

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462035

研究課題名(和文) DNA脱メチル化異常を介した染色体不安定性のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Chromosomal instability induced by DNA demethylation alterations

研究代表者

鈴木 浩一 (Suzuki, Koichi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70332369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：年齢と共に増加する発癌リスクの要因としてゲノム損傷の蓄積が考えられます。その契機は遺伝子複製の際の染色体分配です。正常な染色体分配には染色体のセントロメア領域のメチル化が必須です。セントロメア領域は反復配列であるSatellite 配列より構成され、そこから転写されるnon-coding RNA であるSatellite transcript(SatA)により染色体の均等分配が司られます。我々は、セントロメア領域のメチル化異常によりSatA が過剰発現し、特定の染色体を標的として数的異常が生じる事を明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：Impairment of stability in chromosomal structure facilitates abnormal segregation of chromosome, increasing the risk of carcinogenesis. Segregation is managed by appropriate methylation, leading to heterochromatin structure at centromere. Insufficient methylation such as demethylation fails to heterochromatin due to overexpression of satellite alpha transcript (SatA), which is the non-coding RNA transcribed from satellite alpha sequences at centromere. We showed SatA expression was increased in colorectal cancer, in which satellite sequences were demethylated, resulting in chromosomal instability. We verified this machinery in vitro. The lentiviral vector expressing human SatA was constructed and transduced in cultured cells. Copy number alterations were observed at several chromosomes in transduced cells but not in mock cells. Alterations were frequently seen at chromosome 8q and 20q, which is consistent with the results in clinical specimens.

研究分野：腫瘍外科

キーワード：Satellite 遺伝子修飾異常 non-coding RNA セントロメア 染色体不安定性 染色体分配 加齢
ゲノム損傷

1. 研究開始当初の背景

癌の発生、進展には遺伝子配列の変化を伴う遺伝子異常とともに、DNAメチル化のような遺伝子配列の変化を伴わない遺伝子修飾の異常が重要な役割を演じています。特に遺伝子修飾の異常は癌のみならず、癌発症の背景となる慢性胃炎や潰瘍性大腸炎等の非癌部組織にも観察されるため、発癌過程の変化を捉えるのに有効であると考えられます。

DNAメチル化異常は局所のメチル化異常と遺伝子全域に渡る脱メチル化異常に分類されます。局所のメチル化異常は、主として癌抑制遺伝子プロモーター領域におけるCpG islandの過剰メチル化で、癌抑制遺伝子の転写不活化に関与しています。一方、遺伝子全域に渡る脱メチル化異常は、ゲノム全体のメチル化シトシンの含有量の低下と定義され、多くの癌で同定されたもう一つの後天的な変化です。最近の研究によると、マウスのDNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT)活性を10%程度に低下させ、ゲノム全域に脱メチル化を誘導すると、染色体不安定性が招来し、悪性リンパ腫が惹起される事が報告されました。またDNMTをノックアウトし、ゲノム全域に脱メチル化させたES細胞では、染色体欠失などの染色体不安定性を示す事が明らかとなりました。

このように、脱メチル化異常はゲノムの不安定性を介した発癌経路における初期段階に関与していると考えられますが、そのメカニズムは明らかではありません。昨年、セントロメア領域のnon-coding RNA、satellite alpha transcriptsの亢進が種々の癌で高頻度に見られ、染色体不安定性を引き起こす事が報告されましたが、その初期段階に加齢に伴う脱メチル化異常が原因となっている可能性が考えられます。

2. 研究の目的

我々はこれまで、遺伝子複製時のメチル基修飾エラーが加齢とともに蓄積される事でゲノム全域のメチル化シトシンの含有量が低下(DNA脱メチル化異常)する事を示しました。さらにDNA脱メチル化異常は染色体欠失等の染色体不安定性と相関する事を示し、DNA脱メチル化異常を介する発癌経路を提唱しました。近年、DNAメチル化酵素の低下により染色体不安定性が引き起こされる事がマウスで証明されましたが、そのメカニズムは明らかではありません。一方昨年、染色体分配に重要な役割を演じているセントロメア領域のnon-coding RNAの亢進が種々の癌で高頻度に見られ、染色体不安定性を引き起こす原因となる事が報告されました。本研究は、加齢に伴うセントロメア領域のDNA脱メチル化異常に着目し、それをセントロメア領域のnon-coding RNAが誘発する染色体不安定性と関連づける独創的な試みです。この発癌過程は、従来の遺伝子異常の蓄積による古典的なものとは異なり、

新たな発癌経路の発見の糸口になると考えられます。

3. 研究の方法

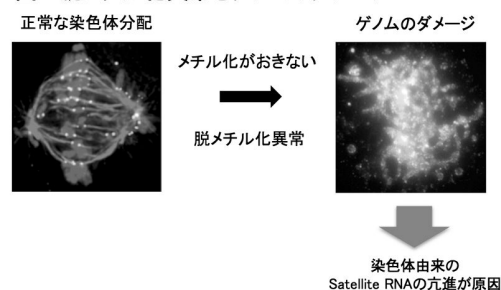
- (1) 大腸癌、胃癌の古典的癌化経路で見られる遺伝子異常p53、KRAS、APC、E-cadherin等を免疫組織染色法及びDNAシーケンス法を用いて検出します。
- (2) LINE-1及びsatellite等の反復配列の脱メチル化異常そしてセントロメア領域のnon-coding RNA、satellite transcriptsをreal-time methylation specific PCRの一つであるMethyLight法を用いて検出し、セントロメア領域のsatellite transcriptsの亢進した癌の特徴を明らかにします。
- (3) CGHアレイを行い、satellite transcriptsの亢進した癌に染色体欠失等、遺伝子不安定性がどのような頻度で、どの部位に多いか、そして古典的癌化経路で見られる遺伝子異常の関連遺伝子が存在しないかを検討します。
- (4) 染色体に変化がある遺伝子領域の発現変化を発現アレイで検証します。
- (5) 我々が独自に開発したメチル化アレイを用いて、ゲノム全域の脱メチル化領域を検出し、MethyLight法で得られた結果の正当性を検証します。

4. 研究成果

「メチル化異常とゲノムのダメージ」

癌のリスクは年齢とともに増加します。加齢に伴いゲノムのダメージ(損傷)が蓄積されていきますが、その契機となるのは遺伝子複製の際の染色体分配です。正常な染色体分配には染色体のセントロメア領域のメチル化が必須です。セントロメア領域は、縦列型反復配列であるSatellite配列(171bp)より構成され、正常では強固にメチル化しヘテロクロマチン構造を維持する事により染色体の均等分配を司ります。この領域に正常な

図1: 脱メチル化異常とゲノムのダメージ

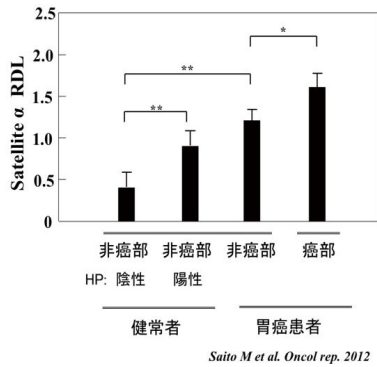


メチル化が起こらない、すなわち脱メチル化異常が起こると染色体分配は破綻しゲノムにダメージが生じます(図1)。

「Satellite 配列の脱メチル化レベル」

図2はSatellite 配列の脱メチル化の程度を臨床検体で測定したものです。脱メチル化の程度は胃癌患者の癌部組織で高いだけでなく、胃癌患者の非癌部組織でも亢進していることが示されました。非癌部組織でもヘリコバクター感染で上昇しており、Satellite 配列の脱メチル化の程度の段階的な上昇は胃癌の発癌過程におけるゲノムのダメージを捉えていると考えられます。

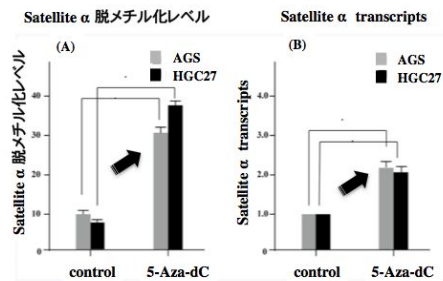
図2: Satellite a の脱メチル化レベル



「Satellite transcript による染色体不安定性の誘導」

この Satellite 配列に由来する non-coding RNA「Satellite transcript」は種々の癌で亢進しており、人工的に「Satellite transcript」を過剰発現させると染色体不安定性を引き起こします。「Satellite transcript」は、siRNA 機構を介してセントロメア領域のヒストン蛋白のメチル化に携わり、ヘテロクロマチンの形成に重要な役割を担っていると考えられています。我々は、脱メチル化誘導により「Satellite transcript」が過剰発現することを見だしました(図3)。すなわち、脱メチル化により non-coding RNA の過剰発現を介した染色体不安定性が誘導される可能性を示しました。

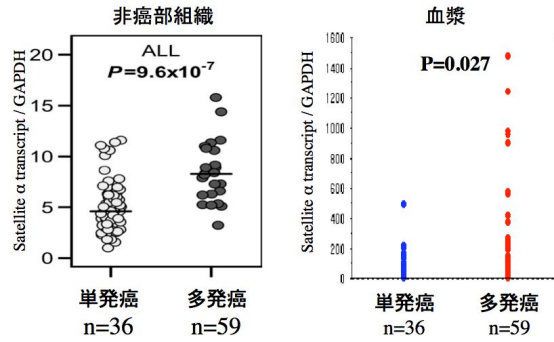
図3: 脱メチル剤によるsatellite transcriptsの誘導



脱メチル化剤 (5-Aza-dC) の投与により Satellite 配列の脱メチル化が誘導され (A)、satellite transcripts の上昇が認められます (B)。

「組織と血中の Satellite transcript」

図4: 大腸癌患者の非癌部組織と血中Satellite α transcript



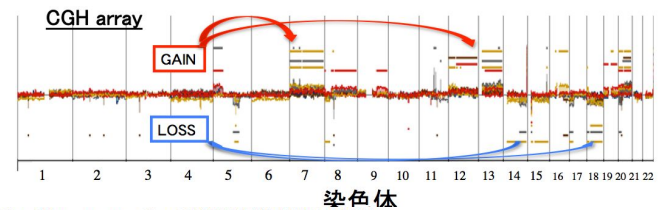
これまでの検討から、「Satellite transcript」は癌患者の非癌部組織で高値を示し、特に多発・重複癌患者の非癌部組織では単発癌患者に比べ有意に高い結果でした(図4左)。

さらに「Satellite transcript」は血漿でも測定可能で、多発癌で高いという組織と一致した結果を示しました(図4右)。そして、重複癌の中でも胃や食道といった消化器臓器との重複癌患者の血漿で高値を示しており、「Satellite transcript」は、消化管上皮のゲノムのダメージを反映している可能性が示唆されます。

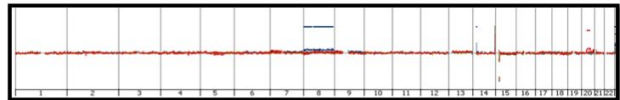
「Satellite transcript を介するゲノムダメージの標的染色体」

これまでの検討から、「Satellite transcript」を介するゲノムのダメージの誘導には標的となる染色体がある事が分かっています。図5は「Satellite transcript」が亢進している大腸癌患者の臨床検体を用いてCGHアレイでDNAコピー数の変化を捉え

図5: Satellite α transcriptsを介する標的染色体



Satellite α transcript の発現亢進がない症例



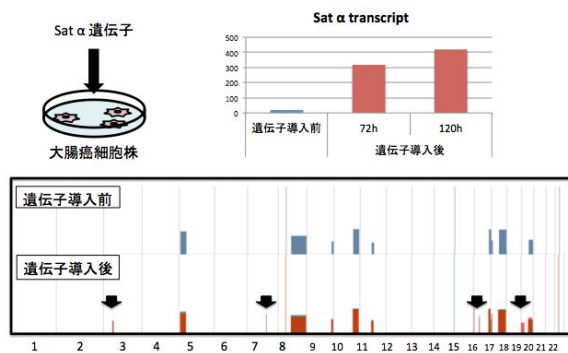
ものです。DNA コピー数の変化は特定の染色体に集中して認められる事が分かります。

図5: 7, 12, 13, 20番染色体で増幅が、14, 15, 18番染色体で欠失が高頻度に認められる。一方、発現亢進がない症例では、染色体数の変化はほとんど認められない。

図6は大腸癌細胞株に「Satellite transcript」をリポフェクション法を用いて

トランジェントに遺伝子導入した CGH アレイの結果です。増幅変化のみ(矢印)を示しますが、7 番染色体の増幅は臨床検体を用いた結果と一致します。抽出された遺伝子のアノテーション解析を行うと、AXON Guidance に関わる遺伝子群が特定されました。AXON Guidance は胚の軸索誘導の調節因子として知られる遺伝子群ですが、最近発癌との関連性が報告されており、今後検討すべき標的遺伝子として注目しています。

図6:satellite α 遺伝子導入による標的染色体の同定



Satellite transcript が介在する染色体不安定性のメカニズムは in vitro の実験で明らかになりましたが、臨床検体での検証はありません。本研究は、そのメカニズムに脱メチル化異常を関連づけて一連のプロセスを検証する独創的な研究課題です。Satellite transcript が誘導するゲノムダメージの標的分子を特定し、それを血中モニタリングする事で発がんリスクのマーカーとして臨床応用が期待されます。個人のゲノムプロファイルを特定し、その標的分子を簡便かつ低侵襲な方法で経時的に追跡する一連の手法は、発癌リスクの特定のみならず、炎症性疾患や成人病といった複雑な要因からなる様々な疾患にも応用が可能です。リアルタイムに個人の疾患プロファイルの変化を捉え、病気の発症を予測する新たな個別化医療のアプローチです。疾患の罹りやすさを予測する診断法の開発、治療の標的となる遺伝子の同定、さらには個人間の遺伝的多様性の解明により、様々な疾患の治療戦略に資する情報を容易に、かつ低侵襲で提供できるものと期待されます。

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 6 件)

1. Alonso S, González B, Ruiz-Larroya T, Durán Domínguez M, Kato T, Matsunaga A, Suzuki K, Strongin AY, Giménez-Bonafé P, Perucho M. Epigenetic inactivation of the extracellular matrix metalloproteinase ADAMTS19 gene

and the metastatic spread in colorectal cancer. *Clinical Epigenetics*.2015;7:124.

2. Kato T, Suzuki K, Muto Y, Sasaki J, Tsujinaka S, Kawamura YJ, Noda H, Horie H, Konishi F, Rikiyama T. Multiple primary malignancies involving primary sporadic colorectal cancer in Japan: incidence of gastric cancer with colorectal cancer patients may be higher than previously recognized. *World J Surg Oncol*.2015;13:23
3. Tago K, Funakoshi-Tago M, Itoh H, Furukawa Y, Kikuchi J, Kato T, Suzuki K, Yanagisawa K. Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop including c-Myc and DDX5. *Oncogene*.2015;34(3):314-22
4. Saito M, Kiyozaki H, Takata O, Suzuki K, Rikiyama T. Treatment of stage IV gastric cancer with induction chemotherapy using S-1 and cisplatin followed by curative resection in selected patients. *World J Surg Oncol*.2014;12:406.
5. Muto Y, Maeda T, Suzuki K, Kato T, Watanabe F, Hidenori Kamiyama, Saito M, Koizumi K, Miyaki Y, Konishi F, Sergio Alonso, Manuel Perucho, and Rikiyama T. DNA methylation alterations of AXIN2 in serrated adenomas and colon carcinomas with microsatellite instability. *BMC cancer*.2014;14:466.
6. Suzuki K, Kato Takaharu, Muto Y, Ichida K, Fukui T, Takayama Y, Tsujinaka S, Junichi Sasaki, Hisanaga Horie, Yutaka J. Kawamura, Konishi F and Rikiyama T. The XELIRI regimen plus continuous treatment with bevacizumab is well tolerated and effective in metastatic colorectal cancer patients in a second-line setting involving the sequential administration of XELOX and XELIRI. *Mol Clin Oncol*.2014;2(5):827-832.

〔学会発表〕(計 43 件)

2015 年国際学会

1. Suzuki K, Takayama Y, Daito T, Ichida K, Fukui T, Muto Y, Kakizawa N, Yuji Kaneda, Watanabe F, Hasegawa F, Saito M, Tsujinaka S, Futsuhara K, Miyakura Y, Noda H, Hirokazu Kiyozaki, Konishi F, Rikiyama T; Liquid biopsy leads to a paradigm shift in cancer treatment. ASCO-GI Jan 21-23, 2016

2. Kakizawa N, Suzuki K, Takayama Y, Ichida K, Fukui T, Watanabe F, Muto Y, Rikiyama T; Clinical and molecular assessment of response to Regorafenib. ASCO-GI Jan 21-23, 2016
 3. Takayama Y, Suzuki K, Daito T, Ichida K, Fukui T, Muto Y, Nao Kakizawa, Imoto H, Taniyama Y, Kaneda Y, Tanaka H, Watanabe F, Kato T, Hasegawa F, Saito M, Tsujinaka S, Miyakura Y, Noda H, Konishi F, Rikiyama T; Emergence of KRAS mutation in detection of circulating tumor DNA during treatments for metastatic gastrointestinal cancer patients. ASCO, May 29-Jun 2, 2015:11026 Chicago
 4. Ichida K, Suzuki K, Takayama Y, Muto Y, Fukui T, Kato T, Saito M, Watanabe F, Kakizawa N, Hirofumi Imoto, Tanaka H, Kaneda Y, Yusuke Taniyama, Shingo Tsujinaka, Osamu Takata, Miyakura Y, Noda H, Kiyozaki H, Konishi F, Rikiyama T; Detection of satellite alpha transcript in sera, as a surrogate marker for the risk of development of multiple cancers in colorectal cancer patients. ASCO May 29-Jun 2, 2015: e22044 Chicago
- 2015年国内学会
1. 齊藤正昭、鈴木浩一、染谷崇徳、石岡大輔、市田晃佑、武藤雄太、加藤高晴、渡部文昭、兼田裕司、辻仲眞康、菊川利奈、宮倉安幸、清崎浩一、野田弘志、力山敏樹：DNA 脱メチル化異常をバイオマーカーとする癌易羅患性の評価．第 26 回日本消化器癌発生学会総会 2015.11.19-20 米子口演
 2. 鈴木浩一、齊藤正昭、武藤雄太、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、柿澤奈緒、渡部文昭、長谷川芙美、辻仲眞康、宮倉安幸、野田弘志、清崎浩一、力山敏樹：バイオマーカーによる患者選別の pitfall．第 26 回日本消化器癌発生学会総会 2015.11.19-20 米子口演
 3. 武藤雄太、鈴木浩一、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、齊藤正昭、柿澤奈緒、渡部文昭、辻仲眞康、宮倉安幸、小西文雄、力山敏樹：大腸癌臨床検体における遺伝子発現ポロファイルの腫瘍内不均一性と上皮間葉移行の関係．第 26 回日本消化器癌発生学会総会 2015.11.19-20 米子口演
 4. 高山裕司、鈴木浩一、市田晃佑、福井太郎、武藤雄太、加藤高晴、辻仲眞康、宮倉安幸、野田弘志、小西文雄、力山敏樹：転移性大腸がん患者に対する治療経過中の血中 KRAS 遺伝子変異の出現と消退．第 74 回日本癌学会学術集会 2015.10.8 ポスター 名古屋 口演
 5. 鈴木浩一：Liquid biopsy leads to a paradigm shift in cancer diagnosis．第 14 回自治医科大学シンポジウム 2015.9.3 栃木(本院) 口演
 6. 武藤雄太：The expressions of ZEB1 and miR-200 in invasive front are predictive markers for metastasis in colorectal cancer: Intratumor heterogeneity of epithelial-mesenchymal transition．第 14 回自治医科大学シンポジウム 2015.9.3 栃木(本院) 口演
 7. 市田晃佑：Detection of satellite alpha transcript in sera, as a surrogate marker for the risk of development of multiple cancers in colorectal cancer patients.第 14 回自治医科大学シンポジウム 2015.9.3 栃木(本院) 口演
 8. 福井太郎：The analysis of gene mutation of ccf-DNA of patients with metastatic pancreatic cancer．第 14 回自治医科大学シンポジウム 2015.9.3 栃木(本院) 口演
 9. 鈴木浩一、市田晃佑、福井太郎、高山裕司、武藤雄太、齊藤正昭、辻仲眞康、宮倉安幸、野田弘志、力山敏樹：血中遊離核酸のモニタリングとその臨床応用その臨床応用．第 70 回日本消化器外科学会総会 2015.7.15-17 浜松 口演
 10. 武藤雄太、鈴木浩一、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、齊藤正昭、辻仲眞康、宮倉安幸、小西文雄、力山敏樹：腫瘍内不均一性を考慮した大腸癌の上皮間葉移行の検討および血中マイクロ RNA と転移の関係．第 70 回日本消化器外科学会総会 2015.7.15-17 浜松 口演
 11. 高山裕司、鈴木浩一、福井太郎、市田晃佑、武藤雄太、長谷川芙美、齊藤正昭、辻仲眞康、宮倉安幸、力山敏樹：切除不能大腸癌患者における血中遊離 DNA を用いた KRAS 遺伝子解析と化学療法の効果予測．第 70 回日本消化器外科学会総会 2015.7.15-17 浜松 口演
 12. 福井太郎、鈴木浩一、市田晃佑、高山裕司、武藤雄太、辻仲眞康、宮倉安幸、渡部文昭、野田弘志、力山敏樹：切除不能膵癌症例に対する、血中遊離 DNA による遺伝子変異検索と

- 臨床像との比較 . 第 70 回日本消化器外科学会総会 2015.7.15-17 浜松 口演
13. 齊藤正昭、鈴木浩一、力山敏樹：非癌部組織のエピゲノム異常とがん治療 . 第 4 回消化器合同 Cancer Board 2015.7.8 埼玉 口演
14. 渡部文昭、鈴木浩一、武藤雄太、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、辻仲眞康、宮倉安幸、小西文雄、力山敏樹：マイクロサテライト不安定性 (MSI) 大腸癌の発癌に関わるゲノムプロファイルの同定 . 第 83 回大腸癌研究会 2015.7.3 久留米 ポスター
15. 鈴木浩一、武藤雄太、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、柿澤奈緒、渡部文昭、齊藤正昭、宮倉安幸、力山敏樹 血中遊離核酸のモニタリングとその臨床応用 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 シンポジウム
16. 渡部文昭、鈴木浩一、武藤雄太、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、辻仲眞康、宮倉安幸、小西文雄、力山敏樹 マイクロサテライト不安定性 (MSI) 大腸癌の発癌に関わるゲノムプロファイルの同定 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
17. 市田晃佑、鈴木浩一、武藤雄太、高山裕司、福井太郎、長谷川英美、田中宏幸、辻仲眞康、宮倉安幸、力山敏樹 血中で測定する大腸癌における多発癌発生のリスクマーカー 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
18. 武藤雄太、鈴木浩一、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、長谷川英美、田中宏幸、辻仲眞康、宮倉安幸、力山敏樹 上皮間葉移行に関わる遺伝子の腫瘍内不均一性の検討 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
19. 高山裕司、鈴木浩一、武藤雄太、福井太郎、市田晃佑、長谷川英美、田中宏幸、辻仲眞康、宮倉安幸、力山敏樹 血中遊離核酸のモニタリングによる KRAS 変異クローンの検出とその臨床応用 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
20. 齊藤正昭、鈴木浩一、市田晃佑、福井太郎、高山裕司、武藤雄太、加藤高晴、力山敏樹 DNA 脱メチル化異常を介した染色体不安定性の解明 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演
21. 柿澤奈緒、鈴木浩一、武藤雄太、市田晃佑、高山裕司、福井太郎、辻仲眞康、宮倉安幸、野田弘志、力山敏

樹 形態学的評価を用いた大腸癌転移の治療戦略 第 24 回癌病態治療研究会 2015.6.25-26 栃木 口演

22. 齊藤正昭、鈴木浩一、清崎浩一、井本博文、渡部文昭、田中宏幸、谷山裕亮、辻仲眞康、高田 理、宮倉安幸、野田弘志、力山敏樹 胃癌術式選択における背景粘膜のメチル化異常の臨床的意義 第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015.4.16-18 名古屋 口演

〔図書〕(計 3 件)

- 1 鈴木浩一、力山敏樹. 腫瘍性大腸炎のゲノム・エピゲノム解析. 医学のあゆみ. 2015; 255(6): 661-665
- 2 鈴木浩一、力山敏樹. DNA メチル化プロファイルによる膵癌診断膵癌治療 up-to-date. 2015; 105-112
- 3 鈴木浩一、力山敏樹. 消化器外科レジデントマニュアル 第 3 版 9 章 癌化学療法 医学書院, 2014; 98-104

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 浩一 (SUZUKI, Koichi) (自治医科大学, 医学部, 講師)
 研究者番号: 70332369

(2) 研究分担者

力山 敏樹 (RIKIYAMA, Toshiki) (自治医科大学, 医学部, 教授)
 研究者番号: 80343060

(3) 連携研究者

()

研究者番号: