

機関番号：82606

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790371

研究課題名 (和文) 発がん過程において DNA メチル化プロファイル異常が惹起される分子機構の解明

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of aberrant DNA methylation during multistage carcinogenesis

研究代表者

新井 恵吏 (ARAI ERI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：40446547

## 研究成果の概要 (和文)：

本研究は、ヒトDNAメチルトランスフェラーゼ1(DNMT1)と結合して発がん過程におけるDNAメチル化プロファイル異常形成に寄与する分子の同定を目的としている。まず、RT-PCR法ならびにウエスタンブロット法を用いてヒト培養がん細胞におけるDNMT1発現を解析し、DNMT1を高発現する細胞として、ヒト肝細胞がん由来細胞HepG2を選択した。また、複数の抗ヒトDNMT1抗体のうちから免疫沈降法に最も優れた抗体を選定し、HepG2細胞の核抽出液を用いて抗DNMT1抗体による免疫沈降法を施行した。SDS-PAGEによって沈降物を展開したところ、DNMT1のバンドと共に、DNMT1とは異なる分子量のバンドが確認された。抗ヒトDNMT1抗体による免疫沈降物を2 Dimensional Image Converted Analysis of LCMS (2D-ICAL法)で解析し、DNMT1と共同沈降する分子の候補として、DNMT1との結合が未だ報告されていない分子を同定した。培養がん細胞の抽出液において、これらの分子に対する抗体を用いた免疫沈降法を行い、DNMT1との結合を確認し、候補分子がDNMT1の分布異常を介してDNAメチル化プロファイル異常を惹起し得るかの検討を予定している。

## 研究成果の概要 (英文)：

The aim of this study is to detect the molecules which associate with DNA methyltransferase (DNMT)1 and contribute to induce aberrant DNA methylation profiles during human carcinogenesis. We used HepG2 cell line which was derived from human liver cancer and showed high expression levels of DNMT1. We performed immunoprecipitation of DNMT1 using optimum antibody in HepG2 nuclear extract, and separated immunoprecipitant by SDS-PAGE. Co-precipitated proteins were analyzed by 2 Dimensional Image Converted Analysis of LCMS (2D-ICAL method), and the candidate molecule which may associate DNMT1 and may contribute aberrant DNA methylation was identified. Direct association between the candidate molecule and DNMT1 is being evaluated. Mechanisms how the candidate molecule participates in aberrant distribution of DNMT1 resulting in aberrant DNA methylation profiles will be examined.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理学，腫瘍，DNAメチル化，DNMT1，発がんリスク評価

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトのがんの多くが、長い時間と複数の段階を経て発生すると認識されている。多段階発がん過程においては、がん遺伝子の増幅・がん抑制遺伝子の変異・染色体の欠失といったジェネティックな異常、およびDNA塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな異常が蓄積すると考えられる。DNAメチル化は、発がん過程に寄与する主要なエピジェネティック機構である。

ほ乳類細胞のDNAメチル化は、発生分化過程においてダイナミックに変化して、各細胞特有のプロファイルが形成される。研究代表者およびその所属する研究室は、多段階発がん過程の早期すなわち前がん段階から悪性進展に至るまでのDNAメチル化異常を、種々の臓器で年来報告してきた。発がんリスクやがんの生物学的特性を規定する特有のDNAメチル化プロファイルが存在することがわかった一方で、そのDNAメチル化プロファイルを制御する分子機構については、未だ詳細が明らかになっていない。

DNAメチルトランスフェラーゼは、S-アデノシルメチオニンより供与されたメチル基をシトシンに付加する反応に寄与する酵素であり、DNAメチル化に関わる主要な分子である。研究代表者の所属する研究室では、当初よりDNMT1に着目し、DNMT1発現が諸臓器の前がん段階から正常細胞に比して有意に亢進し、DNMT1発現亢進ががんのCpGアイランドメチル化形質や悪性度と有意に相関して、症例の予後不良因子となることを報告している (Saito et al., *Hepatology*, 2001 and *Int J Cancer*, 2003 etc.). これらの知見より、DNMT1がヒト多段階発がん過程におけるDNAメチル化異常に重要な役割を果たしていると推測される。他方で研究代表者らのゲノム網羅的解析から、DNMT1の発現が一様に亢進していても、DNAメチル化プロファイルはがんの臨床病理学的特性に応じて多様であることがわかっている。すなわち、DNMT1をある特定のDNA配列に誘導し、特有のDNAメチル化プロファイルを形成する分子の存在が疑われる。

### 2. 研究の目的

本研究では、DNMT1 が発がん過程における

異常DNAメチル化プロファイル形成過程に寄与する分子機構の理解を進めることを目的とする。DNAメチル化異常形成機構に関わり、がんの予防・治療標的となる分子候補の同定と、その奏効性診断指標となるDNAメチル化プロファイルの同定を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト培養がん細胞の選定

我々は、腎・尿路・肝・膵などの多段階発がん過程において、BACアレイを用いたゲノム網羅的DNAメチル化解析を既に行っており、ヒト組織におけるDNAメチル化プロファイルデータを有している。これらの臓器がんから樹立されたヒト培養がん細胞のうち、ゲノム網羅的DNAメチル化解析によって臨床試料と同様のDNAメチル化異常が蓄積していることが確認され、DNMT1のmRNA・蛋白を十分発現している細胞株を選定する。

#### (2) DNMT1 蛋白に対する免疫沈降法の確立

(1)で選定したヒト培養がん細胞より蛋白を抽出し、抗ヒトDNMT1抗体を用いた免疫沈降法を行う。市販ならびに当研究室で作製した抗ヒトDNMT1抗体のうち、免疫沈降反応に至適な抗体を選択し、至適実験条件を設定する。必要であれば新規抗体を独自に作製する。

#### (3) DNMT1 蛋白と直接結合する蛋白の同定

(1)で選定したヒト培養がん細胞より、全細胞溶解物あるいは核溶解物を抽出し、抗DNMT1抗体を用いた免疫沈降法を行う。共同沈降物の質量分析を行い、得られたマススペクトルの結果をMascot searchなどのデータベースに照会し、あるいはペプチドシーケンス等を行い、DNMT1蛋白と共同沈降する蛋白群を同定する。

DNMT1蛋白と共同沈降する分子の候補が得られた場合は、候補蛋白ならびにDNMT1のタグ付き蛋白を作製し、精製蛋白同士で相互にプルダウンアッセイを行うなどして、候補蛋白とDNMT1蛋白が真に直接結合するか検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト培養がん細胞の選定

複数のヒト培養がん細胞において、BACアレイを用いたゲノム網羅的DNAメチル化プロファイル解析を施行したところ、複数の肝がん細胞株に臨床試料と同様にDNAメチル化異常が蓄積していることがわかった。さらに、RT-PCR法ならびにWestern法によってDNMT1

発現を確認し、DNMT1 高発現を示す細胞株として HepG2 を選定した。

#### (2) DNMT1 蛋白に対する免疫沈降法の確立

市販されているものと当研究室で作製したものを含めた複数の抗ヒト DNMT1 抗体を用いて、免疫沈降法の至適条件の検討を行った。全細胞抽出物と核抽出物では、いずれも良好に免疫沈降が行えたものの、後者の方が非特異的沈降物の少ない結果が得られた。DNMT1 は本来核内蛋白であり、特に DNA メチル化プロファイル形成に寄与する際には核内に存在することが予想されるため、以降は核抽出物で免疫沈降反応を行った。比較検討した複数の抗体の中から、最も効率よく DNMT1 の沈降が行え、非特異的沈降の少ない抗体として、Santa Cruz 社の抗ヒト DNMT1 抗体 (goat IgG) を選定した。HepG2 の核抽出物と選定した抗ヒト DNMT1 抗体を用いて、DNMT1 の免疫沈降反応の至適条件を設定した。

#### (3) DNMT1 蛋白と直接結合する蛋白の同定

上記 (2) で選定した抗体を用いて、HepG2 核抽出物の免疫沈降反応を行い、SDS-PAGE によって沈降物を泳動したところ、DNMT1 と共同沈降する複数の候補蛋白のバンドが視認された。そこで再度免疫沈降反応を行い、沈降物を 2 Dimensional Image Converted Analysis of LCMS (2D-ICAL 法) で解析した。2D-ICAL 法によって同定された分子 X を DNMT1 と共同沈降する候補分子とし、この分子に対する抗体を用いた免疫沈降法で DNMT1 が共同沈降することの確認を試みている。

### 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 9 件)

1. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis*, 32: 462-469, 2011.
2. Arai E., Wakai-Ushijima S., Fujimoto H., Hosoda F., Shibata T., Kondo T., Yokoi S., Imoto I., Inazawa J., Hirohashi S., and Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology*, 78: 1-9, 2011.
3. Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S,

Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *J Biomed Biotech*, 2011.

4. Nagashio R, Arai E, Ojima H, Kosuge T, Kondo Y, Kanai Y. Carcinogenetic risk estimation based on quantification of DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage. *Int J Cancer*, 2011, in press.

5. Arai E, Kanai Y. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis (review). *Int J Clin Exp Pathol*, 4: 58-73, 2010.

6. Arai E, Kanai Y. DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status (review). *Epigenomics* 2: 467-481. 2010.

7. Nishiyama N, Arai E, Chihara Y, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage. *Cancer Sci*, 101: 231-240, 2009.

8. Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 125: 2854-2862, 2009.

9. Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome. *Carcinogenesis*, 30: 214-221, 2009.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 新井恵吏, 森泰昌, 知久季倫, 後藤政広, 中川徹, 藤元博行, 金井 弥栄. 腎細胞がん発生過程における DNA メチル化異常の網羅的解析. 日本エピジェネティクス研究会第 5 回年会, 2011. 5. 19-20, 熊本.
2. 長塩亮, 新井恵吏, 尾島英, 小菅智男, 金井弥栄. 慢性障害肝における DNA メチル化状態を指標とした発がんリスク評価の肝生検検体を用いた臨床応用. 日本エピジェネティクス研究会第 5 回年会, 2011. 5. 19-20, 熊本.
3. 新井恵吏, 金井弥栄. 泌尿器系腫瘍及びその背景組織のメチル化解析. 日本病理学会第 100 回総会, 2011. 4. 28-30, 横浜.
4. 赤塚慎也, 山下依子, 岡崎泰昌, 蔣麗, 永井裕崇, 新井恵吏, 金井弥栄, 豊國伸哉. 酸化ストレス誘発ラット腎癌は高度な染色体不安定性を示す. 日本病理学会第 100 回総会, 2011. 4. 28-30, 横浜.
5. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. AACR 102<sup>nd</sup> annual meeting 2011, 2011. 4. 2-6, Orlando, FL.
6. 新井恵吏, 若井-牛島抄織, 中川徹, 藤元博行, 金井弥栄. Stage I 精巣セミノーマにおける DNMT3B 巢状発現は再発予測指標となる. 日本癌学会第 69 回学術総会, 2010. 9. 22-24, 大阪.
7. 長塩亮, 新井恵吏, 尾島英知, 小菅智男, 近藤豊, 金井弥栄. DNA メチル化を指標とする慢性肝障害患者における発がんリスク評価法の開発. 日本癌学会第 69 回学術総会, 2010. 9. 22-24, 大阪.
8. 後藤政広, 新井恵吏, 若井-牛島抄織, 平岡伸介, 小菅智男, 細田文恵, 柴田龍弘, 近藤格, 横井左奈, 井本逸勢, 稲澤譲治, 金井弥栄. DNA メチル化プロファイルに基づいた膵がんの存在診断・病態診断指標の確立. 日本癌学会第 69 回学術総会, 2010. 9. 22-24, 大阪.
9. Arai E, Ushijima-Wakai S, Nakagawa T, Fujimoto H, Kanai Y. Focal DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. Epigenetics and Stem Cells Conference, 2010. 8. 25-27, Copenhagen, Denmark.
10. 新井恵吏, 若井-牛島抄織, 中川徹, 藤元博行, 金井弥栄. Focal DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. 日本エピジェネティクス研究会第 4 回年会, 2010. 5. 28-29, 米子.
11. 長塩亮, 新井恵吏, 尾島英知, 小菅智男, 近藤豊, 金井弥栄. DNA メチル化を指標とする慢性肝障害患者における発がんリスク評価法の開発. 日本エピジェネティクス研究会第 4 回年会, 2010. 5. 28-29, 米子.
12. 後藤政広, 新井恵吏, 平岡伸介, 小菅智男, 細田文恵, 柴田龍弘, 近藤格, 横井左奈, 井本逸勢, 稲澤譲治, 金井弥栄. DNA メチル化プロファイルに基づいた膵がんの存在診断・病態診断指標の確立. 日本エピジェネティクス研究会第 4 回年会, 2010. 5. 28-29, 米子.
12. Arai E, Ushijima-Wakai S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. AACR special conference, Cancer epigenetics, 2010. 1. 21-24, San Juan, Puerto Rico.
13. 新井恵吏, 牛島抄織, 後藤政広, 尾島英知, 小菅智男, 細田文恵, 柴田龍弘, 近藤格, 横井左奈, 井本逸勢, 稲澤譲治, 廣橋説雄, 金井弥栄. DNA メチル化の変化を指標とした肝細胞がんのリスク評価と予後予測. 日本癌学会第 68 回学術総会, 2009. 10. 1-3, 横浜.
14. 西山直隆, 新井恵吏, 藤元博行, 細田文恵, 柴田龍弘, 近藤格, 塚本泰司, 横井左奈, 井本逸勢, 稲澤譲治, 廣橋説雄, 金井弥栄. 尿路上皮がんならびに前がん状態にある尿路上皮における DNA メチル化プロファイル発がんリスク評価と予後予測. 日本癌学会第 68 回学術総会, 2009. 10. 1-3, 横浜.
15. 千原良友, Gangning Liang, Peter Jones, 新井恵吏, 藤元博行, 菅野康吉, 藤本清秀, 平尾佳彦, 金井弥栄. 定量的 DNA メチル化解析に基づく尿路上皮がん診断示標. 日本癌学会第 68 回学術総会, 2009. 10. 1-3, 横浜.

16. 赤塚慎也, 山下依子, 蔣麗, 大原浩貴, 泉谷昌志, 阿部浩一郎, 中釜齊, 村上秀樹, 関戸好孝, 新井恵吏, 金井弥栄, 樋野興夫, 豊國伸哉. 鉄ニトリロ三酢酸誘発ラット腎癌に見られる高度の染色体不安定性. 日本癌学会第 68 回学術総会, 2009. 10. 1-3, 横浜.
17. 新井恵吏, 牛島抄織, 藤元博行, 細田文恵, 柴田龍弘, 近藤格, 横井左奈, 井本逸勢, 稲澤讓治, 廣橋説雄, 金井弥栄. 種々の組織亜型の腎腫瘍における DNA メチル化プロファイル. 日本エピジェネティクス研究会第 3 回年会, 2009. 5. 22-23, 東京.
18. Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation alterations and copy number alterations during renal carcinogenesis. AACR 100th annual meeting, 2009. 4. 19-23, Denver, CO.

〔図書〕 (計 1 件)

1. Kanai Y, Arai E. DNA methylation status in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma (review). In: Molecular Genetics of Liver Neoplasia. ed. Grisham JW, Thorgeirsson S, Springer, pp147-159, 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: Pyrosequencing技術を用いてDNAメチル化状態を定量評価し肝細胞がんの発生リスクを評価する方法

発明者: 金井弥栄、新井恵吏、長塩亮

権利者: 金井弥栄、新井恵吏、長塩亮

種類: 特許

番号: 特願 2011-16695

出願年月日: 2011 年 1 月 28 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新井 恵吏 (ARAI ERI)

国立がん研究センター研究所・分子病理分

野・研究員

研究者番号: 40446547