

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461953

研究課題名(和文) 消化器癌におけるエピゲノム関連酵素TETファミリーおよび5-hmCの解析

研究課題名(英文) TET family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in gastrointestinal carcinoma.

研究代表者

宮成 信友 (MIYANARI, Nobutomo)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：90336230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞におけるDNAの脱メチル化機構に関わると考えられているTET酵素群及び5-hmCの消化器癌における発現の意義を検討した。まず食道癌組織において免疫染色法及びELISA法にて癌部で5-hmCの発現が有意に低下していた。また、食道癌ではTET2が癌部で有意に低値であり、5-hmCの発現量とも有意に相関していた。更に5-hmC発現がLINE-1メチル化レベルとも相関していることが判明した。そこで5-hmC発現低下と食道癌患者の予後との関係を調べたところ、予後不良な傾向はあるものの有意な関係は見出せなかった。以上より5-hmCとTET2の発現低下は食道癌の癌化に影響を及ぼす可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The Ten-eleven translocation (TET) enzymes (TET1, TET2, and TET3) are implicated in DNA demethylation, through dioxygenase activity that converts 5-methylcytosine (5-mC) to 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC). We evaluated functions of 5-hmC and TET expression in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). ELISA and immunohistochemical testing showed 5-hmC levels were significantly lower in ESCC than in paired normal tissues ($P < 0.0001$). TET2 expression was significantly lower in ESCCs than paired normal tissues ($P < 0.0001$), and significantly associated with 5-hmC levels in ESCCs ($P = 0.003$, $r = 0.33$). 5-hmC levels were also significantly associated with LINE-1 methylation level ($P = 0.0002$, $r = 0.39$). Patients with low 5-hmC levels had shorter overall survival than those with higher levels, although not significantly so ($P = 0.084$). In conclusion, TET2 reduction and subsequent 5-hmC loss might affect ESCC development and progression.

研究分野：エピジェネティクス、消化器癌

キーワード：DNA脱メチル化機構 5-hmC発現低下 TET酵素減少 LINE-1メチル化レベル

1. 研究開始当初の背景

正常細胞が癌細胞へと変化する過程では、ジェネティック変化とエピジェネティック変化の両者が相互に作用しながら起こっている。エピジェネティック変化は塩基配列そのものの変化ではなく、遺伝子を修飾する変化とされており可逆的な変化である。そこで近年、癌治療・癌化予防の新たな target として注目されている。エピジェネティック変化の一つである DNA のメチル化は遺伝子発現の調節を担っており、発癌にはプロモーター領域の局所的な高メチル化とゲノムワイドな低メチル化が関わるといわれている。これまで DNA メチル化機構の研究は詳細になされた一方で、脱メチル化機構に関しては多くが不明であった。2009 年に 5-mC (メチルシトシン) のメチル酸化酵素である ten-eleven translocation 1 (TET1) が発見されて以降、その生成物である 5-hmC (ヒドロキシメチルシトシン) とともに注目を集めるようになった。5-hmC の生物学的な役割については 5-mC と同様に遺伝子発現を調節する機能を持つがまだ明らかとなっていないが、脱メチル化機構の一部を担うことは推定されている。近年、骨髄腫瘍や脳腫瘍などでは 5-hmC の減少や TET 酵素ファミリーの発現低下が、腫瘍の悪性度や予後と関連することが報告されている。しかし、食道癌における 5-hmC や TET 酵素の発現意義は未だ検討されていない。われわれはこれまで、食道癌における DNA メチル化レベルの研究に取り組み、その成果を多数報告してきた (Murata A et al. Br J Cancer 2013, Shigaki H et al. Ann Surg Oncol. 2012, Iwagami S et al. Ann Surg Oncol. 2012)。LINE-1 (long interspersed nucleotide element-1) は、ゲノム全体の約 17% を占める (Cordaux R et al. Nat Rev Genet 2009) ため、LINE-1 のメチル化レベルは、ゲノム全体のメチル化レベルの指標になるといわれている。われわれはこの LINE-1 メチル化レベルに注目し、食道扁平上皮癌において LINE-1 低メチル化症例が予後不良であること (Iwagami S et al. Ann Surg 2013, 図 2)、胃癌において LINE-1 低メチル化症例が予後不良であること (Shigaki H et al. Gastric Cancer 2012) を報告してきた。これらはいずれも正確性・再現性が高いとされる Pyrosequence technology (Irahara N et al. J Mol Diagn 2010) を用いてメチル化レベルを測定している。しかしゲノムワイドな低メチル化および局所的な高メチル化が癌の DNA に出現するメカニズムは明らかとなっていない。5-hmC や TET 酵素の発現解析に加え、LINE-1 メチル化レベルとの関係性を明らかにすることでこのメカニズム解明の一助になると考えている。

2. 研究の目的

癌細胞における DNA の脱メチル化機構に

関わる研究は、2009 年に 5-mC (メチルシトシン) のメチル酸化酵素 ten-eleven translocation (TET1) が発見されて以降、飛躍的な進化を遂げている。TET の生成物である 5-hmC (ヒドロキシメチルシトシン) も同時に注目されており、骨髄腫瘍や脳腫瘍における 5-hmC 減少や TET 酵素の発現低下が報告されている。一方、食道癌における TET 酵素や 5-hmC の意義は未だ十分に解明されていない。よって食道癌における TET 酵素および 5-hmC の発現を解析し、ゲノムワイドなメチル化の指標として用いられる LINE-1 (long interspersed nucleotide element-1) メチル化レベルや予後、疫学的因子 (飲酒、喫煙) などの関連性を網羅的に検証することを目的とした。

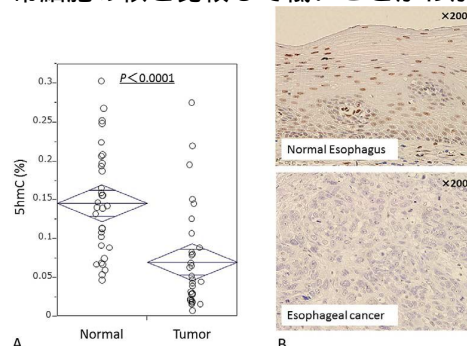
3. 研究の方法

食道扁平上皮癌切除症例の臨床検体は当科症例 77 例および共同研究施設である九州がんセンターから提供された 29 例の DNA, RNA を用いた。まず切除標本のパラフィン切片で 5-hmC 免疫染色を行った。次に同症例の凍結切片 (癌部および非癌部) から抽出した genome DNA を用いて ELISA kit による 5-hmC 定量を行った。TET 酵素ファミリー (TET1, TET2, TET3) の発現の評価は同凍結切片 (癌部および非癌部) から抽出した mRNA を Real time PCR 法で定量した。抽出した DNA を用いて、バイサルファイト処理後に pyrosequence 法を行うことにより LINE-1 メチル化レベルを定量的に測定した。その後、JMP program (SAS Institute, Cary, NC) を用いて、2 コホートにおける食道癌の 5-hmC や TET 酵素発現と LINE-1 のメチル化レベル、予後、臨床病理学的因子、疫学的因子との関係を網羅的に解析した。

4. 研究成果

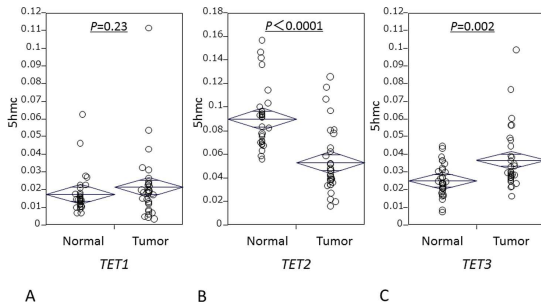
食道癌における 5-hmC の発現について

食道扁平上皮癌における癌細胞と正常上皮細胞間で 5-hmC の発現レベルに差があるかを評価するため、ELISA 法にて 33 症例を比較し解析した。下図 A の通り癌細胞の 5-hmC 発現が有意に低いことがわかった ($P < 0.0001$ by paired t-test)。また 10 症例の切除標本を用いて 5-hmC の免疫染色を行ったところ、下図 B の如く癌細胞の核内の 5-hmC 発現が正常細胞の核と比較して低いことがわかった。



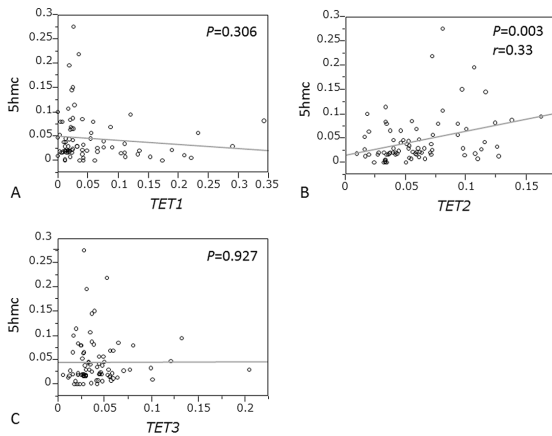
食道癌における TET 酵素ファミリーの発現

食道癌 32 症例における癌部と非癌部組織の凍結切片から RNA を抽出し、TET1, TET2, TET3 それぞれの発現レベルを解析した。下図のように TET1 の発現は癌部と非癌部を比較して有意な差は認めなかったが、TET 2 の発現は癌部で有意に低下し、TET3 では癌部で有意に上昇していた。



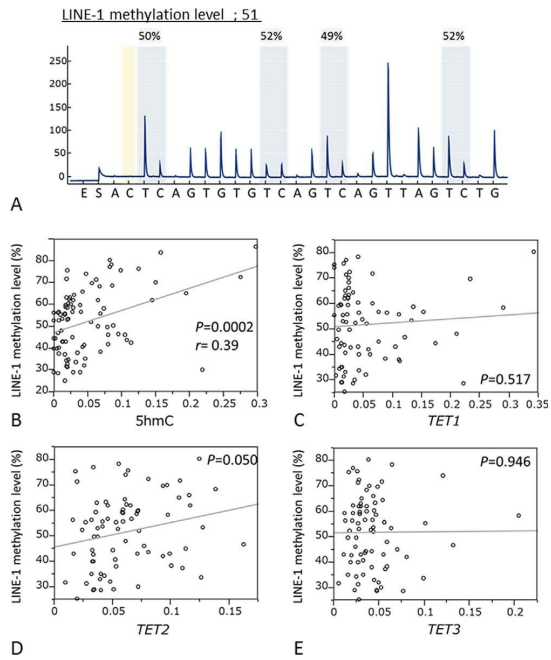
食道癌の TET 酵素と 5-hmC 発現の関係

食道癌 95 症例の癌組織中の 5-hmC 発現と TET 酵素(TET1, TET2, TET3)の発現の関係を解析したところ、下図 A, C の如く TET1 と TET3 は 5-hmC の発現と相関関係は認めなかった。一方、TET2 と 5-hmC の発現には有意な相関関係を認めた。



LINE-1 メチル化レベルと 5-hmC または TET 酵素の発現との関係

LINE-1 のメチル化レベルは、ゲノムワイドなメチル化レベルの指標になるといわれている。そこで食道癌の癌組織から抽出した DNA にバイサルファイト処理を行った後、pyrosequence technology を用いて食道癌症例の LINE-1 メチル化レベルを下図 A の如く測定し、5-hmC や TET 酵素の発現レベルとの相関関係について解析した。5-hmC の発現は下図 B の如く LINE-1 メチル化レベルと有意に相関していた。しかし TET 酵素に関しては TET1, TET2, TET3 のいずれも LINE-1 メチル化レベルと明らかな相関関係を示さなかった。

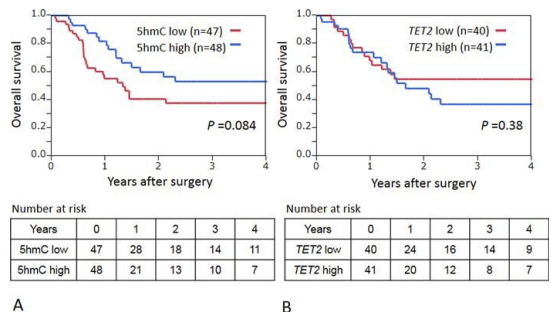


5-hmC および臨床病理学的因子との関係

食道癌 95 症例の 5-hmC 発現と臨床病理学的因子との相関関係について解析したところ、5-hmC の発現が低い症例では有意に組織学的悪性度が高いことがわかった。しかしその他の因子(年齢、性別、手術時期、嗜好歴、術前化学療法の有無、腫瘍の進行度など)との相関関係は認めなかった。また 5-hmC と唯一相関関係を示した TET2 と臨床病理学的因子との関係についても解析したが、TET2 はいずれの因子とも特に相関関係を示さなかった。

5-hmC および TET2 と予後との関係

続いて食道癌 95 例の予後との関係について解析したところ、5-hmC の発現が低い群では予後不良な傾向を示したが有意な差は出なかった。一方で TET2 の発現と予後との相関関係は認めなかった。



以上の研究から、食道癌において 5-hmC と TET2 の発現には相関関係があり、それらの発現低下は食道癌の癌化に影響を及ぼす可能性が考えられた。

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 6件)

1. Murata A, Baba Y, Ishimoto T, Miyake K, Kosumi K, Harada K, Kurashige J, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Yamamoto M, Oda S, Watanabe M, Nakao M, Baba H: TET family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Sep 15;6(27):23372-82.
DOI: 10.18632/oncotarget.4281
2. Kosumi K, Baba Y, Ishimoto T, Harada K, Miyake K, Izumi D, Tokunaga R, Murata A, Eto K, Sugihara H, Shigaki H, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Komohara Y, Takeya M, Baba H: Relationship between LINE-1 hypomethylation and Helicobacter pylori infection in gastric mucosae. *Med Oncol*. 2015 Apr;32(4):117.
DOI: 10.1007/s12032-015-0571-5.
3. Harada K, Baba Y, Ishimoto T, Chikamoto A, Kosumi K, Hayashi H, Nitta H, Hashimoto D, Beppu T, Baba H.: LINE-1 methylation level and patient prognosis in a database of 208 hepatocellular carcinomas. *Ann Surg Oncol*. 2015 Apr;22(4):1280-7.
DOI: 10.1245/s10434-014-4134-3.
4. Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Yoshida N, Oki E, Morita M, Nakao M, Baba H: IGF2 DMRO methylation, loss of imprinting, and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2014 21(4):1166-74.
DOI: 10.1245/s10434-013-3414-7
5. Baba Y, Murata A, Watanabe M, Baba H. Clinical Implications of LINE-1 Methylation Levels in Gastrointestinal Cancers. *Surgery Today* 2014 Oct;44(10):1807-16
DOI: 10.1007/s00595-013-0763-6.
6. Baba Y, Ishimoto T, Kurashige J, Iwatsuki M, Sakamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H. Epigenetic field cancerization in gastrointestinal cancers. *Cancer Lett*. 2016 Jun

1;375(2):360-6.

DOI: 10.1016/j.canlet.2016.03.009.

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[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

宮成 信友 (MIYANARI, Nobutomo)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号: 90336230

(2)研究分担者

馬場 祥史 (BABA, Yoshifumi)
熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師
研究者番号: 20599708

志垣 博信 (SHIGAKI, Hironobu)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号: 30594874

渡邊 雅之 (WATANABE, Masayuki)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・食道担当部長) 研究者番号: 80254639

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

村田 飛鳥 (MURATA, Asuka)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号: 10625768