

## 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 6 月 8 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21591710

研究課題名（和文）DNAメチル化異常の網羅的解析による消化器癌易罹患性の評価

研究課題名（英文）Predisposition of cancer development by global analysis of DNA methylation alterations

研究代表者

鈴木 浩一 (KOICHI SUZUKI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：70332369

研究成果の概要（和文）：

本研究は、正常組織で観察される遺伝子修飾異常（DNAメチル化異常）の情報をもとに、癌のかかりやすさを予測しようとするものです。胃癌、大腸癌の初回手術の非癌部背景粘膜の DNA 脱メチル化異常に着目し、多発癌の発生リスクのバイオマーカーとしての有用性を示しました。また、我々が独自に開発した DNAメチル化マイクロアレイを用いる事により、網羅的に遺伝子異常、遺伝子修飾異常を捉えることが可能となり、分子生物学的な疾患プロファイルの作成が期待されます。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the levels of demethylation alterations in normal tissues from patients who had undergone gastrectomy or colectomy due to cancer development. Our data showed that high levels of demethylation alterations were frequently seen in patients who developed synchronous or metachronous double cancers as compare with those did not. Further, we developed a novel microarray platform based on methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism DNA fingerprinting to perform the genome-wide severance of methylation alterations, which would enable us to make biological profiles according to the several diseases including cancer.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器外科・分子腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード:

(1) 遺伝子修飾異常 (2) 脱メチル化異常 (3) メチル化異常 (4) 潰瘍性大腸炎 (5) ヘリコバクターピロリ胃炎 (6) 大腸癌 (7) 胃癌 (8) 癌易罹患性

### 1. 研究開始当初の背景

癌の発生、進展には遺伝子配列の変化を伴う遺伝子異常とともに、DNA メチル化のような遺伝子配列の変化を伴わない遺伝子修飾の異常が重要な役割を演じています。特に遺伝子修飾の異常は癌のみならず、癌発症の背景となる慢性胃炎や潰瘍性大腸炎等の非癌組織にも観察されます。また遺伝子配列が全く同じである一卵性双生児の遺伝子発現の違いにも大きく関わっています。

遺伝子修飾異常が関わる発癌のメカニズムとして、プロモーター領域の異常メチル化による癌抑制遺伝子の失活と、ゲノム全域の脱メチル化異常による染色体不安定性の惹起が関与しており、ともに発癌の初期段階に関わっていると考えられています。そこで癌化に先行して引き起こされる遺伝子修飾の変化を正常組織において捉える事ができれば、癌の易罹患性を予見する有用な手段となり得ます。

これまで我々は、胃、大腸癌におけるメチル化の異常とゲノムの不安定性、そして癌化という一連の経路に着目し、ゲノム全域に渡って蓄積された遺伝子異常、遺伝子修飾異常を包括的に解析、評価してきました (Suzuki K. Gastroenterology 2003, Suzuki K. Cancer Cell 2006)。その結果、ゲノム全域の脱メチル化の進行はゲノムの不安定性を招来し、癌化に深く関わっていることを明らかにしました (平成 17-18 年度基盤研究 C)。

また我々は、独自に開発した DNA メチル化マイクロアレイを用いて、罹患年数とともに発癌のリスクが高くなる潰瘍性大腸炎の背景粘膜の DNA メチル化異常を検出し、非担癌の潰瘍性大腸炎の大腸粘膜では異常メチルを認めず、担癌潰瘍性大腸炎の非癌部および癌部でともにメチル化している遺伝子を同定し、それらの遺伝子のメチル化異常が癌部では高密度となり、その結果遺伝子の発現低下が生じている事を明らかにしました。すなわち、発癌に関連する遺伝子修飾の変化を非癌部組織で捉える事により、癌の易罹患性を予測できる可能性を示しました (平成 19-20 年度基盤研究 C)。

### 2. 研究の目的

本研究は、正常組織で観察される遺伝子修飾異常 (DNA メチル化異常) の情報をもとに、癌のかかりやすさを予測しようとするものです。DNA メチル化異常は癌組織のみなら

ず、非癌部組織でも認められるため、その情報を癌発症の予測や早期診断に利用します。我々が独自に開発した DNA メチル化マイクロアレイを用いる事により、網羅的に遺伝子異常、遺伝子修飾異常を捉えることが可能となり、分子生物学的な疾患プロファイルの作成が実現されます。

### 3. 研究の方法

① DNA メチル化マイクロアレイ (methylation sensitive amplified length polymorphism microarray) の確立と網羅的メチル化異常の解析: AFLP (amplified length polymorphism) 法で用いられている制限酵素の代わりにメチル化感受性制限酵素 NotI を利用し、ゲノム中の CG 領域のメチル化の異常を網羅的に検索します。NotI 配列はゲノム中、遺伝子領域の CG 島に約 50%、その他に約 50% 存在するため、メチル化異常とともに脱メチル化異常を同時に検索でき、メチル化異常を包括的に評価する上できわめて有効な手段と考えられます。この方法を用いてゲノム全域にわたる約 9645 カ所の CG 領域の変化をマイクロアレイのプラットフォームで検出し、癌化に関連した DNA メチル化異常を同定します。

癌部、非癌部組織で認められる DNA メチル化異常を網羅的に検出し、癌化に関わる DNA メチル化、脱メチル化異常を同定する。さらに得られた情報のクラスター解析を行い、臓器、癌特異性のある DNA メチル化、脱メチル化異常の同定を行う。

② 同定された遺伝子の機能解析

③ サテライト配列、Alu、LINE、SINE 等の繰り返し配列の DNA 脱メチル化異常の解析

### 4. 研究成果

methylation sensitive amplified length polymorphism microarray を確立し、大腸癌細胞株を用いてその精度を検証しました。この DNA メチル化アレイを用いて、潰瘍性大腸炎の非担癌症例のメチル化異常を網羅的に解析し、発癌に関与する候補遺伝子を同定しました (図 1) (文献 1)。

そのうち、グアニン交換因子である PSD (Pleckstrin and Sec7 domain-containing gene) 遺伝子の機能解析を行いました。その結果、慢性炎症による異常メチル化の誘導で PSD が不活化され、その下流の経路に存在する RAC1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) の機能が阻害され、RAC1 を介

した細胞死の誘導が破綻し、潰瘍性大腸炎の発癌に関与している事を示しました（文献2,3）。

次に、染色体不安定性に関与すると考えられるゲノム全域に広がる繰り返し配列（サテライト配列、Alu、LINE、SINE等）の脱メチル化異常に注目し、ピロリ感染慢性胃炎、胃癌、散発性大腸癌、多発性大腸癌の背景粘膜の脱メチル化異常を解析しました。その結果、ピロリ感染慢性胃炎から胃癌の発癌過程において、背景粘膜のセントロメア領域のサテライト $\alpha$ の脱メチル化異常が段階的に上昇していく事を明らかにしました（図2）。相対化したサテライト $\alpha$ の脱メチル化レベル（satellite alpha relative demethylation level）は、特に若年性、多発胃癌発症の危険因子であることを示しました（文献4）。

また、単発大腸癌と多発大腸癌の背景粘膜のLINE-1の脱メチル化異常を比較検討した結果、LINE-1 relative demethylation levelは同時性、異時性多発癌発生のバイオマーカーとしての有用である事を明らかにしました（図3）（文献5）。これらの結果は、縮小手術が広まる現状において、同時性や異時性発癌のリスクを算出する事により、適切な術式選択や、リスクに応じた適切な術後フォローアップの間隔設定などに臨床応用できる事が期待されます。

一方、マイクロサテライト不安定性大腸癌と鋸歯状腺腫のDNAメチル化異常をアレイを用いて網羅的に解析した結果、両者に遺伝子修飾の類似性が有意に認められ、鋸歯状腺腫がマイクロサテライト不安定性の前癌病変である事を強く示す結果が得られました（図4）（文献6）。

さらに通常型大腸癌と管状腺腫を加えてメチル化マイクロアレイの解析を行い、 $\beta$ カテニンの分解に関与する遺伝子やmTOR（図5）、CPT-11の感受性にかかわる蛋白（図6）（文献7）を同定しました。

図1：潰瘍性大腸炎の発癌に関わる遺伝子のヒートマップ

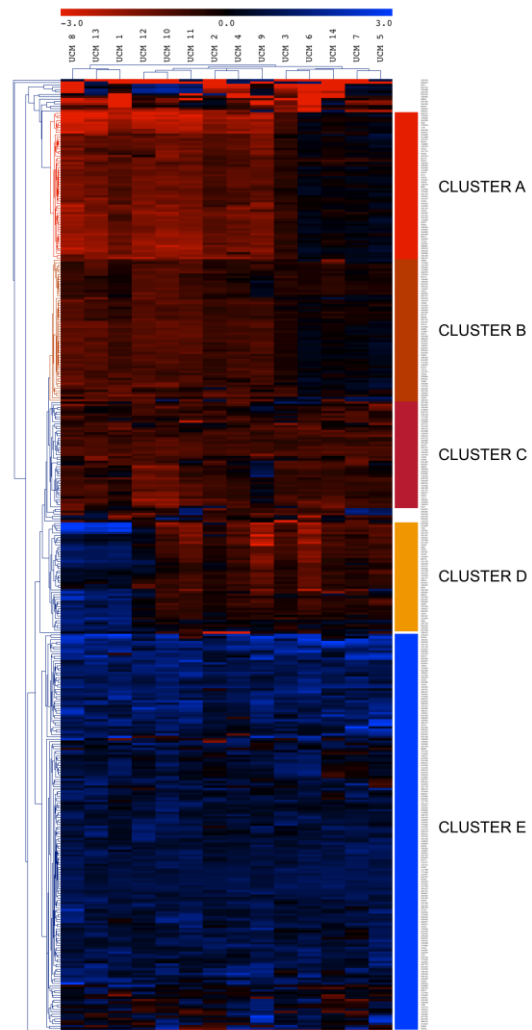


図2：胃粘膜組織のサテライト配列の脱メチル化の程度。胃多発癌と45歳以下の若年性胃癌患者の背景粘膜で脱メチル化が進んでいる。RDL: relative demethylation level

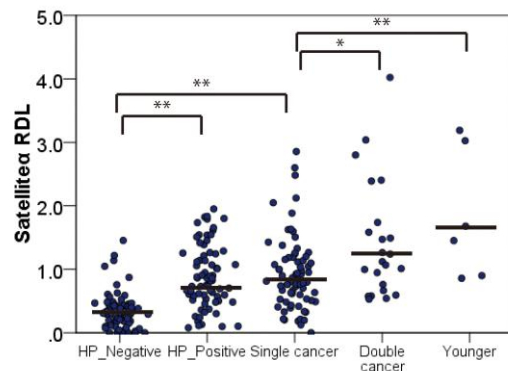


図 3 : 大腸がん患者の背景粘膜の初回手術時の LINE-1 の脱メチル化の程度と異時性大腸癌の発生頻度 (Y 軸は異時性腫瘍の発生頻度を示す)。カットオフ値 5 で 2 群に分けると感度 90%、特異度 55% で再発リスクを予測できる。

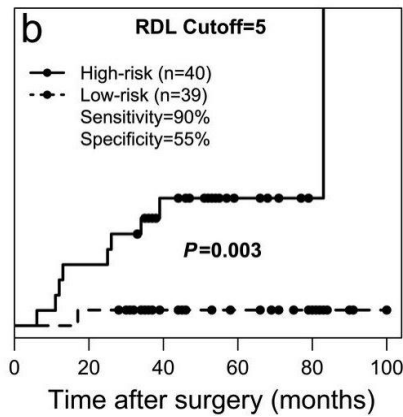


図 4 : マイクロサテライト不安定性大腸癌、鋸歯状腺腫 (実線)、通常大腸癌と管状腺腫の遺伝子修飾異常 (破線) の t-test と Cluster 解析。マイクロサテライト不安定性大腸癌と鋸歯状腺腫 (実線) の遺伝子修飾プロファイルが類似している事を明らかにした。

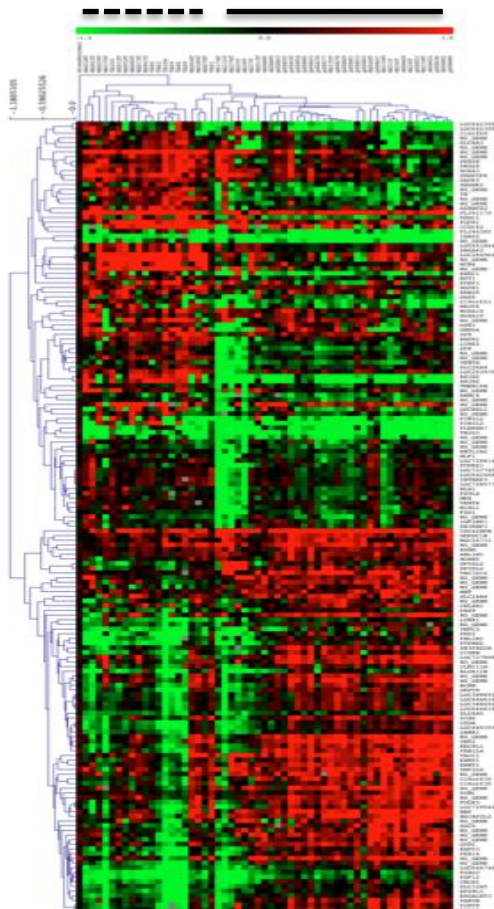


図 5 : マイクロサテライト不安定性大腸癌、鋸歯状腺腫 (実線)、通常大腸癌と管状腺腫 (破線) の遺伝子修飾異常の ANOVA 解析。β カテニンの分解に関与する遺伝子 (図中赤ドット) は、マイクロサテライト不安定性大腸癌、鋸歯状腺腫 (実線) で高頻度に異常メチル化が認められ、mTOR と複合体をなす遺伝子 (図中青ドット) はマイクロサテライト不安定性の有無に関わらず癌組織で異常メチル化が認められた。

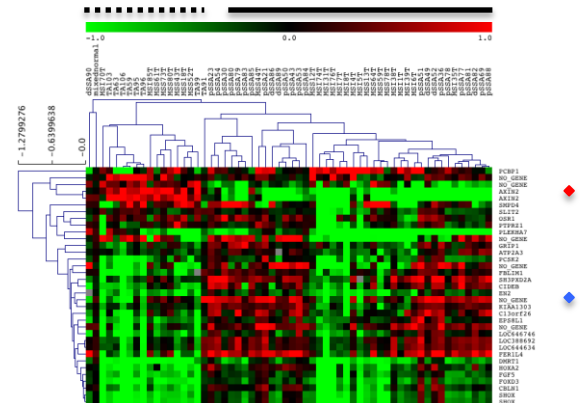
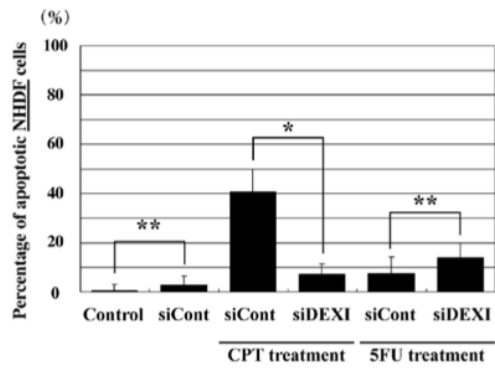
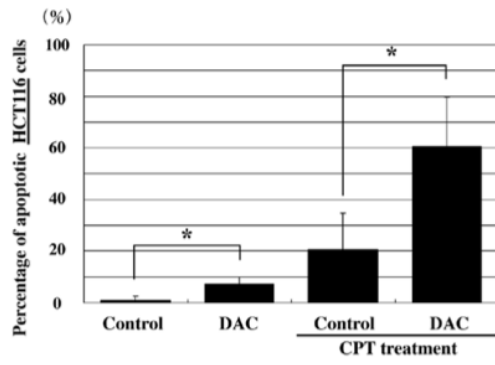


図 6 : DEXI の不活化による抗癌剤 (CPT) 耐性の獲得と脱メチル化剤による耐性回復。siDEXI により非メチル化繊維芽細胞株である NHDF の DEXI 発現抑制を行うと CPT に対する感受性が低下した (A)。一方、高度メチル化大腸癌株で CPT 耐性を有する HCT116 に対し、アザシチジン (DAC) を投与すると DEXI 発現が回復し、CPT に対するアポトーシス感受性が增強した (B)。この変化は DEXI 発現プラスミドの遺伝子導入により再現されることより、感受性回復には DEXI そのものが関与していると考えられる。FOLFORI (CPT-11+5FU) 療法を受けた大腸癌患者で、DEXI メチル化群 (UM:8 例) は非メチル化群 (M:8 例) と比較して病態制御率、無増悪生存率、生存率ともに成績が不良であった。図 A2 は無増悪生存率の比較を示す。DEXI メチル化評価は、CPT 耐性に関与するバイオマーカーとして臨床的に有用である事が示唆された。

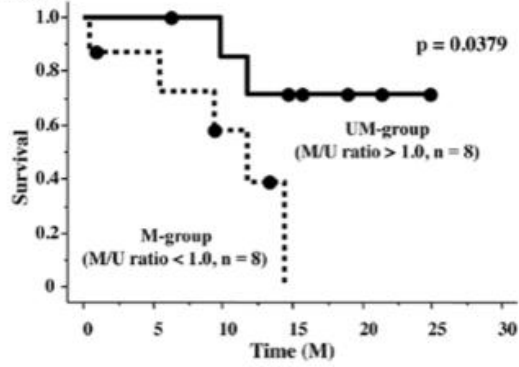
**A.**



**B.**



**A2.**



## 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 7 件)

- ① Koizumi K, Alonso S, Miyaki Y, Okada S, Ogura H, Shiiya N, Konishi F, Taya T, Perucho M, Suzuki K. Array-based identification of common DNA methylation alterations in ulcerative colitis. *Int J Oncol.* 40, 2012, 983-994
- ② Okada S, Suzuki K., Takaharu K, Noda H, Kamiyama H, Maeda T, Saito M, Koizumi K, Miyaki Y, Konishi F. Aberrant methylation of the Pleckstrin and Sec7 domain-containing gene is implicated in ulcerative colitis-associated carcinogenesis through its inhibitory effect on apoptosis. *Int J Oncol.* 40, 2012, 686-694
- ③ Kato T, Suzuki K., Okada S, Kamiyama H, Maeda T, Saito M, Koizumi K, Miyaki Y, Konishi F. Aberrant methylation of PSD disturbs Rac1-mediated immune responses governing neutrophil chemotaxis and apoptosis in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Int J Oncol.* 40, 2012, 942-950
- ④ Masaaki Saito, Koichi Suzuki., Takaharu Kato, Shinichiro Okada, Hidenori Kamiyama, Takafumi Maeda, Kei Koizumi, Yuichiro Miyaki, Kiyozaki Hirokazu and Fumio Konishi The accumulation of DNA demethylation in Sat a in normal gastric tissues with *Helicobacter pylori* infection renders the susceptibility to gastric cancer in some fractions of individuals. *Oncology Reports* 27, 2012, 1717-1725
- ⑤ Hidenori Kamiyama, Koichi Suzuki., Takafumi Maeda, Kei Koizumi, Yuichiro Miyaki, Shinichiro Okada, Yutaka Kawamura, Johanna Samuelsson, Sergio Alonso, Fumio Konishi and Manuel Perucho DNA demethylation in normal colon tissue predicts predisposition to multiple cancers. *Oncogene* 2012, doi: 10.1038/onc.2011.652
- ⑥ Maeda T, Suzuki K., Togashi K, Nokubi M, Saito M, Tsujinaka S, Kamiyama H, Konishi F Sessile serrated adenoma shares similar genetic and epigenetic features with microsatellite unstable colon cancer in a location-dependent manner. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2, 2012, 695-700
- ⑦ Miyaki Y, Suzuki K., Koizumi K, Kato T, Saito M, Kamiyama H, Maeda T, Shibata K, Shiya N, Konishi F. Identification of a potent

epigenetic biomarker for resistance to camptothecin and poor outcome to irinotecan-based chemotherapy in colon cancer. *Int J Oncol.* 40, 2012, 217-226

[学会発表] (計 21 件)

- ① 前田孝文, 鈴木浩一, 早田邦康, 河村 裕, 辻仲真康, 加納良彦, 神山英憲, 小西文雄  
大腸癌細胞株における DNA 脱メチル化異常と染色体不安定性  
第 109 回日本外科学会定期学術集会 2009. 4. 1-4 (福岡)
- ② 神山英範, 鈴木浩一, 前田孝文, 野田弘志, 高田 理, 河村 裕, 小西文雄  
サテライト  $\alpha$  脱メチル化異常と大腸癌易罹患者の検討  
第 109 回日本外科学会定期学術集会 2009. 4. 1-4 (福岡)
- ③ 神山英範, 鈴木浩一, 前田孝文, 小泉 圭, 宮木祐一郎, 河村 裕, 小西文雄  
多発大腸癌非癌部大腸粘膜の遺伝子変化から大腸癌異時発生の危険性を予測する  
第 64 回日本消化器外科学会総会 2009. 7. 16 (大阪)
- ④ 神山英範, 鈴木浩一, 前田孝文, 小泉 圭, 宮木祐一郎, 佐々木純一, 溝上 賢, 野田弘志, 河村 裕, 小西文雄  
多発大腸癌非癌部大腸粘膜の DNA 脱メチル化異常から大腸癌異時発生の危険性を予測する  
第 20 回日本消化器癌発生学会総会 2009. 11. 26-27 (広島)
- ⑤ 斎藤正昭, 清崎浩一, 鈴木浩一, 千葉文博, 高田 理, 吉田卓義, 小西文雄  
H. pylori 感染胃粘膜組織における遺伝子修飾異常の網羅的検索によるゲノムワイド脱メチル化異常の検索  
第 82 回日本胃癌学会 総会 2010. 3. 3-5 (新潟)
- ⑥ 神山英範, 鈴木浩一, 前田孝文, 小泉 圭, 宮木祐一郎, 佐々木純一, 河村 裕, 小西文雄  
非癌部大腸粘膜の DNA 脱メチル化異常を標的とした大腸癌発生の危険性の予測  
第 110 回日本外科学会定期学術集会 2010. 4. 8-10 (名古屋)
- ⑦ 鈴木浩一, 宮木祐一郎, 神山英範, 小泉 圭, 前田孝文, 斎藤正昭, 辻仲真康, 佐々木純一, 溝上 賢, 河村 裕, 小西文雄

Dexamethason induced protein の異常メチル化を指標とした抗癌剤感受性の予測と新たな治療戦略

第 110 回日本外科学会定期学術集会 2010. 4. 8-10 (名古屋)

⑧ 鈴木浩一、宮木祐一郎、神山英範、小泉圭、前田孝文、斎藤正昭、辻仲眞康、佐々木純一、溝上賢、河村裕、小西文雄

Dexamethason induced protein の異常メチル化を分子マーカーとした抗癌剤感耐性の予測と新たな抗癌剤治療戦略.

第 73 回大腸癌研究会 2010. 6. 30-7. 2 (奄美)

⑨ 神山英範、鈴木浩一、前田孝文、辻仲眞康、佐々木純一、河村裕、小西文雄

大腸異時性多発癌発生に関わる非癌部大腸粘膜の DNA 脱メチル化異常の意

第 73 回大腸癌研究会 2010. 6. 30-7. 2 (奄美)

⑩ 岡田晋一郎、鈴木浩一、神山英範、前田孝文、小西文雄

潰瘍性大腸炎の発癌には PSD の DNA 異常メチル化が関与する

第 73 回大腸癌研究会 2010. 6. 30-7. 2 (奄美)

⑪ 前田孝文、鈴木浩一、富樫一智、斎藤正昭、小西文雄

Sessile Serrated Polyp とマイクロサテライト不安定大腸癌の遺伝子異常.

第 73 回大腸癌研究会 2010. 6. 30-7. 2 (奄美)

⑫ 小西文雄、前田孝文、鈴木浩一、野田弘志

右側結腸癌の組織発生における sessile serrated adenoma/polyp(SSA/SSP)の役割—遺伝子変化の病理組織所見による分析—  
第 6 回免疫アジュバント研究会 2010. 9. 10-11 (日光)

⑬ 神山英範、鈴木浩一、前田孝文、小泉圭、宮木祐一郎、河村裕、小西文雄

Global demethylation in non-cancerous colonic mucosa is likely involved in the development of multiple colon cancer  
69th annual meeting of the Japanese Cancer Association 2010. 9. 22-24 (大阪)

⑭ 鈴木浩一、宮木祐一郎、岡田晋一郎、小泉圭、神山英範、斎藤正昭、前田孝文、河村裕、小西文雄

Methylation status of dexamethason induced protein is a good predictive marker for CPT-11 based chemotherapy resistance

69th annual meeting of the Japanese Cancer Association 2010. 9. 22-24 (大阪)

⑮ 加藤高晴、鈴木浩一、宮木祐一郎、神山英範、小泉圭、前田孝文、斎藤正昭、辻仲眞康、佐々木純一、溝上賢、河村裕、小西文雄

Dexamethason induced protein の異常メチル化を分子マーカーとした抗癌剤感耐性の予測と新たな抗癌剤治療戦略.

第 21 回消化器癌発生学会 2010. 11. 18-19 (軽井沢)

⑯ 斎藤正昭、鈴木浩一、前田孝文、加藤高晴、小西文雄

H. Pylori 感染とゲノムワイドな脱メチル化異常との関連の検討

第 21 回消化器癌発生学会 2010. 11. 18-19 (軽井沢)

⑰ Konishi F, Maeda T, Suzuki K, Togashi K

Sessile serrated adenoma of the colon as a precursor of colon Cancer. Colorectal Forum 2011 2011. 11. 5-6, Taiwan

⑱ 前田孝文、鈴木浩一、富樫一智、野首光弘、小西文雄

Sessile serrated adenoma の臨床病理学のおよび分子生物学的特徴と前癌病変としての意義

第 74 回大腸癌研究会 2011. 1. 21 福岡

⑲ 斎藤正昭、鈴木浩一、前田孝文、清崎浩一、小西文雄

H. Pylori 感染とゲノムワイドな脱メチル化異常の関連性

第 111 回日本外科学会定期学術集会 紙上開催

⑳ 加藤高晴、鈴木浩一、岡田晋一郎、神山英範、前田孝文、斎藤正昭、宮木祐一郎、小泉圭、小西文雄

Aberrant methylation of PSD disturbs Rac1-mediated immune systems, governing machinery of apoptosis and neutrophils chemotaxis, in ulcerative colitis-associated carcinogenesis  
第 7 回免疫アジュバント研究会 2011. 10. 7 福島

㉑ 斎藤正昭、鈴木浩一、加藤高晴、前田孝文、清崎浩一、小西文雄

胃癌発癌過程におけるセントロメア領域の脱メチル化異常と染色体不安定性.

第 22 回日本消化器癌発生学会総会 2011. 11. 25-26, 佐賀

〔図書〕(計1件)

辻仲眞康、鈴木浩一

大腸癌の発生と遺伝子異常. 大腸肛門病ハンドブック

医学書院, pp257-266, 2011

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: Dexamethasone-induced protein の遺伝子領域、抗癌剤耐性判別キット、抗癌剤感受性回復方法、抗癌剤組成物、siRNA、アポトーシス回復組成物

発明者: 鈴木 浩一

権利者: 自治医科大学

種類:

番号: 2009-196707

出願年月日: 2009/08/27

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 浩一 (KOICHI SUZUKI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70332369

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: