

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640079

研究課題名(和文) 癌におけるDNAメチル化の生理的・病理的意義の再検討と臨床応用への模索

研究課題名(英文) Pathological and physiological functions of DNA methylation in cancer

研究代表者

丸山 玲緒 (Maruyama, Reo)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60607985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は癌化の過程で生じるDNAメチル現象の普遍性と、その生理的・病理的意義を明らかにすることを目的とした。初めに公共データベースと自施設のデータを統合的に解析し、各種癌で共通して高頻度にメチル化を認める領域を探索した。その解析結果をもとに、各種癌細胞株におけるメチル化状態を実際に検証し、癌化の過程で普遍的にDNAメチル化を生じる候補領域を同定した。そのゲノム上の分布様式の特徴から、この普遍的な現象にはクロマチン高次構造の変化が関与しているものと推測された。また同様の解析から、一部の癌で脱抑制のため発現亢進を認める33遺伝子を同定し、それらの臨床的・機能的意義についての検証作業を進めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to ascertain the pathological and physiological implications of aberrant DNA methylation, which is universally observed over the course of carcinogenesis. We performed integrated analysis of publicly available DNA methylation data and our own clinical datasets. We identified regions where DNA methylations were consistently observed in various tumors. Genomic distribution of the regions suggests that three-dimensional chromatin structures are involved in this epigenomic change. Through a similar analysis, we also identified 33 genes that are silenced by DNA methylation in normal tissues, whereas overexpressed in a subset of cancer probably due to DNA de-methylation. We are currently examining the clinical and functional implications of these genes.

研究分野：腫瘍生物学、分子生物学

キーワード：DNA methylation

1. 研究開始当初の背景

癌エピゲノム研究の進展により、癌における DNA メチル化の病理的意義が明らかになってきている。一般的には、癌におけるメチル化は遺伝子変異と同様に”異常”なことである、という考え方が主流である。しかし多くの癌細胞や臨床検体の解析を行う過程で、この定説では矛盾する知見・結果を経験してきた。例えば、内視鏡生検検体を用いた ChIPSeq 解析の先行研究によると、大腸癌においてメチル化される遺伝子のほとんどは、正常大腸組織においても発現が低く、それらは DNA メチル化ではなくヒストン H3K27me3 により抑制されていることが明らかとなった。つまりこれらの遺伝子は癌でメチル化が起こることにより発現抑制されるのではなく、もともと正常組織でも発現していない、ヒストン修飾により抑制されていると考えられる。すなわち、細胞が癌化の過程で何らかのシグナルを感知すると、もともと抑制されている遺伝子のプロモーターがメチル化され、突発的な転写を更に強固に防ぐような防御機構が働く。それが癌における DNA メチル化の”生理的”意義である、と考えられた。本研究では、利用可能なデータの統合的解析と実験的な検証を行うことで、この点をより明確にすることを試みた。

DNA メチル化に関連した新しい病態の概念が明らかとなった場合、診断分類や治療の考え方にパラダイムシフトを起こす可能性がある。これまで常識とされてきた「メチル化=癌にとって優位」という考え方から、「メチル化していないことの方がむしろ異常」という考え方になり、メチル化を指標とした診断や脱メチル化治療の考え方が大きく変化すると思われる。また本研究をきっかけとして、癌化の過程で生じるメチル化の分子機構解明の研究が進展すれば、新しい癌の病態メカニズムの解明やそれを標的とした新規治療法の開発にもつながる可能性もある。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、癌化の過程で生じる DNA メチル化現象の普遍性と、その生理的・病理的意義を明らかにすることである。そのためには、DNA メチル化現象の普遍性を検証するための実験系の構築が必要であり、次の3点を達成目標とし研究を進める。①これまで蓄積されているデータを本研究の仮説に従った新しい視点で解析し直して、癌化の過程で必ずメチル化を起こすような候補領域を同定する。②次に適切な細胞に種々の刺激を加え、実際にその候補領域にメチル化が誘導されるかどうかを検証し、その誘発因子を同定する。③これらの知見を活かしながら再度臨床データを解析し、この”生理的”メチル化誘導機構が正常に機能している癌と破綻している癌で臨床症例を分類可能か、分類し得た場合に臨床病理や分子病態に関連はないか、詳細に解析する。

3. 研究の方法

1) バイオインフォマティクスによるデータの解析と新規長鎖 ncRNA の同定

利用可能な公共データベースとして The Cancer Genome Atlas (TCGA)、Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE)、NIH Roadmap Epigenomics Project で公開されている RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) データやメチル化アレイデータ (Infinium Human Methylation 450k)、ChIPSeq データや RNASeq データをダウンロードし、統合解析を行った。解析は主に Python と R によるカスタムプログラムを用いて行った。

2) 臨床検体の収集

札幌医科大学第一内科にて大腸内視鏡検査を施行した患者から、十分な説明と同意のもと、生検検体を収集した。さらに必要に応じて腺管分離法により直接上皮細胞成分のみを分離した。

3) DNA メチル化解析

臨床検体や癌細胞株から DNA を抽出し、bisulfite 処理を行った後に、MSP (Methylation specific PCR) 法ならびに pyro-sequencing 法により解析を行った。

4) 遺伝子発現解析

臨床検体や癌細胞株から RNA を抽出し、cDNA を合成後、SYBR Select 試薬を用いて、realtime PCR 法にて発現解析を行った。

4. 研究成果

1) 癌化の過程で必ずメチル化を起こすような候補領域の同定

米国を中心とした TCGA などの癌・ゲノム研究に関する大型プロジェクトの著しい進展により、ごく最近の公共データベースは驚くほど充実している。癌の臨床検体に関する膨大な分子プロファイルデータを、誰もが簡単に入手できる時代が到来した。公共データとバイオインフォマティクスを徹底活用し、利用可能な全ての DNA メチル化データを再度見直して見ることにより、新しい知見を得ることを試みた。初めに現在公共データベースとして利用可能なゲノムワイドなメチル化データをできる限り多く収集し、自施設に蓄積しているメチル化データと合わせ、その統合解析を行うためのプラットフォームの構築を行った。特に ENCODE プロジェクトで公開されている RRBS データや TCGA で公開されているメチル化アレイデータを詳細に解析し、各種癌で普遍的にメチル化されている領域とそのゲノム上における分布様式を明らかにした。それらの解析結果をもとに、各種癌細胞株における DNA メチル化を実際に検証した。正常組織から癌が発生し進展する過程において、普遍的に DNA メチル化を起こす

ような候補領域を同定することができた。

2) 実験モデルの構築の試み

癌化の過程で生じるエピゲノム変化を模倣するような細胞モデル実験系を構築することを試みた。すなわち①エピゲノムが正常に近いと思われる非癌不死化細胞に、②増殖シグナルを上げる遺伝子の導入を行い、③ある領域群の DNA メチル化の変化を Bisulfite-pyrosequencing にて確認することを試みた。種々の試みを行っているが、現時点においては、はっきりとした知見を得られておらず、検証作業を継続している。

3) 正常組織では DNA メチル化により抑制されており癌で高発現を示す遺伝子群の同定

自施設のエピゲノムデータ並びに公共データを用いて、新しい視点に立ち、再解析を行った。すなわち次のストラテジーにより候補の絞り込みを試みた。①大腸上皮細胞においてポリコーム複合体 (H3K27me3) によって抑制されている領域、②癌で DNA メチル化を強制的に除去した際に、K27me3 による抑制がかかる領域、③正常大腸上皮細胞では活性化 (H3K4me3) を認めない領域、④一部の癌で活性化 (H3K4me3) を認める領域。このストラテジーにより、正常では DNA メチル化やヒストン修飾により抑制されているが、一部の癌 (例えば生理的メチル化機構が破綻している癌など) においては脱抑制されて高発現を認める 33 遺伝子を最終的に同定した。商用の臨床データベース (Oncomine) の独立したデータセットの解析により、このうちの 11 遺伝子が、癌検体で正常検体に比較して発現が上昇しているというエビデンスが得られた。これらの遺伝子の発現を多数の臨床検体で確認し臨床病理学的特徴との関連を検証するとともに、その機能的意義についても癌細胞株を用いた検証実験を行っているところである。

4) 臨床データの詳細な解析によるエピゲノム変化の機構解明の手がかり

これまでの解析で、正常では全く DNA メチル化していないが大腸癌や胃癌の背景粘膜で高率にメチル化している領域を同定した。そこで TCGA にある 5000 検体以上の DNA メチル化データ (ゲノム上 45 万ヶ所のプローブ) を入手し解析したところ、胃癌・大腸癌だけでなく食道癌、頭頸部癌、子宮頸癌等でも同様の傾向を示した。次に全サンプルにおいて、この領域 (プローブ) と高い相関を示すプローブを全ゲノム上で検索したところ、大変興味深いことにこれと同じ挙動 (メチル化パターン) を示すプローブが、染色体 19 番上で複数のクラスターを形成し点在しており、それらのほとんどが DNA 結合ドメインを持つ (転写因子と思われる) 機能未知の蛋白をコードする領域にあった。以上の結果から、ある種の癌や慢性炎症ではこれらの領域は普

遍的にメチル化しており、何らかの機能的連関を持った複数の領域がおそらく同時にメチル化していると考えられる。このメカニズムとしては、この領域が染色体上でクラスターを形成して存在することから、何らかの因子によるクロマチン高次構造の変化によるものが想定された。またこの領域はポリコームによる K27me3 の修飾は一切見られず、これまで推測されているものとは全く違った未知の分子機構が存在するものと考えられた。これらに関して現在も検証作業を継続している。

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 21 件)

- ① Su Y, Subedee A, Bloushtain-Qimron N, Savova V, Krzystanek M, Li L, Marusyk A, Tabassum DP, Zak A, Fackler MJ, Li M, Lin JJ, Sukumar S, Suzuki H, Long H, Szallasi Z, Gimelbrant A, Maruyama R, Polyak K. Somatic cell fusions reveal extensive heterogeneity in basal-like breast cancer. *Cell Reports*. 2015; S2211-1247(15)00523-9. doi:10.1016/j.celrep.2015.05.011. 査読有
- ② Mitsuhashi K, Noshio K, Sukawa Y, Matsunaga Y, Ito M, Kurihara H, Kanno S, Igarashi H, Naito T, Adachi Y, Tachibana M, Tanuma T, Maguchi H, Shinohara T, Hasegawa T, Imamura M, Kimura Y, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, Imai K, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. *Oncotarget*. 2015; 6: 7209-20 査読有
- ③ Huh SJ, Clement K, Jee D, Merlini A, Choudhury S, Maruyama R, Yoo R, Chytil A, Boyle P, Ran FA, Moses HL, Barcellos-Hoff MH, Jackson-Grusby L, Meissner A, Polyak K. Age- and pregnancy-associated DNA methylation changes in mammary epithelial cells. *Stem Cell Reports*. 2015;4:297-311. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.12.009. 査読有
- ④ 丸山玲緒. がんエピゲノムと non-coding RNA の接点 *実験医学* 2014; 32: 3043-48 査読無
- ⑤ 鈴木拓, 丸山玲緒, 山本英一郎, 甲斐正広. がんの methylator phenotype: ゲノムとエピゲノムの接点 CpG island methylation phenotype: crosstalk between cancer genome and epigenome. *実験医学* 2014; 32: 95-100 査読無
- ⑥ Harada T, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Maruyama R, Kumegawa K, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Harada E, Takagi

- R, Tanaka Y, Aoki H, Nishizono M, Nakaoka M, Tsuyada A, Niinuma T, Kai M, Shimoda K, Shinomura Y, Sugai T, Imai K, Suzuki H. Analysis of DNA methylation in bowel lavage fluid for detection of colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014; 7:1002-10. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0162. 査読有
- ⑦ Yamamoto S, Wu Z, Russnes H, Takagi S, Peluffo G, Vask C, Zhao CX, Vollan HK, Maruyama R, Ekram MB, Sun H, Kim JH, Carve K, Zucca M, Feng J, Almendro V, Bessarabova M, Rueda OM, Nikolsky Y, Caladas C, Liu XS, Polyak K. JARID1B is a luminal lineage-driving oncogene in breast cancer. *Cancer Cell*. 2014; 25:762-77. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.024. 査読有
- ⑧ Idogawa M, Ohashi T, Sasaki Y, Maruyama R, Kashima L, Suzuki H, Tokino T. Identification and analysis of large intergenic non-coding RNAs regulated by p53 family members through a genome-wide analysis of p53-binding sites. *Hum Mol Genet*. 2014; 23: 2847-57. doi: 10.1093/hmg/ddt673. 査読有
- ⑨ Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano H, Sugai T, An B, Shureiqi I, Toyota M, Kondo Y, Estécio MR, Issa JP. Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res*. 2014; 1;74: 1311-8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1865. 査読有
- ⑩ Almendro V, Cheng YK, Randles A, Itzkovitz S, Marusyk A, Ametller E, Gonzalez-Farre X, Munoz M, Russnes HG, Helland A, Rye IH, Borresen-Dale AL, Maruyama R, Oudenaarden A, Dowsett M, Jones R, Reis-Filho J, Gascon P, Gönen M, Michor F, Polyak K. Inference of tumor evolution during chemotherapy by computational modeling and in situ analysis of cellular diversity for genetic and phenotypic features. *Cell Reports*. 2014; 13:6:514-27. doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.041. 査読有
- ⑪ Nosho K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, Naito T, Sukawa Y, Mikami M, Sumioka W, Yamamoto E, Kurokawa S, Adachi Y, Takahashi H, Okuda H, Kusumi T, Hosokawa M, Fujita M, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Suzuki H, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis*. 2014; 35: 776-83. doi: 10.1093/carcin/bgt374 査読有
- ⑫ Tahara T, Yamamoto E, Madireddi P, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, Jelinek J, Yamano H, Sugai T, Kondo Y, Toyota M, Issa JP, Estécio MR. CIMP-positive but not CIMP-negative colorectal carcinomas show frequent somatic mutation of chromatin regulator genes. *Gastroenterology*. 2014; 146:530-38. doi:10.1053/j.gastro.2013.10.060. 査読有
- ⑬ Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. *Front Genet*. 2013;4:258:1-8. doi:10.3389/fgene.2013.00258. 査読有
- ⑭ Choudhury S, Almendro V, Merino VF, Wu Z, Maruyama R, Su Y, Martins FC, Fackler MJ, Bessarabova M, Kowalczyk A, Conway T, Beresford-Smith B, Macintyre G, Cheng YK, Lopez-Bujanda Z, Kaspi A, Hu R, Robens J, Nikolskaya T, Haakensen VD, Schnitt SJ, Argani P, Ethington G, Panos L, Grant M, Clark J, Herlihy W, Lin SJ, Chew G, Thompson EW, Greene-Colozzi A, Richardson AL, Rosson GD, Pike M, Garber JE, Nikolsky Y, Blum JL, Au A, Hwang ES, Tamimi RM, Michor F, Haviv I, Liu XS, Sukumar S, Polyak K. Molecular Profiling of Human Mammary Gland Links Breast Cancer Risk to a p27(+) Cell Population with Progenitor Characteristics. *Cell Stem Cell*. 2013;13:117-30. doi:10.1016/j.stem.2013.05.004. 査読有
- ⑮ 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*. 2013; 63:1091-100. doi:10.1016/j.eururo.2012.11.030. 査読有
- [学会発表] (計20件)
- ① Maruyama R, Kitajima H, Yamamoto E, Niinuma T, Yoroza A, Kumegawa K, Nishiyama K, Tsuyada A, Suzuki R, Kai M, Tokino T, Shinomura Y, Suzuki H. Systematic identification of long non-coding RNAs involved in gastritis and gastric tumorigenesis. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ② Maruyama R, Kitajima H, Yamamoto E, Niinuma T, Yoroza A, Kumegawa K, Tsuyada A, Suzuki R, Kai M, Tokino T, Shinomura Y, Suzuki H. Systematic identification of long non-coding RNAs involved in gastritis and gastric tumorigenesis.

第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

- ③ Igarashi T, Kumegawa K, Maruyama R, Yamamoto E, Tsuyada A, Suzuki R, Niinuma T, Kai M, Yamano H, Sugai T, Tokino T, Shinomura Y, Suzuki H. Genome-wide identification of lincRNAs epigenetically silenced by DNA methylation in colon cancer. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
- ④ Maruyama R. Integrative genome-wide analysis of somatic cell hybrids identified candidate key regulators of luminal and basal-like breast cancer cell phenotypes. The 33rd Sapporo International Cancer Symposium. Sapporo, Japan. 2014年6月27日、ロイトン札幌（北海道・札幌市）
- ⑤ 丸山玲緒, Ying Su, Ashim Subedee, 鈴木拓, Kornelia Polyak. 乳癌融合細胞の統合的分子解析 -表現型を規定する重要因子同定の試み. 北海道癌談話会シンポジウム～乳癌の基礎研究から臨床まで～ 2014年6月21日、TKP ガーデンシティアパホテル札幌（北海道・札幌市）
- ⑥ Maruyama R, Kitajima H, Yamamoto E, Niinuma T, Kumegawa K, Yorozu A, Tsuyada A, Suzuki R, Kai M, Shinomura Y, Suzuki H. Systematic identification of long non-coding RNAs involved in gastric tumorigenesis. 第8回日本エピジェネティクス研究会年会、2014年5月25日、伊藤国際学術研究センター（東京都・文京区）
- ⑦ Maruyama R, Su Y, Bloushtain-Qimron N, Marusyk A, Zak A, Fackler MJ, Kim J, Sukumar S, Suzuki H, Gimelbrant A, Polyak K. Integrative genome-wide analysis of somatic cell hybrids identified candidate key regulators of luminal and basal-like breast cancer cell phenotypes. The 5th Symposium of A3 Foresight Program Recent progress of cancer epigenomics. 2014年3月1日、Jeju (Korea)
- ⑧ Kumegawa K, Maruyama R, Yamamoto E, Tsuyada A, Niinuma T, Suzuki R, Shinomura Y, Tokino T, Suzuki H. Genome-wide identification of novel long noncoding RNAs epigenetically silenced by DNA methylation in colon cancer. Keystone Symposia “Cancer Epigenetics” 2014年2月4日、Santa Fe (USA)
- ⑨ Maruyama R, Yamamoto E, Tsuyada A, Kumegawa K, Suzuki R, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Kai M, Shinomura Y, Suzuki H. Systematic identification of long non-coding RNAs potentially involved in

gastric carcinogenesis. Sapporo Cancer Epigenetics Seminar of the A3 Foresight Program 2013. 2013年10月20日、ロイトン札幌（北海道・札幌市）

- ⑩ Kumegawa K, Maruyama R, Yamamoto E, Ashida M, Tsuyada A, Hatahira T, Niinuma T, Suzuki R, Sugai T, Yamano H, Kai M, Sato A, Shinomura Y, Suzuki H. Genome-wide identification of novel long noncoding RNAs epigenetically silenced by DNA methylation in colorectal cancer. Sapporo Cancer Epigenetics Seminar of the A3 Foresight Program 2013. 2013年10月20日、ロイトン札幌（北海道・札幌市）
- ⑪ Maruyama R, Yamamoto E, Kumegawa K, Tsuyada A, Ashida M, Suzuki R, Tokino T, Shinomura Y, Suzuki H. Integrated analysis of clinical ChIPSeq data and public databases identified candidate long non-coding RNAs critically involved in gastrointestinal cancer. 104th Annual Meeting, American Association for Cancer Research. 2013年4月6日、Washington, D.C. (USA)

〔図書〕（計 0件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

なし

○取得状況（計 0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 玲緒 (MARUYAMA, Reo)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60607985

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし