

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 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390180

研究課題名（和文） エピゲノム、ゲノム、ミローム解析による臨床検査値異常のメカニズムに関する研究

研究課題名（英文） Mechanism of abnormalities in clinical laboratory data by analysis of epigenome, genome and miRome

研究代表者

前川 真人（MAEKAWA MASATO）

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20190291

研究成果の概要（和文）：

Le 酵素を遺伝的に欠失している個体において、血清 CA19-9 の予期しない上昇のメカニズムを解析した。その結果、Le 欠損の遺伝型を有し Se 酵素活性も欠損している場合に CA19-9 が生成されてしまうという結論に至った。

エピゲノム、ゲノム解析の新規アプローチとして、光学顕微鏡で観察される染色体の不均一性を反映したバンド構造とゲノム配列の統合をめざしたヒトゲノム機能解析を行った。また、ヒト染色体 R/G-バンド境界領域を、DNA 複製タイミングの S 期前半から後半への転換部位ならびに GC 含量分布の区分境界として塩基配列レベルで特定した。さらに、その特殊なゲノム領域の詳細な解析を行った結果、R/G-バンド境界領域は、癌をはじめとする多因子疾患の発症や染色体異常をおこしやすいゲノム不安定化部位に対応することが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Even genuinely Le-negative patients, who genetically lack the Le enzyme and theoretically never produce CA19-9, occasionally show a slight increase in serum CA19-9 level. We analyzed this mechanism and found the phenomena are occurred when the patients are homozygous for Se-negative genotypes and suffer from advanced cancer with overproduction of glycans as precursors of CA19-9.

The human genome is composed of large-scale compartmentalized structures, including replication-timing zones and long-range GC% mosaic structures, which are related to chromosome bands. We found that the early/late-switch regions of replication timing, which generally correspond with transitions in GC content, are correlated with R/G-chromosome band boundaries, and such specific regions in the human genome correspond to “unstable” regions of the genome in which increased DNA damage occurs. Information acquired through genome-wide studies of replication timing will contribute substantially to our understanding of the molecular mechanisms in the pathogenesis of diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：エピジェネティクス、マイクロRNA、ゲノム、臨床検査値

1. 研究開始当初の背景

我々は以前から加齢や環境要因によるエピジェネティクスの攪乱が生活習慣病の原因と考えていたが、ゲノム、エピゲノム、miRNAなどの攪乱が組み合わさって転写因子も含めたトランスクリプトームの攪乱をひきおこし、それによって種々の表現型が形成されていると考えている。この表現型の中に臨床検査データも含まれる。

(1) CA19-9は臨床検査として測定されている腫瘍マーカーの代表的な糖鎖抗原である。膵癌などの腺癌で高値を示すことが多いが、糖転移酵素の遺伝子多型により日本人では約10%がほとんどゼロであって、腫瘍マーカーとして使えないと教科書的に記載されている。しかしながら、基底状態では血清CA19-9がほとんどゼロであったにもかかわらず、大腸癌になってCA19-9が上昇した症例に遭遇した。このCA19-9値が予想外に上昇したメカニズムについての検討は今までにない。

(2) 近年、miRNAの発現異常とヒト発癌との関連が注目されており、miRNA自身が、癌遺伝子ならびに癌抑制遺伝子としての性質を備えていることが明らかになってきた。miRNAの機能異常は、がんをはじめとする様々な疾患における臨床検査値異常の分子機構とも密接に関連していると考えられる。また、最近ヒトゲノム上にマップされたmiRNAの約半数以上は、様々な癌の発症と関連した染色体異常を起こしやすい”fragile site”に位置していることが報告された。そこで、miRNAのゲノム上での局在部位は、我々のグループがゲノム不安定化部位として特定した染色体R/G-バンド境界領域に対応する可能性がある。

(3) 従来の遺伝子研究において、光学顕微鏡レベルでの現象と分子レベルでの現象は、異なる次元として別々に研究がなされる傾向にあったが、今後のゲノム、エピゲノム研究においては、両者を統合させることが重要である。この点で、光学顕微鏡で観察される染色体の不均一性を反映した縞模様様のバンド構造を、ヒトゲノム配列と直接対応づけ、両者の統合をめざすことは、今後の基礎・臨床分野におけるゲノム、エピゲノム研究における有効な手段や戦略となりうると思われる。また、これまでの病因遺伝子の研究においては、特定の疾患原因遺伝子のDNA変異の詳細な配列解析が盛んに行われ、その遺伝情報が蓄積されてきたが、その変異の起こりやすさやゲノム不安定性を客観的に評価する研究は殆どおこなわれていないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 血清CA19-9が本来体内で作れない遺伝型と考えられる個体で、発癌によってCA19-9が上昇してきた理由は今までに明らかにはなっていない。そこで、大腸癌になってCA19-9が予想外に上昇したメカニズムを明らかにするために、糖転移酵素の遺伝型を調べることにした。

(2) 特定の疾患原因遺伝子のDNA変異が起こる前の段階に、その変異の起こりやすさを客観的に評価することは、基礎生物学のみならず、予防医学や診断医学などの臨床応用分野においても重要な課題であり、臨床検査値異常の分子機構とも密接に関連していると考えられる。本研究においては、ヒトゲノムのDNA複製開始プログラムに着目し、がんをはじめとする疾患遺伝子群の塩基配列変異の起こりやすさやゲノム不安定性との関連性について検討する。

(3) miRNAのヒトゲノム上での局在部位の特徴を明らかにする。特に、我々のグループがゲノム不安定化部位として特定した染色体R/G-バンド境界部位との関連を塩基配列レベルで検討する。また、染色体工学的手法を駆使して、ヒト染色体R/G-バンド境界領域のゲノム機能解析を行い、その特殊なゲノム領域の特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 血清CA19-9が検出されない低値症例のフコース転移酵素、fucosyl transferase 3 (FUT3; Le酵素)とfucosyl transferase 2 (FUT2; Se酵素)の遺伝型を定法に従って調べた。また、病理組織(対照とする正常組織と癌組織)のLe^a, Le^b, CA19-9の免疫組織染色を行った。

(2) DNA複製タイミングを指標にして、ヒトゲノムの複製開始プログラムの解析、ならびに染色体バンド構造とヒトゲノム配列との間の直接的な対応関係について解析を行う。複製タイミングの測定法については、対数増殖期の培養細胞を60分間ブロモデオキシウリジン(BrdU)で標識し、エタノール固定をした後、-20°Cに保存する。セルソーターを用いて、DNA含量に基づいて、S期を4分割(S1, S2, S3, S4)する。また、G1ならびにG2/M分画の細胞も同時に分取する。このように、細胞周期により合計6分画した細胞について、免疫沈降法によりBrdUで標識した新生鎖DNAの精製をおこなった後、複製時期を測定する部位のプライマーセットを用いて、定量的PCRをおこない、ゲル電気泳動後に各S期分画のバンドを定量する。

4. 研究成果

(1) CA19-9 検査値の想定外の上昇のメカニズム

Le(a-b-) の表現型をもつ 6 人を 2 つのグループに分けた。A グループは、CA19-9 が発癌と共に上昇、B グループは発癌しても CA19-9 が上昇しなかった。6 人はいずれも FUT3 欠損の遺伝子変異 (多型) を持つ遺伝型であった。内訳は、4 人が *le1* (*le^{59,508}*) のホモ接合体、1 人が *le1* (*le^{59,508}*) と *le2* (*le^{59,1067}*) のコンパウンドヘテロ接合体、1 人が *le1* と *le^{202,314}* のコンパウンドヘテロ接合体であった。*le^{202,314}* は日本人では初めて報告された変異である。これらの変異は活性がほとんどゼロになるが、発現実験によると全くのゼロというわけではなく、若干の活性が残存している。*FUT2* (*Secretor*) 遺伝子については、B グループの 3 人は *Se2* のホモ接合体が 1 名、*Se2* and *sej* のコンパウンドヘテロ接合体が 2 名で、*Se* 酵素活性が十分あるタイプであった。一方、A グループは 3 名全員が *sej* のホモ接合体、すなわち活性がほとんど消失するタイプであった。これより、Le(a-b-) の表現型を持つ個体は、図 1 に示したように、基本的には (健康状態; 図 1 中 H で示す) CA19-9 はほとんどゼロであるが、発癌により 1 型糖鎖が増えると、*Se* 酵素によって (図 1 中 B で示す) H 型抗原とシアリル Le^c (DU-PAN-2) が増加して (図 1 中 C で示す)、シアリル Le^a (CA19-9) は特に増えないが、*Se* 酵素が欠損する遺伝子型であると、過剰に増えたシアリル Le^c からわずかに残存する *le* 酵素によって CA19-9 が過剰に生成され、CA19-9 が予想外に上昇したものと考えられた。

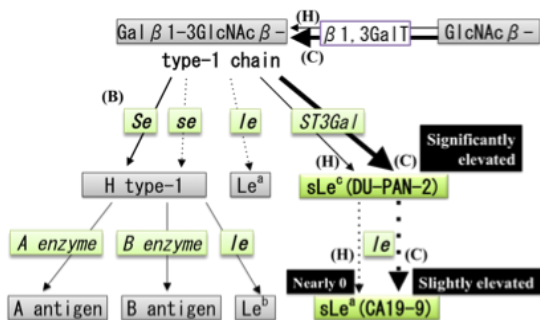


図 1. Le陰性の個体におけるルイス抗原生成のメカニズム

2) DNA 複製開始プログラムを指標にした疾患遺伝子変異の起こりやすさの評価

DNA 複製タイミングを指標にしたヒトゲノム機能解析から、複製タイミングの S 期前半から後半への転換部位として特定した染色体 R/G-バンド境界領域は、SNP や DNA 増幅の

高頻度部位と密接に対応していることが判明した。また、この特殊なゲノム領域には、がん関連遺伝子群や脳神経疾患関連遺伝子群が集中して局在するという予想外の結果を得た。さらに、特に癌細胞株を使用した複製タイミングの解析結果から、がん関連遺伝子群の塩基配列変異がおこる前に、その兆候として局在する遺伝子部位の複製開始プログラムが変化し、極めてゲノム不安定な状態になっていることを明らかにした。

(3) miRNA のゲノム局在部位の解析

miRNA のヒトゲノム上での局在部位が、ゲノム不安定化部位として特定した染色体 R/G-バンド境界部位と関連があるかを明らかにするため、ヒト 11 番ならびに 21 番染色体長腕領域を対象に、miRNA のゲノム解析を行った。その結果、miRNA の約半数以上が染色体 R/G-バンド境界ならびにその近傍に局在していることが判明した。

(4) ヒト染色体 R/G-バンド境界領域のゲノム機能解析

ヒト染色体 R/G-バンド境界領域は、miRNA のゲノム局在部位や、がんをはじめとする多因子疾患の発症と関連することが判明し、臨床検査値異常の分子機構とも密接に関連する特殊なゲノム領域であると考えられることから、染色体工学的手法を用いたゲノム機能解析を行った。具体的には、ヒト 11 番染色体をハムスター由来 CHO 細胞に導入したハイブリッド細胞を用い、ヒト 11 番染色体の R/G-バンド境界領域を対象に DNA 複製タイミングの解析を行った。その結果、CHO 細胞に導入したヒト 11 番染色体の R/G-バンド境界領域の複製タイミングは、対照として用いたヒト由来細胞系と同様に S 期前半から後半に大きく変化していることが判明した。この結果、ヒト染色体 R/G-バンド境界領域の複製開始プログラムは、染色体自身に本来備わった制御機構であることが示唆された。

以上から、がんをはじめとする疾患遺伝子群の塩基配列変異が生じる前に、その兆候として局在する遺伝子部位の複製開始プログラムが変化し、極めてゲノム不安定な状態になっていることがわかった。また、ヒト染色体の“バンド境界”は、miRNA のゲノム局在部位と関連し、がんを始めとする多因子疾患の発症や臨床検査値異常の分子機構と関連したゲノム不安定性部位に対応すると考えられた (図 2)。このようなバンド境界領域は、細胞型特異的遺伝子発現の分子機構とも密接に関連した特殊な生物学的機能を併せもつ“ハイリスク・ハイリターン”ともいふべき特徴を備えている重要な染色体機能領域であると推測される。

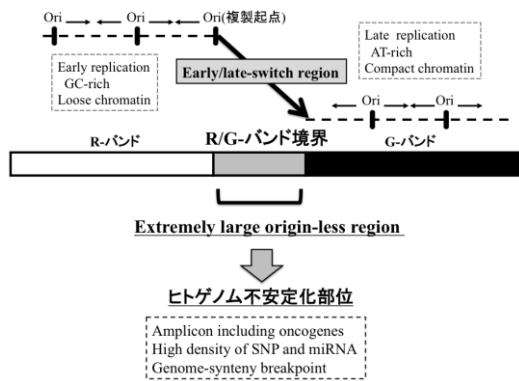


図2. ヒトゲノム不安定化部位として特定した染色体 R/G-バンド境界領域の特徴

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 17 件)

1. Yamada H, Shinmura K, Yamamura Y, Kurachi K, Nakamura T, Tsuneyoshi T, Yokota N, Maekawa M, Sugimura H : Identification and characterization of a novel germline p53 mutation in a patient with glioblastoma and colon cancer. *Int J Cancer*, 査読有, 125 (4), 2009, 973-976.
2. Takeshita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono T, Hirano I, Matsui H, Shigeno K, Nakamura S, Tobita T, Maekawa M, Ohnishi K, Sugimoto Y, Kiyoi H, Naoe T, Ohno R. : CMC-544 (inotuzumab ozogamicin) shows less effect on multidrug resistant cells: analyses in cell lines and cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia and lymphoma. *Br J Haematol*, 査読有, 146 (1), 2009, 34-43.
3. Takeshita A, Yamakage N, Shinjo K, Ono T, Hirano I, Nakamura S, Shigeno K, Tobita T, Maekawa M, Kiyoi H, Naoe T, Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R. : CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), an anti-CD22 immuno-conjugate of calicheamicin, alters the levels of target molecules of malignant B-cells. *Leukemia*, 査読有, 23 (7), 2009, 1372.
4. Watanabe Y, Maekawa M : Spatiotemporal regulation of DNA replication in the human genome and its association with genomic instability and disease. *Curr Med Chem*, 査読有, 17 (3), 2010, 222-233.

5. Watanabe Y, Maekawa M : Methylation of DNA in Cancer. *Advances in Clinical Chemistry*, 査読有, 52, 2010, 145-168.
6. Ihara H, Watanabe T, Hashizume N, Totani M, Kamioka K, Onda K, Sunahara S, Suzuki T, Itabashi M, Aoki Y, Ishibashi M, Ito S, Ohashi K, Enomoto T, Saito K, Saeki K, Nagamura Y, Nobori T, Hirota K, Fujishiro K, Maekawa M, Miura M, Ohta Y : Community of National Institute of Standard and Technology standard reference material 1955 homocysteine and folate in frozen human serum for total folate with automated assays. *Annals of Clinical Biochemistry*, 査読有, 47, 2010, 541-548.
7. Sato R, Watanabe H, Genma R, Takeuchi M, Maekawa M, Nakamura H : ABCC8 polymorphism (Ser1369Ala) : influence on severe hypoglycemia due to sulfonylureas. *Pharmacogenomics*, 査読有, 11 (12), 2010, 1743-1750.
8. Tao H, Shinmura K, Yamada H, Maekawa M, Osawa S, Takayanagi Y, Okamoto K, Terai T, Mori H, Nakamura T, Sugimura H : Identification of 5 novel germline APC mutations and characterization of clinical phenotypes in Japanese patients with classical and attenuated familial adenomatous polyposis. *BMC Research Notes*, 査読有, 305(3), 2010, 305.
9. Iino K, Oki Y, Yamashita M, Matsushita F, Hayashi C, Yogo K, Nishizawa S, Yamada S, Maekawa M, Sasano H, Nakamura H : Possible Relevance between Prohormone Convertase 2 Expression and Tumor Growth in Human Adrenocorticotropin-Producing Pituitary Adenoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 査読有, 95(8), 2010, 4003-4011.
10. 前川真人 : Epigeneticsの基礎と臨床応用臨床検査, 査読無, 54, 2010, 1689-1692.
11. 渡邊良久, 前川真人 : エピジェネティクス. 腎と透析, 査読無, 70(2), 2010, 221-223.
12. Okayama N, Nishioka M, Hazama S, Sakai K, Suehiro Y, Maekawa M, Sakamoto J, Iwamoto S, Kato T, Mishima H, Oka M, Hinoda Y : The Importance of Evaluation of DNA Amplifiability in KRAS Mutation

- Testing with Dideoxy Sequencing using Formalin-fixed and Paraffin-embedded Colorectal Cancer Tissues. Japanese Journal of Clinical Oncology. 査読有, 41(2), 2011, 165-171.
13. Kono M, Nakamura Y, Suda T, Kato M, Kaida Y, Hashimoto D, Inui N, Hamada E, Miyazaki O, Kurashita S, Fukamachi I, Endo K, Ng P, Takehara K, Nakamura H Maekawa M, Chida K : Plasma CCN2 (connective tissue growth factor ; CTGF) is a potential biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) . Clinica Chimica Acta, 査読有, 412, 2011, 2211-2215.
 14. Maekawa M, Sugiura A, Iwahara K, Sakai Y, Kishi K : Effect of the inhibition of mitochondrial creatine kinase activity on the clinical diagnosis of suspected acute myocardial infarction. The Open Clinical Chemistry Journal, 査読有, 5, 2012, 1-6.
 15. Sato R, Watanabe H, Shirai K, Ohki S, Genma R, Morita H, Inoue E, Takeuchi M, Maekawa M, Nakamura H : A cross-sectional study of glucose regulation in young adults with very low birth weight : impact of male gender on hyperglycaemia. BMJ Open, 査読有, 2, 2012, 1-7.
 16. Hamada E, Taniguchi T, Baba S, Maekawa M : Investigation of unexpected serum CA19-9 elevation in Lewis-negative cancer patients. Ann Clin Biochem, 査読有, (in press), 2012
 17. Sato R, Watanabe H, Genma R, Takeuchi M, Maekawa M, Nakamura H : Future perspective on pharmacogenomics of severe hypoglycemia associated with sulfonylureas : reply from the authors. Pharmacogenomics, 査読有, 13(1), 2012, 9-10.
- [学会発表] (計 13 件)
1. 清遠英司, 新村和也, 梶村春彦, 前川真人 : 大腸癌におけるポリコムグループ遺伝子Xの役割。日本癌学会
 2. 山田英孝, 新村和也, 山村泰弘, 倉地清隆, 中村利夫, 常吉俊宏, 横田尚樹, 前川真人, 梶村春彦 : 神経膠芽腫と大腸がんを発症した患者におけるp53遺伝子の新規生殖細胞系列変異の同定および機能解析。日本癌学会
 3. 渡邊良久, 前川真人 : 腫瘍関連遺伝子群が局在しているゲノム不安定化部位の解析。日本臨床化学会
 4. 渡邊良久, 前川真人 : DNA複製タイミングを指標にした癌ゲノム解析。日本遺伝子診療学会
 5. Maekawa M : Standardization for Laboratory Medicine and National EQA Survey Program in Japan. The 1st Asian and Pacific Symposium on Quality Control
 6. Maekawa M, Kondo T, Hamada E, Iwahara K, Uchiyama S, Kobayashi Y : Evaluation of hepatitis virus marker assays on Sysmex HISCL-2000i automated chemiluminescent enzyme immunoassay system. American Association for Clinical Chemistry
 7. Hamada E, Iwahara K, Uchiyama S, Kondo T, Maekawa M : Thyroid function testing and tumor marker by LOCI technology on dimension Vista. American Association for Clinical Chemistry
 8. 渡邊良久, 前川真人 : 染色体バンド境界領域に集中したサイズの大きな疾患遺伝子群の特徴 : ヒトゲノムの遺伝子配置との関連。日本臨床化学会
 9. 前川真人 : DNA メチル化 (エピジェネティクス)。日本臨床検査専門医会春季大会
 10. 渡邊良久, 前川真人 : ヒトゲノム不安定化部位として特定した染色体バンド境界に局在する疾患遺伝群の新たな特徴。遺伝医学合同学術集会
 11. Maekawa M, Taniguchi T, Ishikawa J : Efficiency of COLD-PCR and High Resolution Melting for detecting K-ras mutation. American Association for Clinical Chemistry
 12. Hamada E, Fujiwara A, Maekawa M : Study for basic performance of automated glucose analyzer GA09 model. American Association for Clinical Chemistry
 13. 澤村 暢, 名倉理教, 石川仁子, 山影 望, 藤澤朋幸, 前川真人 : MRSAの遺伝子タイプング法 (PFGE法とrep-PCR法) の比較検討。日本臨床検査医学会東海・北陸支部総会
- [図書] (計 3 件)
1. 北村 聖 他 : 医学書院 臨床検査データブック LAB DATA コンパクト版 第6版 2011, 361
 2. 日本臨床検査同学院 遺伝子分析科学認定士制度委員会 : 克誠堂出版 遺伝子分析科学 2011, 257

3. 前川真人 他 : 医学書院
標準臨床検査学 臨床化学 2011, 346

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 真人 (MAEKAWA MASATO)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 20190291

(2) 研究分担者

竹下 明裕 (TAKESHITA AKIHIRO)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 00242769
飯野 和美 (IINO KAZUMI)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 90402263
渡邊 良久 (WATANABE YOSHIHISA)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 00362187
橋本 大 (HASHIMOTO DAI)
浜松医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 20467236
藤澤 朋幸 (FUJISAWA TOMOUKI)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 20402357