

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 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390255

研究課題名（和文） 消化器癌の網羅的 DNA メチル化解析による癌症例層別化

研究課題名（英文） Stratification of gastroenterological tumors by genome-wide analysis of DNA methylation alteration.

研究代表者

金田 篤志 (KANEDA ATSUSHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：10313024

研究成果の概要（和文）：胃癌は網羅的 DNA メチル化解析により 3 群のエピジェノタイプに分類され、EB ウィルス感染実験により EB ウィルス感染そのものが超高メチル化群の原因であることを証明した。大腸癌前癌病変を解析し、癌で認めた DNA メチル化エピジェノタイプは腺腫の段階ですでに完成しており、1%を占める鋸歯状腺腫が BRAF 変異と強く相関する高メチル化群の前癌病変であり、99%を占める非鋸歯状腺腫が KRAS 変異と強く相関する中メチル化群、および低メチル化群の 2 群の前癌病変であった。大腸異常陰窩は癌遺伝子変異はあったがメチル化異常の蓄積は非常に低レベルであった。

研究成果の概要（英文）：DNA methylation analysis on genome-wide scale revealed three distinct epigenotypes in gastric cancer and Epstein-Barr virus infection is the cause for extensive DNA methylation epigenotype. As for colorectal cancer, DNA methylation epigenotypes was found to be established already at adenoma stage; serrated adenoma showed high-methylation epigenotype with strong correlation to BRAF mutation, while non-serrated adenoma was classified into intermediate- and low-methylation epigenotypes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

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：小腸大腸肛門外科学

1. 研究開始当初の背景

DNA 塩基配列そのものではなくその修飾要素として遺伝子を発現調節し、細胞分裂の際に娘細胞に維持・伝達される修飾情報をエピジェネティクスと呼ぶ。その異常は突然変異などのジェネティック異常とともに癌発生に密接に関わる。多くの異常メチル化遺伝子が同定される中で、メチル化異常が多段階

発癌の中で、どの段階でどのような因果関係で発癌に関わるのか、その解明は急務の課題である。

申請者は、ゲノム網羅的な手法により DNA メチル化変化を検索、癌抑制遺伝子が同定できることを世界でも最も早く実証した一人である [Cancer Res 2002, 2004]。前回 H19-21 年度の基盤 B 研究においては、消化

器癌（大腸癌・肝癌）における遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化を詳細にマッピングした。大腸癌症例には3つのエピジェノタイプが存在し、高・中メチル化群はそれぞれ癌遺伝子 BRAF 変異・KRAS 変異と強く相関した。大腸癌には発生機序の異なる3つの群が存在し、また KRAS 変異(+)中メチル化群症例が最も予後不良であるなど、予後診断マーカーとしても重要と考えられた。大腸癌前癌病変や胃癌など他の癌種において同様に網羅的解析を行うことは、発癌機序の解明、癌リスク診断への応用等に非常に有用と考えられた。

2. 研究の目的

今研究では、前癌病変を含めた消化器癌病変の DNA メチル化異常を網羅的に解析し、消化器癌を層別化することを目的とする。

3. 研究の方法

次世代高速シーケンサー、タイリングアレイ、Infinium ビーズアレイを用いて DNA メチル化部位をゲノム網羅的に解析し、質量分析器 MassARRAY、パイロシーケンサーを用いて定量的メチル化解析を行う。

大腸癌において、前癌病変として隆起型腺腫 51 例（鋸歯状腺腫 3 例、非鋸歯状従来型腺腫 48 例）、大腸異常陰窩 13 例、正常粘膜 26 例を、前研究で樹立したエピジェノタイプマーカー 18 個を用いて MassARRAY による定量的メチル化解析を行った。

胃癌において、胃癌 51 症例の網羅的メチル化状態を Infinium ビーズアレイを用いて同定し、パイロシーケンサーを用いて定量解析した。EB ウィルス陽性胃癌細胞株のメチル化状態をゲノム網羅的に解析する目的でメチル化 DNA 免疫沈降 (MeDIP) を行い次世代シーケンサーを用いて沈降物をディープシーケンスした。

4. 研究成果

(1) 大腸腺腫の解析

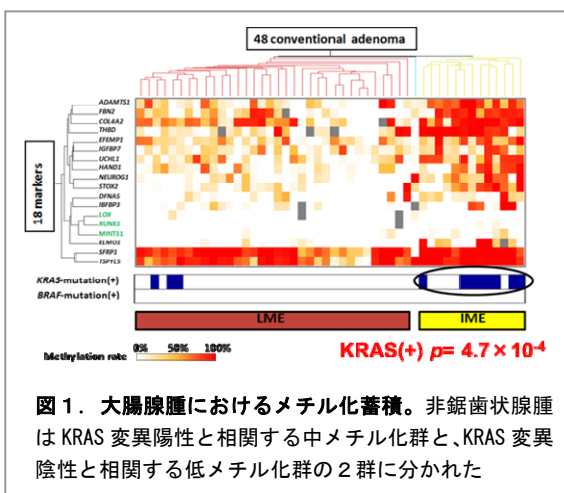


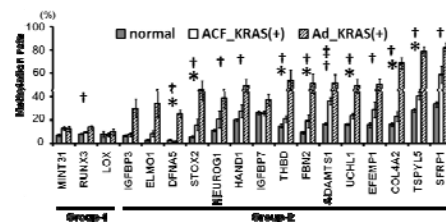
図 1. 大腸腺腫におけるメチル化蓄積。非鋸歯状腺腫は KRAS 変異陽性と相関する中メチル化群と、KRAS 変異陰性と相関する低メチル化群の 2 群に分かれた

大腸癌発生において、癌遺伝子変異とエピジェノタイプの形成はいつ成立するのか解明する目的に KRAS 変異、BRAF 変異、エピジェノタイプマーカー 18 個の DNA メチル化を正常大腸粘膜、異常陰窩、大腸腺腫について解析した。鋸歯状腺腫は BRAF 変異陽性と高メチル化群を示し、高メチル化群大腸癌の前癌病変と思われた。非鋸歯状従来型腺腫は、KRAS 変異陽性と相関する中メチル化群と、KRAS 変異陰性と相関する低メチル化群の 2 群に分かれた (図 1)。

これまで従来型の非鋸歯状腺腫には特定のメチル化形質の報告はなく、また KRAS 変異と相関するメチル化パターンも知られていなかったが、中メチル化群、低メチル化群の大腸癌の前癌病変は従来型非鋸歯状腺腫であることが示唆された。

(2) 大腸異常陰窩の解析

正常、異常陰窩(ACF)に対し腺腫で高メチル化



腺腫～Stage IVまでメチル化蓄積は変わらない

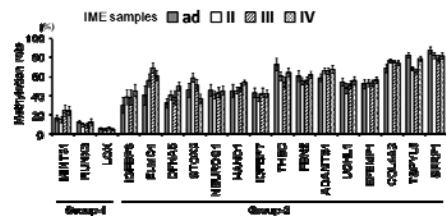


図 2. 正常、大腸異常陰窩、大腸腺腫、大腸癌におけるメチル化蓄積。

それに対し異常陰窩では癌遺伝子変異は見られるもののメチル化量は非常に低かった。メチル化異常は腺腫の段階で有意に高くなっていった (図 2)。

しかし腺腫と癌ではメチル化量に全く差がなかった。エピジェノタイプの形成は腺腫の段階で完成していると考えられた。癌遺伝子変異のみが起きて限局的増殖にとどまっている異常陰窩と、そこにメチル化異常が加わり腫瘍性増殖を呈した腺腫・癌、という構図が考えられた。

[Yagi et al, *Am J Pathol* 2012]

(3) 胃癌のエピジェノタイプマッピング

胃癌は、以前のメチル化網羅的解析で新規メチル化標的遺伝子の同定や高メチル化症例群と低メチル化症例群の存在を報告している (*Cancer Res* 2002)。今回、Infinium ビ

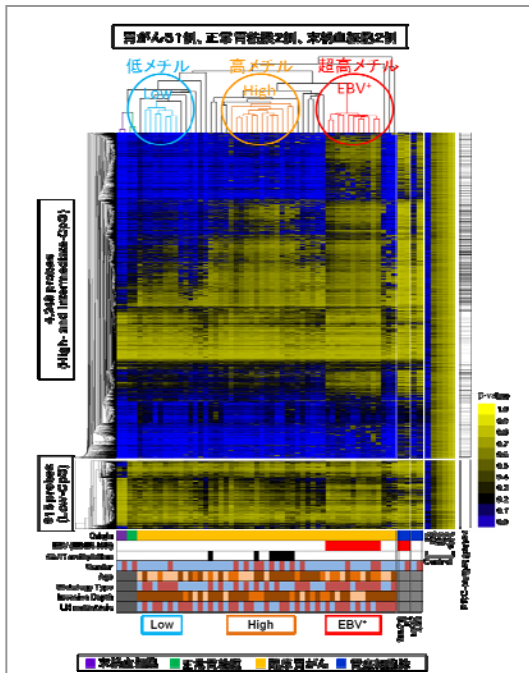


図3. 胃癌エピジェノタイプ。超高メチル化症例は全てEBウイルス陽性胃癌であった。

ーズアレイを用いて 51 症例の胃癌の DNA メチル化を網羅的に解析した。階層的クラスタリングを行うと、従来より申請者が指摘していた高メチル化群と低メチル化群だけでなく、超高メチル化群ともよぶべき第3番目のエピジェノタイプの存在がわかった (図3)。エピジェノタイプと多因子との相関を解析すると、超高メチル化群の胃癌症例は全てEBウイルス陽性胃癌であり、逆にEBウイルス陽性胃癌は1例の例外もなく超高メチル化を呈した。

(4) EBウイルスによるメチル化

低メチル化群の胃癌細胞株にEBウイルスを感染させると、18週以内に超高メチル化が誘導され、新規メチル化標的遺伝子は発現抑制された。胃癌の二大病因としてピロリ菌とEBウイルスが知られるが、その病因の1つが胃癌エピジェノタイプの成立に原因として深く関わっていることが証明された。

[Matsusaka et al. *Cancer Res* 2011]

(5) ウィルスゲノムのメチル化

胃癌細胞に感染しているEBウイルスはI型潜伏感染を示すことが知られ、ウィルスゲノムの多くの領域がメチル化によりサイレンシングされ、メチル化されない一部のEBウイルス遺伝子しか発現していないことが知られる。実際EBウイルス陽性胃癌細胞株をMeDIP-seq解析すると、発現している潜伏遺伝子領域以外はほとんどメチル化されていた (図4)。

しかしこれら発現している潜伏遺伝子を

1つ1つ胃癌細胞で強制発現しても異常メチル化は誘導されなかった。各ウィルス遺伝子よりむしろ、ウィルス感染そのもの、ウィルス感染に対する宿主細胞の防御機構が重要と考えられた。実際、EBウイルス(-)胃癌細胞株AGSは超高メチル化を呈しており、EBウイルス因子がなくても宿主因子だけでもこのメチル化を誘導しうると考えられた。また、胃癌だけでなく、ウィルスゲノムのメチル化が広範囲に及ぶI型潜伏はBurkittリンパ腫においても認められ、やはり宿主ゲノム広範囲なメチル化が生じた。ウィルスゲノムメチル化のほとんどないIII型潜伏を起こす不死化リンパ球では宿主ゲノムのメチル化は生じない (図4)。ウィルス感染に対し、ウィルスゲノムをメチル化する宿主細胞の防御機構が過って宿主ゲノムにまで及ぶことが、新規メチル化に関与していると考えた。

[Kaneda et al. *Cancer Res* 2012]

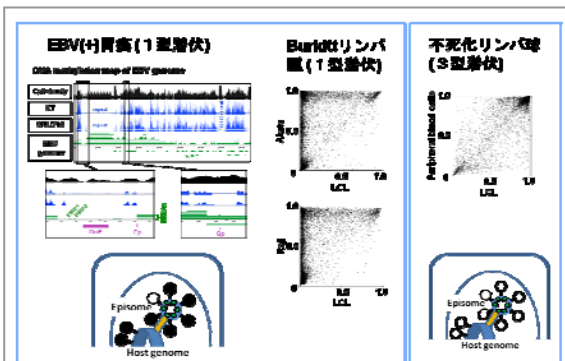


図4. ウィルスゲノムと宿主ゲノムのメチル化。ウィルスゲノムが広範囲にメチル化されている胃癌やBurkittリンパ腫において宿主ゲノムのメチル化が認められた。

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10件)

①Deng, Y. B., Nagae, G., Midorikawa, Y., Yagi, K., Tsutsumi, S., Yamamoto, S., Hasegawa, K., Kokudo, N., Aburatani, H., and Kaneda, A. † (2010) Identification of genes preferentially methylated in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 101, 1501-1510.

②Kaneda, A. †, and Yagi, K. (2011) Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci.* 102, 18-24.

③Matsusaka, K., Kaneda, A. †, Nagae, G., Ushiku, T., Kikuchi, Y., Hino, R., Uozaki, H., Seto, Y., Takada, K., Aburatani, H.,

and Fukayama, M. (2011) Classification of Epstein-Barr virus positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. *Cancer Res.* 71,7187-7197. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1349

④ Yagi, K., Takahashi, H., Akagi, K., Matsusaka, K., Seto, Y., Aburatani, H., Nakajima, A., and Kaneda, A. † (2012) Intermediate methylation epigenotype and its correlation to KRAS mutation in conventional colorectal adenoma. *Am. J. Pathol.* 180,616-625. doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.010

⑤ Kaneda, A. †, Matsusaka, K., Aburatani, H., and Fukayama, M. (2012) Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. *Cancer Res.* 72,3445-3450. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-3919

〔学会発表〕 (計 27 件)

① Kaneda A. Three epigenotypes of colorectal cancer revealed by epigenotyping through quantitative DNA methylation analysis The 3rd World Cancer Congress 2010. 2010年6月23日 Singapore, Republic of Singapore

② 八木浩一、金田篤志ら. 定量的メチル化解析による大腸癌・腺腫のエピジェノタイピング第69回日本癌学会学術総会 2010年9月22日大阪

③ Keisuke Matsusaka, Atsushi Kaneda, et al. Markedly high methylation epigenotype identified in EB virus(+) gastric cancer and its induction by EB virus infection 第70回日本癌学会総会2011.10.3名古屋

④ 金田篤志. エピゲノム異常と大腸癌発生 岩手県大腸癌病理研究会 2012.6.15盛岡

⑤ 金田篤志. 大腸癌における3群のエピジェノタイプと予後. 日本消化器関連学会週間(JDDW). 2012.10.11神戸

⑥ 金田篤志ら. 胃癌におけるDNA超高メチル化群とEBウイルス感染. 第23回日本消化器癌発生学会総会シンポジウム 2012.11.16徳島

⑦ Atsushi Kaneda. Infection of Epstein-Barr virus is epigenetic driver of tumorigenesis. 2nd Japanese-French Cancer Workshop 2012.11.30徳島

⑧ Atsushi Kaneda. Accumulation of epigenetic alteration involved in gastrointestinal carcinogenesis. 2nd Joint Global COE Symposium of The IMSUT & RCAST Global COE, The University of Tokyo and Chiba University Global COE “Current and Future Trends in Genome-based Immunity, Infection and Cancer” 2013.1.28 東京

〔図書〕 (計 1 件)

① Kaneda A. Cambridge University Press Cancer classification by genome-wide and quantitative DNA methylation analyses. In “Epigenomics From Chromatin Biology to Therapeutics”, Krishnarao Appasani Ed. 2012 293-305

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 癌細胞の存否を判定する方法および癌患者の予後を判定する方法.

発明者: 金田篤志ら

権利者: 東京大学など

種類: 特許

番号: PCT/JP2010/061164

出願年月日: 2010/6/30

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 篤志 (KANEDA ATSUSHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号: 10313024

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

堤 修一 (TSUTSUMI SHUICHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号: 30345152

宇於崎 宏 (UOZAKI HIROSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 10296246