

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23240129

研究課題名(和文)大規模エピゲノム解析に基づく革新的消化器癌診断法の開発

研究課題名(英文)Development of novel gastrointestinal cancer diagnostic system based on large epigenome analysis.

研究代表者

今井 浩三 (IMAI, Kohzoh)

東京大学・医科学研究所・特任教授

研究者番号：60117603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,000,000円、(間接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌細胞のエピゲノムおよびトランスクリプトームを解析することで、エピジェネティックに不活化されたマイクロRNA遺伝子を同定した。大腸前癌病変および早期癌のエピゲノム・ゲノム解析を行うことで、早期発見マーカー候補となりうるDNAメチル化異常を同定した。さらに大腸癌前癌病変における内視鏡所見、病理所見、DNAメチル化異常の間の新たな相関を明らかにした。また胃癌背景胃粘膜におけるエピゲノム解析から、胃癌リスクマーカー候補となるDNAメチル化異常を同定した。原発性肝癌におけるエピゲノム異常解析から、新たな癌特異的DNAメチル化異常を複数同定した。

研究成果の概要(英文)：Through analyzing epigenome and transcriptome in colorectal cancer (CRC) cells, we identified a number of microRNA genes which were epigenetically silenced in CRC. By analyzing colorectal premalignant lesions and early CRC tissues, we identified novel DNA methylation alterations, which could be potential biomarkers for early detection of CRCs. Moreover, we discovered a novel relationship between tumor surface microstructure, pathological findings and molecular alterations in the colorectal premalignant lesion. We carried out epigenome analysis the background gastric mucosa of primary gastric cancer (GC), and identified novel DNA methylation changes which could be novel GC risk markers. Finally, by performing epigenome analysis in primary hepatocellular carcinoma (HCC), we discovered novel DNA methylation changes, which could be novel HCC markers.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、腫瘍診断学

キーワード：胃癌 大腸癌 肝癌 エピゲノム DNAメチル化 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

癌におけるエピジェネティクスの重要性は多くの研究者が注目するところであり、国内外で盛んに研究が進められている。我々はこれまで消化器癌におけるエピジェネティックな異常を解明し、診断・治療へ応用することを目指した研究を行ってきた。マイクロアレイを用いた癌のエピゲノム解析によって多数の癌関連遺伝子を同定し、Wnt シグナル、Ras シグナル、p53 シグナルなど、癌において重要なあらゆるシグナル経路において DNA メチル化異常が関与していることを明らかにした。また、大腸癌において DNA メチル化によってサイレンシングされる microRNA (以下 miRNA) 遺伝子を同定した。多くのメチル化異常は H. pylori 胃炎や潰瘍性大腸炎のような前癌状態において既に発生していることや、CpG アイランドメチル化形質(CIMP)と大腸癌臨床病理像との重要な関係を明らかにした。さらに大腸癌剥離細胞由来のメチル化を洗浄液から検出することで大腸癌浸潤予測が可能であることを報告した。

これらのことから、メチル化異常は癌のリスク診断、早期発見、さらには抗癌剤効果予測や予後予測などの質的診断に極めて有効であると考えられる。癌においてメチル化異常を来す遺伝子は数百～1000 個以上に及ぶため、癌エピゲノム解析が進めばハイリスク群の設定、超早期診断、テーラーメイド医療に必須な癌の個別診断につながることを期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで我々が蓄積した癌エピゲノム解析を進展させることで、新たな消化器癌エピゲノム診断法の開発を目的とする。そのために、マイクロアレイ解析およびシーケンス解析を組み合わせ、消化器癌の遺伝子発現、DNA メチル化、ヒストン修飾の統合的解析を行い、臨床病理学的因子と組み合わせ、診断マーカー候補となる遺伝子および分子を同定することを目指した。

## 3. 研究の方法

Methylated CpG island Amplification microarray (MCAM)法により網羅的な CpG アイランドメチル化解析を行った。詳細なメチル化解析をバイサルファイト・シーケンス (bisulfite-seq)法により行った。同定した各遺伝子のメチル化を、メチル化特異的 PCR (MSP) 法、バイサルファイト・パイロシーケンス法により解析した。クロマチン免疫沈降(ChIP)・シーケンス法(ChIP-seq)により、ヒストン H3 リジン 4 トリメチル化 (H3K4me3) およびヒストン H3 リジン 27 トリメチル化 (H3K27me3) を解析した。アレイ CGH 法により、染色体コピー数異常の解析を行った。遺伝子発現プロファイルをマ

イクロアレイ(Agilent)により解析し、miRNA 発現プロファイルを TaqMan low density array (Applied Biosystems)および miRNA マイクロアレイ(Agilent)により解析した。アレイデータの解析には Gene Spring GX ソフトウェア(Agilent)を用いた。MTT アッセイ、コロニーフォーメーションアッセイ、Wound healing アッセイ、マトリゲル浸潤アッセイにより遺伝子の機能解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 大腸癌における noncoding RNA 遺伝子エピジェネティクス異常の網羅的解析

大腸癌細胞におけるヒストン修飾 (H3K4me3 および H3K27me3) を ChIP-seq 法により解析することで、233 個の miRNA 遺伝子の転写開始点領域候補を同定し、エピジェネティックに不活化された miRNA 候補として 47 個を同定した。さらにその中から、大腸癌において CpG アイランドメチル化を示す miRNA 遺伝子を 22 個同定した。中でも miR-1-1 遺伝子上流の CpG アイランドは、大腸腺腫および大腸癌において高頻度 (70～80%) にメチル化しており、大腸発癌早期に発生する変化であると考えられた。また miR-1 は、大腸癌細胞の増殖、遊走、浸潤を抑制する効果を示した。大腸癌細胞に miR-1 を導入して発現アレイ解析を行った結果、miR-1 は遺伝子発現プロファイルに大きな影響を与えることが示された。さらに miR-1 の標的遺伝子として ANXA2 および BDNF を同定した。

(2) 大腸がんの進展様式と相関する遺伝子メチル化

大腸癌の進展様式に關与する遺伝子メチル化を明らかにするため、腫瘍径が大きい (2cm 以上) 側方進展型で非浸潤性の大腸癌臨床例と、腫瘍径が小さい (2cm 未満) 浸潤性大腸癌臨床例のメチル化を比較した。その結果、ニューロテンシン受容体 1 型 (NTSR1) 遺伝子のメチル化は、非浸潤性がんにおいて高度だが、浸潤がんでは低レベルであることを明らかにした。機能解析の結果、NTSR1 の過剰発現によって大腸がん細胞のコロニー形成および浸潤能が増加し、逆に NTSR1 のノックダウンによってコロニー形成および浸潤能の抑制が認められた。また NTSR1 のメチル化を示さない大腸がん症例は、メチル化を示す症例と比較して予後不良であった。これらの結果から、NTSR1 のメチル化は大腸がんの浸潤性および予後予測因子となりうることを示された。

(3) 大腸前がん病変の網羅的メチル化解析

DNA メチル化異常は発癌の早期に発生することが知られており、前癌病変におけるメチル化異常の詳細を明らかにすることは早期診断マーカーへの応用に重要である。そこで大腸腺腫 (n=16) 粘膜内癌 (n=14) 大腸

癌組織 (n=28) を対象に網羅的 DNA メチル化解析を行った。その結果、大腸腺腫の一群はすでに CpG island methylator phenotype (CIMP) を獲得していることを明らかにした。対照的に、遺伝子変異および染色体コピー数異常などジェネティックな変化の多くは粘膜内癌以降に発生していた。さらにジェネティクス・エピジェネティクス異常の統合解析から、CIMP 陽性大腸癌と AKT/PIC3CA パスウェイ遺伝子異常との相関を明らかにした。また大腸発癌早期にメチル化する遺伝子として KCN1、IGF2BP1、MEOX2 など新たな同定した。

(4) 大腸腫瘍の形態とメチル化異常の関連分子異常をマーカーとして応用するために、他の臨床検査結果と分子異常の相関を明らかにすることは重要である。そこで大腸腫瘍 (n=122) の消化管内視鏡検査所見、病理検査所見と分子異常を統合的に解析した。大腸腫瘍では、拡大内視鏡によるピットパターン分類が悪性度診断に有用である。今回我々は、Type II ピットに類似しながらも、円形に開いた形状のピットパターンが、BRAF 変異陽性かつ CIMP 陽性の鋸歯状腺腫にきわめて特異的に見られることを見だし、これを Type II-Open ピットと命名した。この知見は、分子異常と腫瘍の形態の興味深い関連を明らかにするとともに、CIMP 陽性大腸がんの前癌病変を効率的に同定しうる診断法につながることを期待される。

(5) 胃癌背景粘膜の網羅的メチル化解析によるリスクマーカー同定

ヘリコバクターによる胃炎、胃粘膜萎縮、腸上皮化生は胃癌リスクを上昇させることが知られている。胃癌リスクマーカーとなりうる分子異常を同定する目的で、胃癌背景胃粘膜における DNA メチル化を解析した。その結果、RAFGRF1、GALNT14、SOX5 を含む複数の遺伝子メチル化を同定した。中でも RASGRF1 メチル化は胃癌細胞および胃癌背景胃粘膜において顕著に上昇しており、胃癌リスクマーカーとなり得ることが示された。また機能解析の結果、RASGRF1 は新たな胃癌抑制遺伝子候補であることが示された。

(6) 肝がんの網羅的メチル化解析

原発性肝癌 (HCC) における DNA メチル化異常を明らかにするため、16 例の HCC 臨床例 (HBV 陽性 4 例、HCV 陽性 5 例、HBV/HCV 陰性 7 例) を対象に網羅的 DNA メチル化解析を行った。その結果、メチル化遺伝子の数は HCV 陽性 HCC において最多であり (平均 342 遺伝子) 次いで HCV 陽性 HCC (平均 332 遺伝子) HBV/HCV 陰性 HCC で最も少ない (平均 259 遺伝子) ことが明らかとなった。いずれの HCC においても高頻度にメチル化する遺伝子として KLHL35、PAX5、PENK、SPDYA を同定した。これらの遺伝子

メチル化はがん特異的であり、HCC 腫瘍マーカー候補であることが ROC 曲線解析から示された。

## 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 25 件)

1. Nasuno M, Arimura Y, Nagaiishi K, Isshiki H, Onodera K, Nakagaki S, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Mesenchymal stem cells cancel azoxymethane-induced tumor initiation. *Stem Cells* 32:913-925, 2014. 査読有 doi: 10.1002/stem.1594.
2. Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Noshio K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, Suzuki H, Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous gastric cancer risk. *J Gastroenterol* [Epub ahead of print], 2013. 査読有
3. Watanabe S, Arimura Y, Nagaiishi K, Isshiki H, Onodera K, Nasuno M, Yamashita K, Idogawa M, Naishiro Y, Murata M, Adachi Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors. *J Gastroenterol* 49:270-282, 2014. 査読有 doi: 10.1007/s00535-013-0901-3.
4. Adachi Y, Ohashi H, Imsumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, Taniguchi H, Noshio K, Suzuki H, Sasaki Y, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. The effect of IGF-I receptor blockade for human esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Tumour Biol* 35:973-985, 2014. 査読有 doi: 10.1007/s13277-013-1131-2.
5. Shimizu T, Suzuki H, Nojima M, Kitamura H, Yamamoto E, Maruyama R, Ashida M, Hatahira T, Kai M, Masumori N, Tokino T, Imai K, Tsukamoto T, Toyota M. Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. *Eur Urol* 63:1091-1100, 2013. 査読有 doi: 10.1016/j.eururo.2012.11.030.
6. Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T,

- Ashida M, Kai M, Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, Toyota M, Itoh F, Sugai T. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 52:140-149, 2013. 査読有 doi: 10.1002/gcc.22013.
7. Kato N, Yamamoto H, Adachi Y, Ohashi H, Taniguchi H, Suzuki H, Nakazawa M, Kaneto H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y. Cancer detection by ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 methylation in pancreatobiliary fluids. *World J Gastroenterol* 19(11): 1718-1727, 2013. DOI 10.3748/wjg.v19.i11.1718.
  8. Nishioka M, Ueno K, Hazama S, Okada T, Sakai K, Suehiro Y, Okayama N, Hirata H, Oka M, Imai K, Dahiya R, Hinoda Y. Possible involvement of Wnt11 in colorectal cancer progression. *Mol Carcinog* 52:207-217, 2013. 査読有 doi: 10.1002/mc.21845.
  9. Arimura Y, Isshiki H, Onodera K, Nagaiishi K, Yamashita K, Sonoda T, Matsumoto T, Takahashi A, Takazoe M, Yamazaki K, Kubo M, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Characteristics of Japanese inflammatory bowel disease susceptibility loci. *J Gastroenterol*, Aug 13. [Epub ahead of print], 2013.
  10. Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Noshō K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, Nishida T, Bamba T, Kanda T, Ajioka Y, Taguchi T, Okahara S, Takahashi H, Nishida Y, Hosokawa M, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 72: 1126-1136, 2012. 査読有 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1803.
  11. Kimura T, Yamamoto E, Yamano HO, Suzuki H, Kamimae S, Nojima M, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Takagi R, Kato R, Harada T, Suzuki R, Maruyama R, Kai M, Imai K, Shinomura Y, Sugai T, Toyota M. A novel pit pattern identifies the precursor of colorectal cancer derived from sessile serrated adenoma. *Am J Gastroenterol* 107: 460-469, 2012. 査読有 doi: 10.1038/ajg.2011.457.
  12. Maruyama R, Suzuki H, Yamamoto E, Imai K, Shinomura Y. Emerging links between epigenetic alterations and dysregulation of noncoding RNAs in cancer. *Tumour Biol* 33: 277-85, 2012. 査読有 doi: 10.1007/s13277-011-0308-9.
  13. Takamaru H, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Suzuki R, Yamamoto H, Kai M, Tokino T, Sugai T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Aberrant methylation of RASGRF1 is associated with an epigenetic field defect and increased risk of gastric cancer. *Cancer Prev Res* 5: 1203-1212, 2012. 査読有 doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0056.
  14. Yamamoto E, Suzuki H, Yamano HO, Maruyama R, Nojima M, Kamimae S, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Takagi R, Harada T, Suzuki R, Sato A, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Sugai T, Imai K, Shinomura Y, Toyota M. Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. *Am J Pathol* 181: 1847-1861, 2012. 査読有 doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.007.
  15. Yasui H, Ishida T, Maruyama R, Nojima M, Ikeda H, Suzuki H, Hayashi T, Shinomura Y, Imai K. Model of translational cancer research in multiple myeloma. *Cancer Sci*, 103:1907-1912, 2012 DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02384.x
  16. Shitani M, Sasaki S, Akutsu N, Takagi H, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto H, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Genome-wide analysis of DNA methylation identifies novel cancer-related genes in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 33: 1307-1317, 2012. 査読有 doi: 10.1007/s13277-012-0378-3.
  17. Ohashi H, Adachi Y, Yamamoto H, Taniguchi H, Noshō K, Suzuki H, Arimura Y, Imai K, Carbone DP, Shinomura Y. Insulin-like growth factor receptor expression is associated with aggressive phenotypes and has therapeutic activity in biliary tract cancers. *Cancer Sci* 103:252-261, 2012. 査読有 doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02138.x.
  18. Taniguchi H, Jacinto F.V., Villanueva A, Fernández AF, Yamamoto H,

- Carmona F.J, Puertas S, Marquez VE, Shinomura Y, Imai K, and Esteller M. Silencing of the Kruppel-like factor 2 by the histone methyltransferase EZH2 in human cancer. *Oncogene*, 31: 1988-1994. 2012. DOI: 10.1038/onc.2011.387.
19. Suzuki H, Takatsuka S, Akashi H, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Kai M, Yamano HO, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of microRNA genes in colorectal cancer. *Cancer Res* 71: 5646-5658, 2011. 査読有 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1076.
  20. Kamimae S, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Suzuki H, Ashida M, Hatahira T, Sato A, Kimura T, Yoshikawa K, Harada T, Hayashi S, Takamaru H, Maruyama R, Kai M, Nishiwaki M, Sugai T, Sasaki Y, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. Epigenetic alteration of DNA in mucosal wash fluid predicts invasiveness of colorectal tumors. *Cancer Prev Res* 4: 674-683, 2011. 査読有 doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0214.
  21. Li M, Li H, Adachi Y, Yamamoto H, Ohashi H, Taniguchi H, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. The efficacy of IGF-I receptor monoclonal antibody against human gastrointestinal carcinomas is independent of k-ras mutation status. *Clin Cancer Res* 17:5048-5059, 2011. 査読有 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3131.
  22. Li M, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Nakazawa M, Ohashi H, Tanuma T, Sukawa Y, Suzuki H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y. Co-expression of laminin  $\beta$ 3 and  $\gamma$ 2 chains and epigenetic inactivation of laminin  $\alpha$ 3 chain in gastric cancer. *Int J Oncol*, 39: 593-599. 2011. DOI: 10.3892/ij.2011.1048
  23. Sasaki S, Ishida T, Toyota M, Ota A, Suzuki H, Takaoka A, Yasui H, Yamamoto H, Takagi H, Maeda M, Seito T, Tsujisaki M, Shinomura Y, Imai K. Interferon- $\alpha/\beta$  and anti-fibroblast growth factor receptor 1 monoclonal antibody suppress hepatic cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 6: e19618, 2011. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0019618.
  24. 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* 24: 876-884, 2011. 査読有 doi: 10.1038/modpathol.2011.10.
  25. Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, Balint B, Siebert R, Taniguchi H, Yamamoto H, Hidalgo M, Tan AC, Galm O, Ferrer I, Sanchez-Cespedes M, Villanueva A, Carmona J, Sanchez-Mut JV, Berdasco M, Moreno V, Capella G, Monk D, Ballestar E, Ropero S, Martinez R, Sanchez-Carbayo M, Prosper F, Agirre X, Fraga MF, Graña O, Perez-Jurado L, Mora J, Puig S, Prat J, Badimon L, Puca AA, Meltzer SJ, Lengauer T, Bridgewater J, Bock C, Esteller M. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res*, 22(2):407-19. 2011. Doi: 10.1101/gr.119867.110.
- 〔学会発表〕(計 4 件)
1. 鈴木拓,山本英一郎,丸山玲緒,鈴木 亮,清水崇,原田拓,山野泰穂,野島正寛,高塚伸太郎,新沼猛,甲斐正広,篠村恭久,今井浩三. マイクロ RNA 遺伝子のエピジェネティクス異常と臨床応用. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3-5 日, 横浜市
  2. 谷口博昭,山本博幸,今井浩三. ヒストンメチル化酵素分子の発現亢進による乳癌細胞の悪性形質獲得. 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3-5 日, 横浜市
  3. 谷口博昭,山本博幸,伊東文生,今井浩三. ヒストンメチル化酵素分子の発現亢進による乳癌細胞の悪性形質獲得とその臨床応用. 第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会 10/02/2013 横浜市
  4. 谷口博昭,山本博幸,越川直彦,清木元治,今井浩三. ヒストンメチル化酵素分子の発現亢進による乳癌細胞の悪性形質獲得. 第 22 回日本がん転移学会学術集会 07/11/2013 松本市
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔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

<http://www.nctimsut.org/>

東京大学医科学研究所附属病院 抗体・ワクチンセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 浩三 (IMAI, Kohzoh)

東京大学・医科学研究所・特任教授

研究者番号：60117603

(2) 研究分担者

鈴木 拓 (SUZUKI, Hiromu)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20381254

谷口 博昭 (TANIGUCHI, Hiroaki)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：90563289