

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790675

研究課題名(和文) 消化器癌細胞および癌幹細胞の網羅的エピゲノム解析

研究課題名(英文) Epigenomic analysis of gastrointestinal cancer cells

研究代表者

鈴木 拓 (SUZUKI HIROMU)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20381254

研究成果の概要(和文)：消化器癌細胞および消化器癌幹細胞に特徴的なエピゲノムパターンを明らかにするため、マイクロアレイおよび次世代シーケンサーを用いて大腸癌細胞における遺伝子発現、miRNA 発現およびヒストンメチル化をゲノムワイドに解析した。また、内視鏡切除された大腸癌臨床検体の DNA メチル化およびヒストン修飾解析を行った。得られたエピゲノムデータを解析することで、大腸癌においてエピジェネティックに不活化した microRNA 遺伝子を複数同定した。今回の研究から大腸癌における大規模エピゲノムデータが得られ、それらの情報を癌関連遺伝子や miRNA の同定に応用できることが示された。

研究成果の概要(英文)：In order to dissect the epigenome of gastrointestinal cancer, we analyzed the chromatin signatures and gene expression in colorectal cancer (CRC) cells. We carried out high-throughput ChIP-seq analysis and compared the data with gene expression and microRNA (miRNA) expression signatures. We also examined the DNA methylation and histone modifications in primary CRC tissues. Through these analyses, we identified a number of epigenetically silenced miRNA genes in CRCs. Our study provided a large set of epigenome data in CRC cells, suggesting that the data set are useful tools to identify cancer related genes or miRNAs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：消化器癌、メチル化、エピゲノム、癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

癌エピジェネティクス研究は、遺伝子プロモーターの CpG アイランド(CGI)メチル化発見を契機に急速に発展したが、近年では DNA メチル化とヒストン修飾の密接な関係が明らかにされつつある。現在のモデルでは、転写が活発な領域はヒストン H3 リジン

4(H3K4)のメチル化でマークされ、転写抑制された領域では H3K9 や H3K27 のメチル化でマークされている。癌細胞ではさらに DNA メチル化が加わることで、遺伝子が完全に転写抑制された状態に固定される。

申請者はこれまで消化器癌細胞においてメチル化により不活化された遺伝子や

microRNA (以下 miRNA) のスクリーニングを行い、多数の論文発表を行ってきた。さらに DICER ノックアウト大腸癌細胞では一部の遺伝子が脱メチル化していることを見いだした。これはヒト癌細胞の DNA メチル化に RNAi 経路が関与することを示した最初の報告である。また、近年のマイクロアレイ技術の進歩により DNA やヒストンメチル化をゲノムワイドに解析することが可能となってきた。申請者はこれまでに ChIP-on-chip によるヒストンメチル化解析と、methylated CpG Amplification (MCA) microarray (MCAM)法による DNA メチル化解析を統合する事で、エピゲノム解析を効率的に行えることを明らかにした。

近年、大腸癌細胞において DNA メチル化を受ける遺伝子の多くが ES 細胞では bivalent ドメインを形成していることが明らかにされ、癌幹細胞の形成・維持におけるエピジェネティクスの重要性がクローズアップされている。癌細胞のエピゲノムを明らかにすることは癌のエピジェネティック治療戦略を立てる上で重要である。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いて大腸癌細胞における遺伝子発現・ヒストンメチル化・DNA メチル化を網羅的に解析する。次に癌幹細胞様性質を有する Side population (SP) 細胞におけるヒストンメチル化および DNA メチル化を解析し、non-SP 細胞と比較することで癌幹細胞特異的なエピゲノムパターンを明らかにする。また、得られた膨大なシーケンサーデータを有効活用するためのシステム構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 解析対象

大腸癌細胞株(HCT116)および DNMT1, DNMT3B ノックアウト細胞を最初の解析対象とする。また、内視鏡的および外科的に切除された大腸癌臨床検体を併せて解析する。

(2) ヒストン修飾解析

アクティブな転写開始点のマーカであるトリメチル化ヒストン H3K4 (H3K4me3)、転写伸長のマーカであるジメチル化ヒストン H3K79 (H3K79me2)、転写抑制のマーカであるトリメチル化ヒストン H3K27 (H3K27me3)に対する抗体を用いてそれぞれクロマチン免疫沈降(ChIP)を行う。得られた ChIP 産物を高速シーケンサー(ABI SOLiD3)でシーケンス解析する(ChIP-seq)。

(3) エピゲノムと遺伝子発現の比較

DNA およびヒストンメチル化と遺伝子発

現の相関を検討するため、ChIP-seq の結果と、遺伝子および miRNA 発現マイクロアレイ結果を比較する。大腸癌細胞およびノックアウト細胞、それらの DNA メチル化阻害剤 5-aza-dC で処理後、さらに正常大腸組織の遺伝子発現プロファイルのデータセットをエピゲノムと比較する。

(4) 臨床癌検体のエピゲノム解析

内視鏡的に切除された大腸癌組織から、上皮マーカー EPICAM を用いて癌細胞を分離し、上記の方法を用いてエピゲノム解析を行う。

(5) DNA メチル化解析

エピゲノム解析から同定された新規癌関連遺伝子の DNA メチル化を、メチル化特異的 PCR (MSP) および bisulfite pyrosequencing 法により解析する。

(6) 遺伝子機能解析

エピゲノム解析によって同定された新規癌関連遺伝子の機能を、コロニーフォーメーションアッセイ、MTT アッセイにより解析する。

4. 研究成果

(1) 大腸癌細胞におけるエピゲノム解析

大腸癌細胞 HCT116 および DNMT1, DNMT3B ノックアウト細胞におけるヒストン修飾(H3K4me3, H3K79me2, H3K27me3)を解析するため、それぞれのヒストン修飾に対する特異抗体を用いて ChIP を行った。ChIP 産物からシーケン斯拉イブラリを作成し、ABI SOLiD3plus シーケンサーを用いて解析を行った。1 検体あたり 30~40 million タグのシーケンス情報を得た。データをヒトゲノム上にマッピングした。アクティブな転写開始点のマーカである H3K4me3 のピークは HCT116 細胞ゲノムでは約 2 万 5 千箇所、DNMT ノックアウト細胞のゲノムでは約 5 万箇所において認められた。H3K4me3 ピークの増加はゲノムワイドな脱メチル化により誘導されたものと考えられた。

(2) 大腸癌細胞においてエピジェネティックに不活化された miRNA 遺伝子の同定

癌関連 microRNA を同定する目的で、エピゲノムデータおよび microRNA 発現マイクロアレイデータを統合解析した。まず H3K4me3 をマーカとすることで 233 種類の pre-miRNA を含む 174 種類の一次転写産物(pri-miRNA)のプロモーター領域を予測した(下図)。DNA 脱メチル化前後の発現とヒストン修飾を比較した結果、37 種類の pri-miRNA (47 種類の pre-miRNA) がエピ

ジェネティックなサイレンシングを受けていると推測された。37個のプロモーター領域のうち22個にCpGアイランド(CGI)が存在し、その全てがHCT116細胞においてメチル化していた。CGIの脱メチル化は多くの場合H3K4me3とH3K27me3の上昇を伴ったが、H3K79me2はほとんど回復しなかった。また、大腸癌細胞でCGIメチル化を示すmiRNA遺伝子は、ES細胞においてPRC2ターゲットである傾向が見られた。

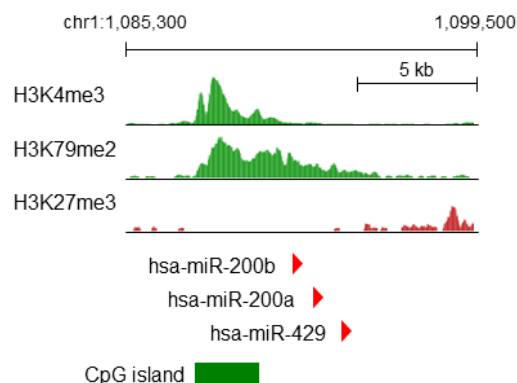


図1. miRNA 遺伝子のヒストン修飾

(3) 新規大腸癌関連 miRNA の解析

臨床検体を用いた解析の結果、miR-1-1 遺伝子の CGI が大腸癌において高頻度にメチル化している事を見いだした(76%, n = 94)。コロニーフォーメーションアッセイおよびMTT アッセイの結果、miR-1-1 による大腸癌細胞の増殖抑制効果が確認された。これらの結果から、miR-1-1 は新規の大腸癌関連 miRNA であることが示唆され、腫瘍抑制遺伝子的に機能していることが推測された。

(4) 臨床検体におけるエピゲノム解析

内視鏡的に切除された大腸癌組織から、上皮マーカーEPICUM を用いて癌細胞を分離し初代培養を行った後、固定して H3K4me3 のChIP 解析を行った。約 1×10^5 個の細胞からシーケンス解析に十分な ChIP 産物が得られることが確認された。

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 Yamamoto E, Suzuki H, Takamaru H, Yamamoto H, Toyota M, Shinomura Y. Role of DNA Methylation in the Development of Diffuse-Type Gastric Cancer. *Digestion* 2011;83:241-249. 査読有
- ② Hizaki K, Yamamoto H, Taniguchi H,

Adachi Y, Nakazawa M, Tanuma T, Kato N, Sukawa Y, Sanchez JV, Suzuki H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y. Epigenetic inactivation of calcium-sensing receptor in colorectal carcinogenesis. *Mod Pathol* 2011. 査読有

- ③ Igarashi S, Suzuki H, Niinuma T, Shimizu H, Nojima M, Iwaki H, Nobuoka T, Nishida T, Miyazaki Y, Takamaru H, Yamamoto E, Yamamoto H, Tokino T, Hasegawa T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. A Novel Correlation between LINE-1 Hypomethylation and the Malignancy of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Cancer Res* 16, 5114-5123, 2010. 査読有
- ④ Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Kudo T, Harada E, Sugai T, Takamaru H, Niinuma T, Maruyama R, Yamamoto H, Tokino T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. *Carcinogenesis* 31, 2066-2073, 2010. 査読有
- ⑤ Yamashita M, Toyota M, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto E, Kamimae S, Watanabe Y, Kai M, Akashi H, Maruyama R, Sasaki Y, Yamano H, Sugai T, Shinomura Y, Imai K, Tokino T, Itoh F. DNA methylation of interferon regulatory factors in gastric cancer and noncancerous gastric mucosae. *Cancer Sci* 101, 1708-1716, 2010. 査読有
- ⑥ Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene* 29, 3723-3731, 2010. 査読有
- ⑦ Buchert M, Athineos D, Abud HE, Burke ZD, Faux MC, Samuel MS, Jarnicki AG, Winbanks CE, Newton IP, Meniel VS, Suzuki H, Stacker SA, Näthke IS, Tosh D, Huelsken J, Clarke AR, Heath JK, Sansom OJ, Ernst M. Genetic dissection of differential signaling threshold requirements for the Wnt/beta-catenin

- pathway in vivo. PLoS Genet 6, e1000816, 2010. 査読有
- ⑧ Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, Akashi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Sugai T, Shen L, Issa JP, Shinomura Y, Tokino T, Toyota M. IGFBP7 is a p53 Responsive Gene Specifically Silenced in Colorectal Cancer with CpG Island Methylator Phenotype. Carcinogenesis 31, 342-349, 2010. 査読有
- ⑨ Fujikane T, Nishikawa N, Toyota M, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Ashida M, Ohe-Toyota M, Kai M, Nishidate T, Sasaki Y, Ohmura T, Hirata K, Tokino T. Genomic screening for genes upregulated by demethylation revealed novel targets of epigenetic silencing in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 122:699-710, 2010. 査読有
- ⑩ Sugai T, Habano W, Jiao YF, Toyota M, Suzuki H, Tsukahara M, Koizuka H, Akasaka R, Koeda K, Wakabayashi G, Suzuki K. Molecular analysis of single isolated glands in gastric cancers and their surrounding gastric intestinal metaplastic mucosa. Oncol Rep 23, 25-33, 2010. 査読有
- ⑪ Goto Y, Shinjo K, Kondo Y, Shen L, Toyota M, Suzuki H, Gao W, An B, Fujii M, Murakami H, Osada H, Taniguchi T, Usami N, Kondo M, Hasegawa Y, Shimokata K, Matsuo K, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Issa JP, Sekido Y. Epigenetic Profiles Distinguish Malignant Pleural Mesothelioma from Lung Adenocarcinoma. Cancer Res 69, 9073-9082, 2009. 査読有
- ⑫ Nojima M, Maruyama R, Yasui H, Suzuki H, Maruyama Y, Tarasawa I, Sasaki Y, Asaoku H, Sakai H, Hayashi T, Mori M, Imai K, Tokino T, Ishida T, Toyota M, Shinomura Y. Genomic screening for genes silenced by DNA methylation revealed an association between RASD1 inactivation and dexamethasone resistance in multiple myeloma. Clin Cancer Res 15, 4356-4364, 2009. 査読有
- ⑬ Mita H, Toyota M, Aoki F, Akashi H, Maruyama R, Sasaki Y, Suzuki H, Idogawa M, Kashima L, Yanagihara K, Fujita M, Hosokawa M, Kusano M, Sabau SV, Tatsumi H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. A novel method, digital genome scanning detects KRAS gene amplification in gastric cancers: involvement of overexpressed wild-type KRAS in downstream signaling and cancer cell growth. BMC Cancer 9, 198, 2009. 査読有
- ⑭ Samuel MS, Suzuki H, Buchert M, Putoczki TL, Tebbutt NC, Lundgren-May T, Christou A, Inglese M, Toyota M, Heath JK, Ward RL, Waring PM, Ernst M. Elevated Dnmt3a activity promotes polyposis in Apc Min mice by relaxing extracellular restraints on Wnt signaling. Gastroenterology 137, 902-913, 2009. 査読有
- ⑮ Idogawa M, Sasaki Y, Suzuki H, Mita H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. A Single Recombinant Adenovirus Expressing p53 and p21-targeting Artificial microRNAs Efficiently Induces Apoptosis in Human Cancer Cells. Clin Cancer Res 15, 3725-3732, 2009. 査読有
- ⑯ Kashima L, Toyota M, Mita H, Suzuki H, Idogawa M, Ogi K, Sasaki Y, Tokino T. CHFR, a potential tumor suppressor, downregulates interleukin-8 through the inhibition of NF-kappaB. Oncogene 28, 2643-2653, 2009. 査読有
- ⑰ Jost E, Gezer D, Wilop S, Suzuki H, Herman JG, Osieka R, Galm O. Epigenetic dysregulation of secreted Frizzled-related proteins in multiple myeloma. Cancer Lett 281, 24-31, 2009. 査読有
- [学会発表] (計 10 件)
- ① 山本英一郎, 鈴木 拓, 新沼 猛, 五十嵐伸一, 山本博幸, 豊田 実, 篠村恭久. 消化管間質腫瘍における LINE-1 低メチル化と悪性度との相関. 第 21 回日本消化器癌発生学会総会. 軽井沢, 11 月 18 ~19 日, 2010
- ② 鈴木 拓, 新沼 猛, 篠村恭久. GIST におけるエピジェネティックな異常とその臨床的意義. 第 18 回日本消化器病関連学会週間. 10 月 13~16 日. 2010
- ③ 山本英一郎, 鈴木 拓, 山野泰徳, 神前正幸, 甲斐正広, 菅井 有, 時野隆至, 今井浩三, 篠村恭久, 豊田 実. CIMP 大腸癌の起源. 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪, 9 月 22~24 日, 2010
- ④ 豊田 実, 鈴木 拓, 野島正寛, 佐々木

泰史, 篠村恭久, 時野隆至, 今井浩三. 次世代シーケンサーを用いた遺伝子転写開始点予測とエピゲノム解析への応用. 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪, 9月22~24日, 2010

- ⑤ 甲斐正広, 鈴木 拓, 山本英一郎, 今井浩三, 豊田 実. 大腸がん・胃がん細胞における DGKG のエピジェネティック制御. 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪, 9月22~24日, 2010
- ⑥ 鈴木 拓, 山本英一郎, 高丸博之, 五十嵐伸一, 野島正寛, 山本博幸, 豊田 実, 今井浩三, 篠村恭久. 胃癌における microRNA34b/c のエピジェネティックな不活化. 第 6 回日本消化管学会学術集会. 福岡, 2月19~20日, 2010
- ⑦ 山本英一郎, 豊田 実, 鈴木 拓, 山本博幸, 山野泰穂, 菅井 有, 今井浩三, 篠村恭久. 多発胃癌背景胃粘膜における異常メチル化. 第 20 回日本消化器癌発生学会総会. 広島, 11月26~27日, 2009
- ⑧ 鈴木 拓, 五十嵐伸一, 高丸博之, 新沼猛, 山本英一郎, 野島正寛, 山本博幸, 豊田 実, 今井浩三, 篠村恭久. 大腸癌における IGFBP7 のメチル化と CIMP との相関. 第 20 回日本消化器癌発生学会総会. 広島, 11月26~27日, 2009
- ⑨ 鈴木 拓, 五十嵐伸一, 高丸博之, 新沼猛, 山本博幸, 時野隆至, 今井浩三, 豊田 実, 篠村恭久. 大腸癌においてエピジェネティックに不活化した microRNA の網羅的解析. 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10月1~3日, 2009
- ⑩ 山本英一郎, 山野泰穂, 鈴木 拓, 野島正寛, 丸山玲緒, 時野隆至, 今井浩三, 篠村恭久, 豊田 実. 大腸発癌における DNA メチル化の役割. 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10月1~3日, 2009

[図書] (計 2 件)

- ① 鈴木 拓, 豊田 実: バイサルファイト PCR 法. 改訂第 5 版 新遺伝子工学ハンドブック, 村松正實, 山本 雅, 岡崎康司 編. 東京, 羊土社. 2010, pp115-121
- ② Suzuki H, Toyota M, Kondo Y, Shinomura Y. Inflammation-related aberrant patterns of DNA methylation: detection and role in epigenetic deregulation of cancer cell transcriptome. Inflammation and Cancer. Methods and Protocols: Volume 2: Molecular Analysis and Pathways. Methods in Molecular Biology Edited by Serguei V. Kozlov. Humana Press, New York, USA. 2009,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 拓 (SUZUKI HIROMU)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20381254

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし