

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22590333

研究課題名(和文) 胸膜中皮腫発生・進展に関わるエピジェネティクス変化の病理病態解析

研究課題名(英文) Epigenetic Analysis for Biphasic Morphology of Malignant Mesothelioma

研究代表者

出射 由香 (IDEI, YUKA)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90464271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティクス制御機構は、がんの個性を解明する上で、ポストゲノム時代の重要な研究課題である。悪性中皮腫の病理組織の特徴である2相性、即ち上皮様構造(癌腫様構造)と肉腫様構造の共存および相互移行に着目した。病理組織標本の特定部位をサンプリングし、微小検体からDNA解析、シトシンメチル化解析を行う方法を実践し、上皮結合部位に発現するE-カドヘリンのメチル化による発現制御の解析に努めた。上皮、間葉の2相性をもたらす分子機構に関して、中皮腫と同様に2相性の組織像を特徴とする滑膜肉腫の培養細胞株を用いた検討で、cancer testis antigen遺伝子の関与の可能性を示唆する所見を得た。

研究成果の概要(英文)：Gene regulation by DNA methylation, known as the epigenetic pathway play critical roles in carcinogenesis and tumor progression. Malignant mesothelioma, now increasing incidence among people with asbestos exposure, is often morphologically biphasic (epithelioid and sarcomatoid pattern). To focus the mechanism of transition from epithelioid to sarcomatoid components, we established the method to analyze DNA methylation from microdissected tissue samples; the E-cadherin expression and CpG methylation of its promoter was analyzed. As a model of "monophasic vs. biphasic phenotypes", we then analyzed gene expression profile of synovial sarcoma cell lines. In tumor cells with biphasic phenotype, some genes of cancer testis antigens were highly expressed and regulation through Runt domains may be involved. We will continue the morphology-based analysis using the tissue samples of malignant mesothelioma and synovial sarcoma.

研究分野：病理学

キーワード：二相性 エピジェネティクス 遺伝子プロモータ DNAメチル化 病理組織

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクス制御機構は、再生医療、分子標的癌治療へと展開しているポストゲノム時代の重要な研究課題である。本研究課題では、アスベスト曝露後の悪性中皮腫に焦点を当て、酸化ストレスと DNA メチル化集積との関連について、病理組織検体による DNA メチル化の評価をめざすものである。

多くの悪性中皮腫症例の組織形態、即ち、腫瘍組織の上皮様構造（癌腫様構造）と肉腫様構造の 2 相性に着目して、病理標本の特定部位から切り出した微量検体での DNA メチル化検出の検討を行う。癌腫様部分では腫瘍細胞相互の細胞結合が見られ、肉腫形態の部分では、腫瘍細胞は散在性で細胞結合がない。上皮細胞結合に関わる E-カドヘリン遺伝子プロモータ領域のメチル化による発現抑制について検討する。腫瘍細胞の増殖との関連については、癌抑制遺伝子のひとつである P16 の発現、遺伝子プロモータ領域のメチル化について、組織検体での解析を目指す。

2. 研究の目的

- (1) 悪性中皮腫の二相性について、E-カドヘリンの発現制御を検討する。
- (2) 腫瘍組織の特定部位の微小サンプルから遺伝子解析、DNA メチル化解析を行うアッセイ系を確立する。
- (3) 「単相性と二相性」を制御する分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 中皮腫組織の二相性にに基づき、上皮様構造成分と、肉腫様成分における E-カドヘリン発現を免疫組織化学にて評価した。各々の組織を病理組織標本よりサンプリングして、E-カドヘリン遺伝子プロモータ領域のメチル化を検出する MSP (メチル化特異的 PCR) 法を行った。

(2) 病理組織検体の一部から効率よく DNA 解析やメチル化解析を行う方法を進める一方、病理組織切片上で、特定部位のシトシンメチル化の有無を検出する手法の検討を行った。

(3) 「二相性組織形態」の実験モデルとして、単相性、および二相性を示す滑膜肉腫の培養細胞を用いて遺伝子発現を検討する。

4. 研究成果

(1) 上皮様成分では腫瘍細胞相互の結合部に E-カドヘリン蛋白が発現するが、肉腫様成分では、E-カドヘリン発現を認めず、MSP (メチル化特異的 PCR) により、肉腫成分優位に E-カドヘリン遺伝子プロモータ領域のメチル化を認めた。さらに、病理組織標本上で、両者の移行部のサンプリングを行い、メチル化部位を解析する研究手法が必要と思われた。

(2) 組織検体の一部の微量サンプルから、DNA 解析、メチル化解析を行うために、アガロースビーズに包埋して、効率よく遺伝子検索を行う実験条件の適正化を行った。また、癌抑制遺伝子のひとつである P16 の発現、遺伝子プロモータ領域のメチル化について、病理組織検体からシトシンメチル化を解析する実験系を整備した。

(3) 中皮腫と共通して二相性組織形態を呈する滑膜肉腫の培養細胞では、cancer testis antigens(CTA)に属する遺伝子の発現の亢進を認め、Runt domain に結合する転写因子による発現誘導を示唆する所見を得た。

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 9 件)

Nakagawa M, Kitazawa R, Kondo T, Ninomiya K, Okita M, Haraguchi R, Kitazawa S. Duodenal gastric heterotopia, sporadic or fundic gland polyp-associated, frequently carries β -catenin mutation. *Virchows Archiv*, 査読有 2014, 465 (3), 253-256.

Watanabe T, Kitazawa R, Mizuno Y, Kuwahara N, Ito C, Sugita A, Haraguchi R, Kitazawa S. BOB.1-positive Classical Hodgkin's Lymphoma carries Hypermethylation of Gene Promoter as Molecular Marker of Gene-silencing Memory Acta *Histochem Cytochem*, 査読有(2014), 47 (3), 125-131.

Fujiishii K, Kitazawa R, Nagai Y, Watanabe T, Bando K, Kobayashi S, Yakushijin Y, Haraguchi R, Kitazawa S. Acquisition of MYD88 L265P mutation during treatment of diffuse large B-cell lymphoma of parotid gland. *Virchows Archiv*, 査読有 464(1), 121-124, 2014.

Kuwahara N, Kitazawa R, Fujiishi K, Nagai Y, Haraguchi R, Kitazawa S. Gastric adenocarcinoma arising in gastritis cystica profunda presenting with selective loss of KCNE2 expression. *World Journal of Gastroenterology*, 査読有 19(8):1314-1317, 2013.

Makita K, Kitazawa R, Fujiishi K, Nakagawa M, Haraguchi R, Kitazawa S. Cdx2 expression and its promoter methylation during metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in Barrett's esophagus. *World Journal of Gastroenterology*, 査読有

19(4):536-41, 2013.

Nakagawa M, Kitazawa R, Kuwahara N, Yoshida K, Haraguchi R, Kitazawa S. Efficient genetic analysis of microdissected samples by agarose-bead method: Alterations of β -catenin gene in fundic gland polyp and heterotopic gastric mucosa of duodenum. *Acta Histochem Cytochem*, 査読有 46(1), 19-24, 2013.

Kitazawa S, Kondo T, Mori K, Yokoyama N, Matsuo M, Kitazawa R. A p.D116G mutation in CREB1 leads to novel multiple malformation syndrome resembling CrebA knockout mouse. *Human Mutation*, 査読有 2012, 33(4):651-654.

北澤 荘平, 近藤 武史, 中川 みく, 藤石 琴, 原口 竜摩, 北澤 理子. 『技術講座』(病理) 病理標本を用いた DNA シークエンスの方法と実際. 検査と技術 査読なし 40 巻 1 号 24-29. 2012.

Khin SS, Kitazawa R, Kondo T, Idei Y, Fujimoto M, Haraguchi R, Mori K, Kitazawa S. Epigenetic Alteration by DNA Promoter Hypermethylation of Genes Related to Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Signaling in Cancer. *Cancers*, 査読有 3(1), 982-993, 2011.

〔学会発表〕(計 10 件)

水野洋輔, 北澤理子, 杉田敦郎, 久野美子, 原口竜摩, 北澤荘平. 単相性と二相性の滑膜肉腫における遺伝子発現の違い. 第 103 回日本病理学会総会 2014.4.24-26(広島国際会議場・ANA クラウンプラザホテル、広島)

二宮鴻介, 北澤荘平, 沖田将慶, 菊澤里佳子, 伊藤才季, 原口竜摩, 北澤理子. ヒト副甲状腺二次性過形成における Padlock probe を用いた組織切片上でのメチル化検出. 第 103 回日本病理学会総会 2014.4.24-26(広島国際会議場・ANA クラウンプラザホテル、広島)

北澤荘平, 原口竜摩, 北澤理子
「エピジェネティック因子の組織細胞化学」 DNA メチル化部位検出の形態学への展開. 第 54 回日本組織細胞化学会総会 シンポジウム 2013.9.27-28 (航空会館、東京)

北澤理子, 向井智美, 永井由紗, 近藤武史, 原口竜摩, 北澤荘平. 破骨細胞分化因子受容体 RANK の新規変異体の解析. 第 102 回日本病理学会総会 2013.6.6-8(ロイトン札幌・さっぽろ文芸館、札幌)

Kitazawa R, Mukai S, Nagai N, Haraguchi R, Kitazawa S. Identification and Analysis of Function of a Novel Splicing Variant of Receptor Activator of NF- κ B. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2013.5.28-6.1 (Kobe, Japan)

Kitazawa S, Haraguchi R, Watanabe T, Kondo T, Kitazawa R. Detection of DNA methylation in pathology section. The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Symposium. 2012. 8.26-29 (Kyoto Japan)

Kitazawa R, Kondo T, Haraguchi R, Kitazawa S. Detection of RANKL mRNA in Osteolytic Bone Lesions. The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012. 8.26-29, (Kyoto Japan)

Haraguchi R, Kitazawa R, Yamada G, Kitazawa S. Spatiotemporal expression of Tbx18 during endochondral bone formation. The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012. 8.26-29, (Kyoto Japan)

北澤理子, 向井智美, 石井淳子, 近藤武史, 森 清, 原口竜摩, 北澤荘平. 破骨細胞分化因子 RANKL による受容体 RANK の発現制御機構. 第 30 回日本骨代謝学会総会 2012.7.19-21(新宿京王プラザホテル、東京)

中川みく, 北澤理子, 原口竜摩, 北澤荘平. アガローズビーズ法による微小組織切片からの遺伝子解析法. 第 101 回日本病理学会総会 2012.4.26-28(新宿京王プラザホテル、東京)

〔図書〕(計 2 件)

Kitazawa S, Mori K, Idei Y, Fujimoto M, Kito K, Haraguchi R, Abe Y, Kondo T and Kitazawa R, (Ed. A. Méndez-Vilas A, Dí'az J). In situ detection of specific gene expression during and immediately after transcription at electron microscopic level. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, p100-p110, Published by Formatex Research Center, Spain. Volume 1 ISBN (13): 978-84-614-6189-92010.

北澤荘平, 森 清, 近藤武史, 北澤理子. 病理と臨床 29 巻臨時増刊号「病理診断に役

立つ分子生物学」第1部-4 DNA シークエンス, 文光堂, 東京, 16-20, 2011.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出射 由香 (Idei, Yuka)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号: 90464271

(2) 研究分担者

北澤 荘平 (Kitazawa, Sohei)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90186239

北澤 理子 (Kitazawa, Riko)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 00273780

(3) 連携研究者

該当なし