

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09646

研究課題名（和文）卵巣漿液性癌におけるDNA脱メチル化産物5hmCと転移に関する研究

研究課題名（英文）5-hydroxymethylcytosine and clinicopathological features in ovarian serous carcinoma

研究代表者

小野山 一郎 (Onoyama, Ichiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00444802

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：癌におけるエピジェネティクス研究はDNAメチル化とヒストン修飾を中心に大いに発展してきた。しかしながらDNA脱メチル化に関してはまだまだ解明されていないことが多い。そこで本研究ではDNA脱メチル化過程の中間産物である5ヒドロキシメチルシトシン（5hmC）と癌に着目して研究を進めた。本研究ではまず、卵巣漿液性癌のリンパ節転移陽性症例で5hmCレベルが高いことを見出した。次に転移のある症例ではゲノム上のどの領域で5hmCレベルに変化を来しているのかを次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、癌の進展に関わる遺伝子群の近傍で、5hmCレベルが高くなっていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

5hmCとがんの関係について着目した研究はこれまでにいくつかあるが、ほとんどの場合、臨床検体を用いた免疫染色で「がん細胞における5hmCレベルは低い」と結論づけているものであり、詳細な検討はなされていない。今回、5hmCレベルとがんの進展・転移との関係の一端を明らかにすることができ、この研究を発展させることは全く新しい視点でがんを捉える研究に繋がると期待される。また、ゲノムにおける5hmCのdistributionの変化と臨床的特徴との関連を明らかにすることができれば、将来的にがんの診断・治療に応用できる研究となり、基礎研究、臨床研究の両面で価値が高くなる。

研究成果の概要（英文）：This project revealed that ovarian cancer cells showed higher levels of 5hmC compared with epithelial cells of normal ovary and fallopian tube. Notably, high-grade serous carcinomas (HGSCs) with lymph-node (LN) metastasis showed significantly higher levels of 5hmC compared with those without LN metastasis. Genome-wide 5hmC sequencing showed 5hmCs were adjacent to various oncogenes in HGSC cases regardless of LN metastasis, however, comparative gene ontology analysis revealed some characteristic pathways specific to HGSCs with LN metastasis. These data indicated that epigenetic changes of 5hmC levels and their distributions could be implicated in LN metastasis in ovarian HGSCs.

研究分野：エピジェネティクス、婦人科腫瘍

キーワード：DNA脱メチル化 5hmC 卵巣癌

### 1. 研究開始当初の背景

がん研究におけるエピジェネティクスは、DNA メチル化とヒストン修飾を中心に大きく発展してきた。このうち DNA メチル化に関しては、一般的にがん抑制遺伝子のプロモーター領域がメチル化されるとその遺伝子の発現が抑制され、がんの発生・進展に寄与することが広く知られている。

ところが、がん細胞は正常細胞に比べてゲノムワイドには低メチル化状態（脱メチル化状態）にあることに関してはあまり研究が進んでいない。この現象自体は 1983 年に報告され、その後も同様の報告がなされたものの、がん細胞のゲノムが低メチル化状態に至る機構、生理学的意義については未だ十分に解明されていない。しかし近年、DNA 脱メチル化酵素として TET ファミリータンパク質が同定され、DNA 脱メチル化に関する研究も初期胚の発生を中心としてがん研究の分野でも発展してきている。DNA 脱メチル化の過程は、まず TET タンパク質によってメチルシトシン (5mC) が 5 ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) にヒドロキシル化され、その後に base excision repair (BER) でシトシンに置き換わる(図 1)。

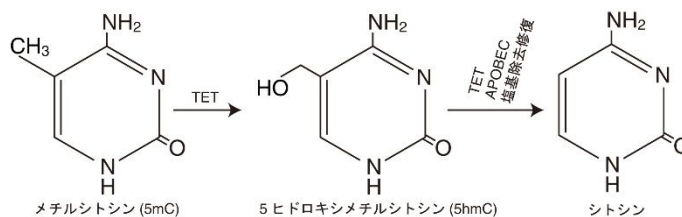


図 1 DNA 脱メチル化

DNA 脱メチル化には、まず TET タンパク質によってメチルシトシンが 5 ヒドロキシメチルシトシンにヒドロキシル化される必要がある。その後は TET タンパク質や APOBEC タンパク質、塩基除去修復によって脱メチル化が完了する。

### 2. 研究の目的

本研究ではがん細胞における 5hmC レベルに着目している。それは、個々のがんで 5hmC レベルに違いがあり、それが臨床的特徴と相関するのであれば、「メチル化 DNA の代謝制御機構の違いが腫瘍の組織型や生物学的性質の差に関与している」という仮説を立てることができるからである。また、単に 5hmC レベルの違いに着目するだけでなく、がん細胞においてゲノム上のどのような領域で 5hmC レベルの違いがあるかを調べることで、これまでの手法では捉えられないようなエピジェネティクスの変化を捕捉できることに繋がる可能性がある。

### 3. 研究の方法

具体的な研究の進め方として、卵巣漿液性癌における 5hmC レベルの解析、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドな 5hmC シークエンス、シーケンズ結果の検証、解析・解釈、以上 3 つのステップで解析を行った。

予備実験の結果では、転移を伴う卵巣漿液性癌において 5hmC レベルが上昇していた。そのため、卵巣漿液性癌のサンプルを用いて、5hmC レベルを免疫組織化学染色、ELISA を用いて測定した。また腫瘍部から DNA を抽出後、DNA を超音波破碎装置で断片化し、抗 5hmC 抗体を用いて 5hmC が含まれる DNA 断片を濃縮・回収し、これをもとにシーケンズ用のライブラリーを作製した。シーケンズの結果はバイオインフォマティクスと議論を重ねて解析方法を最適化した。

### 4. 研究成果

#### (1) 卵巣漿液性癌における 5hmC の解析

これまでがん細胞における 5hmC レベルは正常細胞に比べると低いといくつか報告されているが、定量的な解析を含む詳しい解析はなされていない。そこでまずわれわれは、卵巣癌における 5hmC を詳しく調べてみた。すると、癌の中にも 5hmC レベルが非常に高いものや既報通り低いものが存在することを見出した(図 2)。

さらに詳細に解析を進め、卵巣漿液性癌において、リンパ節転移のある症例とない症例とを比べると、リンパ節転移のある症例では 5hmC レベルが高くなっていることを免疫組織化学染色、ELISA の結果が

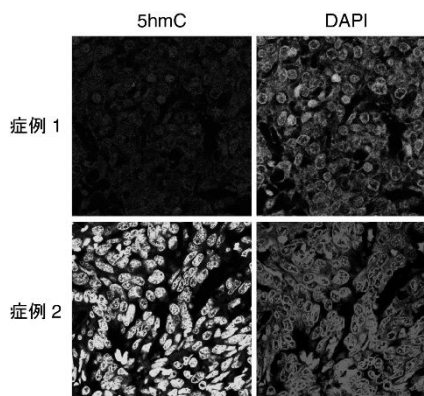


図 2 卵巣癌における 5hmC 免疫染色

症例 1 ではこれまでの報告の通り 5hmC レベルが低くシグナルが見えないが、症例 2 の核では、5hmC レベルが高い。

ら明らかにした。また、次世代シーケンサーを用いて 5hmC のゲノムワイドな解析を行うと、リンパ節転移のあるなしに関わらず、5hmC はがんに関連する遺伝子群の近傍に多く存在していたが、転移のある症例とない症例とを比べると、転移のある症例でよりがん関連遺伝子群に 5hmC が多く存在していることを明らかにした。これらの結果は大変示唆に富むものであり、今後このテーマの研究発展が大いに期待される。

#### (2)子宮頸部異形成における 5hmC の解析

子宮頸部異形成における 5hmC レベルを免疫組織化学染色で調べたところ、異形成が軽度、中等度、高度の順で 5hmC レベルは低下することを明らかにした。一般的に正常細胞とがん化した細胞とを比べると 5hmC レベルは低下するといわれており、この結果は予想されたものではあるが、子宮頸部上皮が癌化する過程において、5hmC レベルを調べた最初の報告となっており、また既存の報告と同じ結果が得られたことで、われわれの実験方法がうまく機能していることの傍証ともなった。

#### (3)難治性乳がんの原因となる腫瘍内多様性発生のメカニズムを解明

次世代シーケンサーのデータ解析のノウハウを用いて、がん抑制遺伝子 Fbxw7 の欠損が乳がん発生の原因となり、さらには治療抵抗性の要因となる腫瘍内におけるがん細胞の多様性の原因となっていることを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Izumi, Yoshida Sachiko, Tabu Kouichi, Kusunoki Soshi, Matsumura Yumiko, Izumi Hiroto, Asanoma Kazuo, Yagi Hiroshi, Onoyama Ichiro, Sonoda Kenzo, Kohno Kimitoshi, Taga Tetsuya, Itakura Atsuo, Takeda Satoru, Kato Kiyoko	4. 巻 11
2. 論文標題 YBX2 and cancer testis antigen 45 contribute to stemness, chemoresistance and a high degree of malignancy in human endometrial cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1, 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83200-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Sachiko, Asanoma Kazuo, Yagi Hiroshi, Onoyama Ichiro, Hori Emiko, Matsumura Yumiko, Okugawa Kaoru, Yahata Hideaki, Kato Kiyoko	4. 巻 21
2. 論文標題 Fibronectin mediates activation of stromal fibroblasts by SPARC in endometrial cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1, 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-021-07875-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Masaya, Onoyama Ichiro, Kawakami Minoru, Yoshida Sachiko, Kawamura Keiko, Kodama Keisuke, Hori Emiko, Cui Lin, Matsumura Yumiko, Yagi Hiroshi, Asanoma Kazuo, Yahata Hideaki, Itakura Atsuo, Takeda Satoru, Kato Kiyoko	4. 巻 15
2. 論文標題 Downregulation of 5-hydroxymethylcytosine is associated with the progression of cervical intraepithelial neoplasia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0241482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0241482	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onoyama Ichiro, Nakayama Shogo, Shimizu Hideyuki, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 80
2. 論文標題 Loss of Fbxw7 impairs development of and induces heterogeneous tumor formation in the mouse mammary gland	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5515-5530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-0271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ichiro Onoyama, Masaya Kato, Minoru Kawakami, Keiko Kawamura, Hiroshi Yagi , Kazuo Asanoma, Kiyoko Kato
2. 発表標題 Downregulation of 5-hydroxymethylcytosine is associated with the progression of cervical intraepithelial neoplasia
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上穰、小野山一郎、加藤雅也、友延寛、安武伸子、吉田祥子、小玉敬亮、八木裕史、安永昌史、大神達寛、奥川馨、矢幡秀昭、加藤聖子
2. 発表標題 5-ヒドロキシメチルシトシン量の低下は子宮頸部上皮内癌の進展に関係する
3. 学会等名 第63回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ichiro Onoyama, Masaya Kato, Minoru Kawakami, Sachiko Yoshida, Keiko Kawamura, Hiroshi Yagi , Kazuo Asanoma, Hideaki Yahata, Kiyoko Kato
2. 発表標題 Downregulation of 5-hydroxymethylcytosine is associated with the progression of cervical intraepithelial neoplasia
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------