅的解析を行い、メチル化プロファイルによるクラスター解析を行った(図1)。

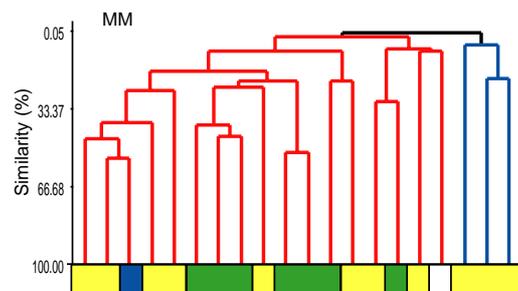


図1 中皮腫症例のメチル化プロファイルによるクラスター解析

中皮腫は2つの大きなクラスターに分かれ、組織型を合わせて検討すると(上皮型(黄)二相型(緑)肉腫型(青)そのほか(白))一つのクラスターは上皮型のみで形成されていた。これらの症例はメチル化遺伝子数の少ない症例であり、比較的予後の良い傾向が見られた。

中皮腫でメチル化のターゲットとなっていた445遺伝子を用いて検討すると、中皮腫はメチル化高頻度群(High Me、平均295遺伝子)、低頻度群(Low Me、平均105遺伝子)の

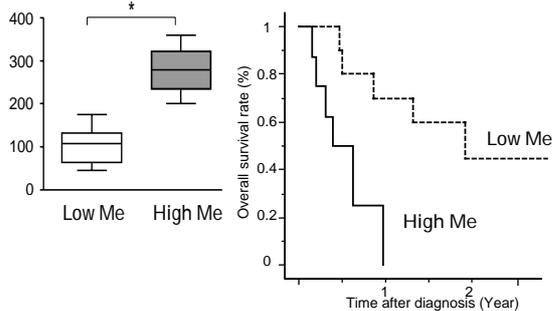


図2 DNAメチル化頻度と生存曲線

2群に分けることが可能であった(図2)。高頻度メチル化群(High Me)は低頻度群(Low Me)に比べて予後不良であった(図2 $P < 0.01$)。

中皮腫細胞株のエピジェネティクスな異常と遺伝子異常について合わせて検討するためにアレイ CGH、DNAメチル化、H3K27me3の結果を組み合わせて解析した。エピジェネティクス異常は遺伝子異常よりも高頻度に認められた。さらに約11%の遺伝子はエピジェネティクス異常と遺伝子異常の両者の異常を持つことが明らかとなった(図3)。

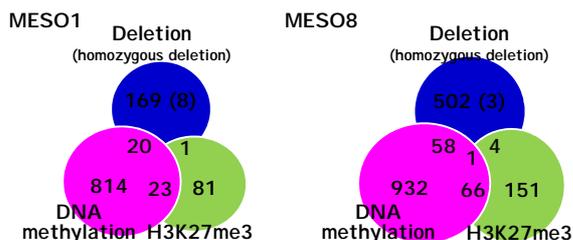


図3 中皮腫細胞株におけるDNAメチル化、H3K27me3、遺伝子異常の関係

(2) MCAM解析で中皮腫のメチル化のターゲットとなっていた遺伝子の発現状態を中皮腫細胞株において検討した(図4)。ANK1、PGR、PENKは二つの中皮腫細胞株(MESO1、MESO8)でもDNAメチル化のターゲットになっており、遺伝子発現は認められなかった。これらの細胞を脱メチル化剤2 μ M、5 μ M(D2、D5)とHDACiで処理した後にそれぞれの遺伝子発現を検討した。ANK1は脱メチル化剤のみで遺伝子発現が回復し、プロモーター領域ではDNAメチル化のみを認めた。MESO8細胞ではPGRとPENKはHDACi処理後に発現が回復し、DNAメチル化のみではなく、H3K27me3が認められ、二つのエピジェネティクス異常によって遺伝子の発現が抑制されることが明らかになった。このように中皮腫で遺伝子によってエピジェネティクス制御機構が異なると、エピジェネティクス治療薬への反応性が異なることが見出された。

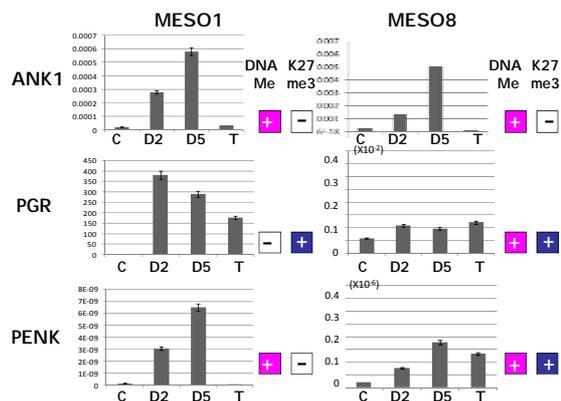


図4 ANK1、PGR、PENK遺伝子におけるエピジェネティクスによる遺伝子抑制

(3) MCAMの結果から中皮腫特異的にメチル化している3遺伝子(TMEM30B、KAZALD1、MAPK13)を選びだし、これらの遺伝子のメチル化をMSP法で中皮腫50例、肺腺がん56例において検討した(図5)。3遺伝子のうち1遺伝子以上メチル化している症例は中皮腫で36例であったが、肺腺がんでは存在せず、中皮腫特異的なメチル化を証明することができた(感度72%、特異度100%)。これらの遺伝子は中皮腫と肺腺がんの鑑別診断に有用なマーカーとしての可能性が示唆された。

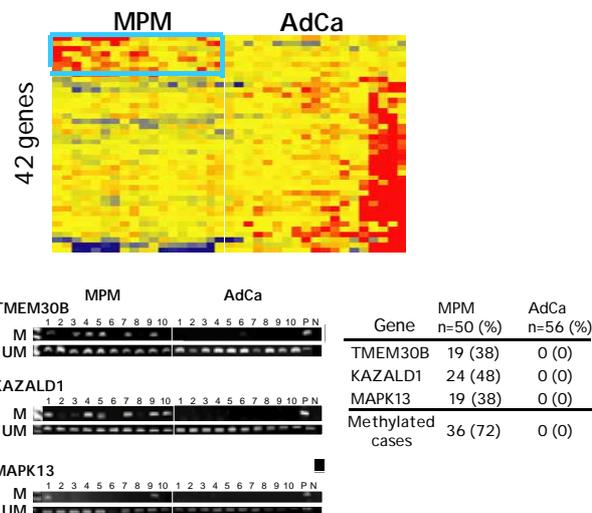


図5 中皮腫特異的DNAメチル化マーカーの同定

(4) 考察

中皮腫はアスベストの暴露後年月を経て発症する疾患であるが、極めて予後が悪い。本研究では、中皮腫のエピジェネティクス異常のうちDNAメチル化とH3K27me3の異常および、遺伝子異常との関連を検討した。遺伝子異常に比して、エピジェネティクス異常の蓄積は高頻度に中皮腫細胞株で認められ、発がん過程へのエピジェネティクス異常の蓄積の寄与が示唆された。またエピジェネティクス異常のうちDNAメチル化とH3K27me3で制

御される遺伝子は異なり、エピジェネティクス治療薬への反応性も違ってくることを見出した。最近中皮腫症へのHDACiの投与報告があるが、有効性が乏しいようである。本研究から中皮腫に関わるエピジェネティクス異常は、少なくともDNAメチル化とHeK27me3が関わっており、HDACiに加えた脱メチル化剤の投与が今後中皮腫の治療として必要と考えられる。また本研究で中皮腫および肺腺がんにおいてDNAメチル化の網羅的解析を行い、両疾患におけるDNAメチル化の関与につき検討した。DNAメチル化プロファイリングから、両疾患で一致する遺伝子が多数存在するものの、各疾患に特異的なDNAメチル化プロファイリングを示すことを見出した。DNAメチル化により異なる経路の不活化が、両疾患の腫瘍形成過程に関与していると考えた。また中皮腫特異的にメチル化する遺伝子を同定しており、今後、血清や胸水を用いた診断マーカーとしての応用が期待できると考えた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① An B, Kondo Y, (他18名、2番目、責任著者). A characteristic methylation profile in CpG island methylator phenotype-negative distal colorectal cancers. *Int J Cancer*, 査読有, (in press).
- ② Shen L, Kantarjian H, Kondo Y (他13名、11番目). DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.*, 査読有, 2010, Vol. 28, No. 4, pp605-13.
- ③ Goto Y, Shinjo K, Kondo Y (他19名、3番目、責任著者). Epigenetic profiles distinguish malignant pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 査読有, 2009, Vol. 69, No. 23, pp9073-82.
- ④ Ohno M, Natsume A, Kondo Y (他6名、3番目). *Mol Cancer Res.*, 査読有, 2009, Vol. 7, No. 12, pp2022-30
- ⑤ Yuki K, Natsume A, Yokoyama H, Kondo Y (他6名、4番目), Ohno M, Kato T, Chansakul P, Ito M, Kim S, Wakabayashi T. Induction of oligodendrogenesis in glioblastoma-initiating cells by IFN-mediated activation of STAT3 signaling. *Cancer Lett.*, 査読有, 2009, Vol. 284, No. 1, pp71-9.

[学会発表] (計6件)

- ① 近藤 豊 「Microarray-based approaches

to cancer epigenetics」 ChiP-chip法をはじめとした網羅的エピジェネティクス解析法のがん研究への応用. 第68回日本癌学会学術総会. 10月3日2009年. モーニングレクチャー、横浜

- ② 近藤 豊 「消化器癌におけるエピジェネティクス」 がん細胞を制御するDNAメチル化とヒストン修飾の網羅的解析. 第17回日本消化器関連学会. 10月15日2009年. 基調講演、京都

- ③ Kondo Y 「Cancer Epigenetics」 Role of histone methylation in human cancers. Northeastern Asian Symposium on Cancer Epigenetics. 11月5日2008. Symposium. Jeju, Korea

- ④ Kondo Y 「At the Front of Epigenetic Research」 Cross-talk of DNA methylation and histone methylation in human cancers. Avison Biomedical Symposium. 1月17日2009. Symposium. Seoul, Korea

- ⑤ Kondo Y 「DNA Methylation & Chromatin Remodeling in Cancer」 Role of DNA methylation and histone modifications in human neoplasia. The 18th CRI Cancer Symposium. 6月5日2009. Symposium. Seoul, Korea

- ⑥ Kondo Y 「Epigenetics in Development and Disease Conference」 Role of histone H3 lysine 27 tri-methylation in human brain tumor-propagating cells. The 4th Asian Epigenomics Meeting. 8月25日2009. Symposium. Singapore

[図書] (計2件)

- ① Suzuki H, Toyota M, Kondo Y, Shinomura Y. Humana Press, Methods in Molecular Medicine, Inflammation-related aberrant patterns of DNA methylation: detection and role in epigenetic deregulation of cancer cell transcriptome. 2009, 55-69.

- ② Kondo Y. Springer, Encyclopedia in Cancer, Chromatin Remodeling, 2009, 4頁. 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 悪性中皮腫の検出のための方法及びキット

発明者: 近藤 豊、関戸好孝

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2009-136624

出願年月日: 2009年6月5日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

[http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/
400/420/421/421-03.html#02](http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/400/420/421/421-03.html#02)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 豊 (KONDO YUTAKA)

愛知県がんセンター (研究所)・分子腫瘍
学部・室長

研究者番号：00419897

(2) 研究協力者

安 炳九

愛知県がんセンター (研究所)・分子腫瘍
学部・リサーチレジデント

新城恵子

愛知県がんセンター (研究所)・分子腫瘍
学部・連携大学院生