

## 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11日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590425

研究課題名（和文） がんにおける DNA 高度メチル化を指標としたバイオマーカーの探索

研究課題名（英文） The search for DNA methylation-based biomarkers in cancer

研究代表者

福重 真一（FUKUSHIGE SHINICHI）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90192723

研究成果の概要（和文）：

がんにおいてプロモーター領域の高度メチル化により転写抑制された遺伝子を網羅的に探し出す新しい方法—MeTA法と遺伝子発現マイクロアレイを組み合わせた“MeTA-array”という方法—を開発した。本法により同定された遺伝子はプロモーター領域に高密度のCpGアイランドを含むという特徴をもつ。この方法を膵がんに適用し、診断・治療のバイオマーカーとしての可能性をもつがん特異的DNA高度メチル遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a novel method called “microarray coupled with methyl-CpG targeted transcriptional activation” (MeTA-array for short), which is useful in identifying hypermethylation-mediated silenced genes in cancer. The majority of genes identified by this method had more stringent criteria of CpG islands at the promoter region at high frequency. We have applied MeTA-array to pancreatic cancer cells and identified several genes hypermethylated in primary pancreatic cancers in a tumor-specific manner. These genes should be useful as candidates for tumor-specific biomarkers.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
|        |           |           |           |
|        |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

がんにおける DNA メチル化部位の探索は、主に、以下の3つの方法によって実施されている。

1) DNA メチル化阻害剤の投与により発現が

亢進する遺伝子を遺伝子発現マイクロアレイによって検出する。

2) メチル CpG 配列に対する抗体に結合する DNA 断片をプロモーターマイクロアレイでスクリーニングする。

3) バイサルファイト処理したゲノム DNA を

直接、最新の高速シーケンサーによって塩基配列決定する。

1) の DNA メチル化阻害剤を用いた方法は最も一般的であるが、DNA メチル化のない遺伝子も高頻度に転写活性化されるという欠点をもつ。また、2) の方法は、抗体の特異性、マイクロアレイの充実度、精度に問題が残る。一方、3) の方法は、直接的であり、結果が明らかであるが、ゲノム全体をシーケンスするには多大な労力とコストが必要であり現実的でない。このような問題を解決し、効率よく DNA メチル化により転写抑制された遺伝子を見出すため、我々は MeTA (methyl-CpG targeted transcriptional activation、メチル CpG 配列を標的とする転写活性化) という方法を考案した。

MeTA 法では、メチル CpG 結合ドメイン (MBD) に転写コアクチベーターをリクルートするドメインを結合することによって転写抑制された下流遺伝子の転写を再活性化することができる。MBD を含む蛋白は、本来、メチル CpG 配列を介した転写抑制に関わっているため、MBD のこのような部位への特異性はきわめて高い。実際、MBD に転写因子 NF $\kappa$ B の転写活性化ドメイン、NF $\kappa$ B(AD)、を繋いだ DNA コンストラクトを作製し、DNA 修復遺伝子 *MLHI* がエピジェネティックに転写抑制されたヒト胎児腎細胞株 293T にトランスフェクションしたところ、*MLHI* の転写が強く再活性化された。この反応は MBD 依存的であり、*MLHI* 以外のエピジェネティックサイレンシングを受けるがん関連遺伝子も同様に転写再活性化された。また、MeTA 法と遺伝子発現マイクロアレイの組合せによって 293T 細胞で転写再活性化した遺伝子について解析したところ、多数の遺伝子がプロモーター領域に CpG アイランドをもつことが明らかとなった。そのうち高い発現を示す 6 遺伝子について RT-PCR 法、methylation-specific PCR (MSP) 法で解析した結果、すべての遺伝子で DNA 高度メチル化が観察された。また、6 遺伝子のうち 2 遺伝子は DNA メチル化阻害剤で転写回復がほとんど見られなかった。これらの結果は、一般的な DNA メチル化阻害剤による方法で見落とされてしまったメチル化遺伝子を MeTA 法で見つけ出せる可能性を示している。

## 2. 研究の目的

がんにおける DNA メチル化とそれによって転写抑制される遺伝子の探索は、腫瘍形成過程の分子レベルでの理解に重要なだけでなく、これらの遺伝子が、がんにおける 1) リスク評価、2) 早期診断、3) 予後予測、4) 治療時の遺伝子再発現の観察などバイオマーカーとして利用できる可能性をもつため、がんの診断・治療にとって重要な課題と

なっている。一般的には、DNA メチル化阻害剤とマイクロアレイ技術の組み合わせによって DNA メチル化領域の探索がなされている。しかしながら、転写抑制に直結する DNA メチル化領域を見つけ出すためのより特異性の高い方法が求められている。我々は、この問題を解決するため、MeTA という方法を開発し、報告した。この方法により、転写抑制されたメチル化遺伝子を高効率で探索できるだけでなく、一般的な方法では見落とされていたであろうメチル化遺伝子を探し出すこともできた。本研究では MeTA 法と遺伝子発現マイクロアレイを組み合わせた新しい方法 (MeTA-array) によってがん細胞において高度にメチル化した CpG アイランド、およびその制御下にある遺伝子を見つけ出し、バイオマーカーとしての可能性やがんへの関与を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) MeTA 法によって発現上昇する遺伝子の特徴

まず、MeTA 法によって再活性化された遺伝子の特性を調べ、DNA メチル化阻害剤を用いた一般的な方法との比較をおこない、それぞれの長所、短所を探った。そのため、ヒト胎児腎細胞株 293T をモデル系とした解析を実施した。まず、マイクロアレイによってそれぞれの方法でコントロールに比べ 5 倍以上発現の亢進が見られる遺伝子について *in silico* で CpG アイランドの有無およびその位置を決定した。また、MeTA 法で発現が亢進する上位 10 遺伝子の発現を半定量 RT-PCR 法で、プロモーター領域の DNA メチル化の有無をバイサルファイトシーケンシング法により解析した。さらに、MeTA を引き起こす NF $\kappa$ B(AD)-MBD 融合蛋白がプロモーター領域に結合しているかどうかクロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイにより検討した。また、MeTA 法あるいは DNA メチル化阻害剤を用いた方法によって発現上昇する遺伝子の CpG アイランドの頻度および生物学的特性などに違いが見られないかどうか詳しく解析した。

### (2) MeTA-array の膵がんへの応用

次に、これら基礎的データを基に、実際、難治性がんの一つ、膵がん MeTA-array を適用した。まず、膵がん細胞株 3 種 (AsPC-1、MIA PaCa-2、PANC-1) とコントロールとして正常膵管上皮細胞株 (HPDE) について、MeTA 法を実施し、発現の変動する遺伝子をマイクロアレイで解析した。次に、MeTA 法により 3 種の膵がん細胞株で共通に発現が亢進する遺伝子を選び出し、CpG アイランドの有無を検討した。また、これらの遺伝子について MSP 法によりプロモーター領域 CpG アイランドのメチル化に関する情報を得た。さらに、他の

膵がん細胞株や臨床検体におけるメチル化の有無や程度を MSP 法によって解析し、メチル化遺伝子のバイオマーカーとしての可能性について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) MeTA 法によって同定された遺伝子の特徴

まず、MeTA 法あるいは DNA メチル化阻害剤、5-アザシチジン (Aza-CR)、をヒト胎児腎細胞株 293T に適用し、遺伝子発現マイクロアレイによって5倍以上発現上昇する遺伝子 (MeTA: 138 遺伝子、Aza-CR: 202 遺伝子) を同定した (雑誌論文 4 参照)。次に、MeTA 法で発現上昇が見られる上位 10 遺伝子についてさらに解析を行ない、すべての遺伝子が、1) MeTA 法による発現回復、2) プロモーター領域の高度メチル化、3) 転写開始点近傍の CpG アイランドへの NF $\kappa$ B (AD)-MBD 融合蛋白の結合、を示した。特に重要な点として、MeTA 法は Takai and Jones によって定義されたより高密度の CpG アイランドをプロモーター領域にもつ遺伝子を再活性化することができた (MeTA: 79.0%、Aza-CR: 59.9%)。これらの結果は MeTA 法とマイクロアレイの組み合わせ (MeTA-array) が DNA 高度メチル化により転写抑制された遺伝子を同定するための新たな効果的方法を提供することを示している。また、本研究により MeTA-array で従来の DNA メチル化阻害剤では見出せなかったメチル化遺伝子を探索できる可能性も示唆された。

(2) MeTA-array によるがんにおける高度メチル化遺伝子探索への応用

がん研究においてエピジェネティックに転写抑制された遺伝子を同定しその特徴を解析することは、腫瘍形成過程を理解するために必要なだけでなく腫瘍特異的にメチル化された遺伝子が腫瘍マーカーとして役立つためきわめて重要である。我々は、がんにおいてプロモーター領域の高度メチル化により転写抑制された遺伝子を網羅的に探索するため、上記の MeTA-array という方法を膵がんに応用し、その効果を探った。3 種の代表的な膵がん細胞株、AsPC-1、MIA PaCa-2、PANC-1 とコントロールとして正常膵管上皮細胞株 HPDE に MeTA-array を適用し、3 種の膵がん細胞株で共通に発現上昇する 19 遺伝子を見出した (雑誌論文 3 参照)。このうち 16 遺伝子は以前の DNA メチル化阻害剤、5-アザ-2'-デオキシシチジン、を用いた解析では見出されていない。16 遺伝子のうち、*CSMD2*、*SLC32A1*、*TMEM204*、*TRH* について MSP 法でプロモーター領域のメチル化解析をおこない、それぞれ 90% (19/21)、100% (21/21)、95% (20/21)、100% (21/21) の膵がん細胞株

でメチル化が観察された。さらに、*CSMD2*、*SLC32A1*、*TRH* は膵がん患者の手術切除標本でも腫瘍特異的にメチル化が見られた。これらの結果は、MeTA-array が様々ながんにおいて転写抑制された高度メチル化遺伝子を探索するための有効な手段であることを示す。

(3) 今後の展望

本研究では MeTA-array という DNA メチル化により転写抑制された遺伝子を網羅的に探索する新たな方法を開発し、この方法により同定された遺伝子の特徴を従来の DNA メチル化阻害剤による方法と比較した。また、実際に膵がんにおけるメチル化遺伝子探索に適用し、いくつかのがん特異的に高頻度でメチル化される遺伝子を同定した。これらの中にはがんの早期診断バイオマーカーとしての可能性をもつ候補遺伝子が含まれている。今後、臨床検体のパラフィンブロックから非腫瘍部、膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN)、浸潤性膵管癌の部位をマイクロダイセクションにより抽出し、ゲノム DNA を抽出した後、MSP 解析により各遺伝子のメチル化と発がんとの関係について考察していきたい。また、パラフィンブロック切片の免疫染色によって発がん過程のどの段階で蛋白レベルの減少が見られるのか明らかにし、がん化の初期でメチル化により転写抑制される遺伝子の情報を得、早期診断のためのバイオマーカーとしての可能性について検討していきたい。

#### 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 4 件)

1. Fukushige S, Horii A. Road to early detection of pancreatic cancer: Attempts to utilize epigenetic biomarkers. *Cancer Lett.* 査読有、2012 年、印刷中
2. Saiki Y, Yoshino Y, Fujimura H, Manabe T, Kudo Y, Shimada M, Mano N, Nakano T, Lee Y, Shimizu S, Oba S, Fujiwara S, Shimizu H, Chen N, Nezhad ZK, Jin G, Fukushige S, Sunamura M, Ishida M, Motoi F, Egawa S, Unno M, Horii A. *DCK* is frequently inactivated in acquired gemcitabine-resistant human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、421 巻、2012 年、98-104
3. Shimizu H, Horii A, Sunamura M, Motoi F, Egawa S, Unno M, Fukushige S. Identification of epigenetically silenced genes in human pancreatic cancer by a novel method "microarray coupled with methyl-CpG targeted

- transcriptional activation” (MeTA-array). Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有、411巻、2011年、162-167
4. Sato Y, Horii A, Fukushige S. Microarray coupled with methyl-CpG targeted transcriptional activation (MeTA-array) identifies hypermethylated genes containing the stringent criteria of CpG islands at high frequency. Epigenetics 査読有、6巻、2011年、752-759

[学会発表] (計 14 件)

1. 福重真一、陳娜、堀井明、メチル CpG 配列を標的とする転写活性化とマイクロアレイの組み合わせはヒトがんにおける低メチル化遺伝子の同定を可能にする、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年、10 月 3 日、名古屋
2. 山村明寛、堀井明、三浦康、阿部佳子、内藤剛、小川仁、矢崎伸樹、羽根田祥、渡辺和宏、大沼忍、佐瀬友彦、鈴木秀幸、斉木由利子、福重真一、柴田近、佐々木巖、大腸癌における新規癌抑制遺伝子 *NDRG2* のエピジェネティックな発癌制御機構、第 74 回大腸癌研究会、2011 年、1 月 21 日、福岡
3. Sekine H, Tabata T, Tsukamoto N, Chen N, Sato K, Umetsu Y, Nakamura K, Kim G, Yamamura A, Yoshino Y, Fukushige S, Sunamura M, Horii A. S100A4 regulates tumor growth, motility, and invasion in pancreatic cancer. 60th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, November 3, 2010, Washington DC, USA.
4. 山村明寛、三浦康、阿部佳子、福重真一、斉木由利子、木内誠、安藤敏典、唐澤秀明、金子直征、佐瀬友彦、柴田近、佐々木巖、堀井明、癌抑制遺伝子 *NDRG2* のエピジェネティックサイレンシングは消化器発癌を進行させる、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年、9 月 23 日、大阪
5. 福重真一、堀井明、ヒトがんにおいて各メチル CpG 結合ドメインは異なるメチル化遺伝子を標的とする能力をもつ、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年、9 月 22 日、大阪
6. 清水秀幸、福重真一、堀井明、メチル化で発現抑制された遺伝子を特定する新規の方法「MeTA」の膵癌解析への応用、第 99 回 日本病理学会総会、2010 年、4 月 29 日、東京
7. Sekine H, Tabata T, Tsukamoto N, Yamamura A, Abe K, Yoshino Y, Sato K, Chen N, Umetsu Y, Sato D, Gu Z, Fukushige S, Shima K, Motoi F, Egawa S, Sunamura M, Horii A. S100A4 regulates tumor growth, motility, and invasion in pancreatic cancer. 101st American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 21, 2010, Washington DC, USA.
8. Yamamura A, Miura K, Karasawa H, Abe K, Mizuguchi Y, Jin G, Gu Z, Fukushige S, Kaneko N, Kinouchi M, Ando T, Yazaki N, Tanaka N, Sase T, Shibata C, Sasaki I, Horii A. Expression of the N-myc downstream-regulated gene 2 (*NDRG2*) is frequently suppressed by promoter hypermethylation in human gastrointestinal and pancreatic cancers. 101st American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 21, 2010, Washington DC, USA.
9. Fukushige S, Shimizu H, Sato Y, Horii A. Identification of novel targets for aberrant methylation in pancreatic cancer by a newly developed method “methyl-CpG targeted transcriptional activation (MeTA)”. 101st American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 18, 2010, Washington DC, USA.
10. 山村明寛、三浦康、木内誠、安藤敏典、矢崎伸樹、田中直樹、唐澤秀明、佐瀬友彦、木村俊一、福重真一、Zhaodi Gu、嶋健太郎、柴田近、堀井明、佐々木巖、癌抑制遺伝子 *NDRG2* のエピジェネティックサイレンシングは消化器発癌を進行させる、第 110 回日本外科学会定期学術集会、2010 年、4 月 8 日、名古屋
11. 佐藤裕子、堀井明、福重真一、メチル CpG 配列を標的とする転写再活性化は、高度 DNA メチル化で転写抑制された遺伝子の高感度かつ高精度な同定を可能にする、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年、10 月 2 日、横浜
12. 福重真一、堀井明、メチル CpG 配列を標的とする転写再活性化による膵がんにおいてエピジェネティックに転写抑制された遺伝子の同定、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年、10 月 1 日、横浜
13. 関根均、塚本信和、田畑孝洋、吉野優樹、梅津有紀子、Gu Zhaodi、佐藤大亮、嶋健太郎、福重真一、元井冬彦、江川新一、砂村眞琴、堀井明、S100A4 は膵癌細胞の増殖と浸潤を制御する、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年、10 月 1 日、横浜
14. 山村明寛、三浦康、木内誠、安藤敏典、矢崎伸樹、田中直樹、唐澤秀明、佐瀬友彦、福重真一、Zhaodi Gu、柴田近、佐々木巖、堀井明、消化器癌において

*NDRG2* はプロモーターのメチル化によって発現抑制される、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年、10 月 1 日、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.tohoku.ac.jp/~molpath/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福重 真一 (FUKUSHIGE SHINICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90192723