

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670176

研究課題名(和文)塩基配列特異的なメチル化シトシンin situ検出法の開発

研究課題名(英文)Development of histo-in situ technique demonstrating sequencing specific methylated cytosine

研究代表者

北澤 荘平(KITAZAWA, SOHEI)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90186239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：「形態学に即したエピジェネティクス研究」は、申請者等が独自に開発した microdissection検体のアガロースビーズ法を中心とした研究手法により開拓された研究分野であり、当該研究はそれを更に一步推し進めるものである。特に、顕微鏡的に認識される「特定の形態学的変化を示す病変部分」における遺伝子発現エピゲノム制御の解析を、細胞・組織構造を保ったまま行うことを目標として開発した。従来の組織化学的手法では解析不可能であった遺伝子発現調節、とくに非CpG-islandを含めた多様なDNAメチル化を中心としたエピジェネティクス制御機構を形態学的研究へと広く展開させる基盤を作成することが出来た。

研究成果の概要(英文)：By making a ICON a probe which specifically cross-link and bound to the methylated cytosine, probe DNA can specifically hybridize to the target DNA in a sequence dependent manner. By PRINS method, a DNA elongation reaction was established using bounded ICON probe on the specific chromosome. Modified nucleotides were incorporated during this elongation stem and visualized by a conventional histochemical techniques. By this easy, methylation status of specific chromosome or DNA sequence could be visualized. So far we gathered a lot of basic and fundamental data. We are now currently trying to visualize a single-copy gene during spermatogenesis in mouse testis, and updating our protocol for more stable and reliable one.

研究分野：分子病理学

キーワード：DNAメチル化 in situ hybridization Histochemistry Epigenetics

## 1. 研究開始当初の背景

メチル化シトシンの検出は、1)同じ塩基配列を認識する制限酵素でメチル化感受性、非感受性の酵素を用いて、DNA の切断パターンをサザン法で比較する解析法と、2) sodium bisulfite 処理により塩基単位でメチル化シトシンを検出する sodium bisulfite mapping 解析の 2 法に大別される。現在用いられているその他のメチル化シトシン解析法は、この 2 法を一部改変したものである。一方、組織形態学的観点からメチル化シトシンを解析する試みもなされてきた。それらは、1)私どもが主として開発・改良したアガロースビーズ法 (Lab Invest 2000, J Bone Miner Res 2002, Cancer Science 2003, Oncogene 2005, Histochem cell Biol, 2006, Int J Cancer, 2009) により、顕微鏡下で組織切片より microdissection 法にて採取した微量検体から、直接、メチル化シトシンを検出する方法と、2) 組織切片上でメチル化感受性・非感受性制限酵素処理を行い、その切断部位をさらに末端標式することにより細胞、組織構築を保ったまま検出する方法である (T. Koji, Histochem Cell Biol, 2008)。前者の microdissection を用いる方法は、採取部位以外の情報が得られない上、解析に 20-30 個以上の細胞数が必要なため、単一細胞のメチル化検出は現時点では不可能である。一方、後者は、特定の塩基配列ではなく CCGG 部位のメチル化率を評価しているにすぎない。申請者等は、メチル化シトシンを研究対象とした分子生物学的研究に加え、病理組織標本を用いた in situ DNA-RNA 分子雑種法の改良を重ね (Histochem Cell Biol 1989, 1999, 2002, 2003, 2004, Acta Histochem Cytochem 1998, 2000, 2002)、転写早期の核内 mRNA を電子顕微鏡レベルで検出することにも成功した (J Structural Biol 2006)。本申請課題では、これらの方法論の開発経験にもとづいて、遺伝子の特定部位に存在するメチル化シトシンを、in situ で特異的に検出する、新たな病理形態学的診断法の開発を行うものである。

## 2. 研究の目的

単一の受精卵に由来しながら、神経細胞から皮膚に至る多様な分化を制御しているエピジェネティクス制御機構は、iPS 細胞による再生医療、分子標的治療をはじめとするポストゲノム研究の最重要課題の一つである。メチル化シトシンは、エピジェネティクス制御機構の主体をなす DNA 修飾であり、細胞・組織分化や腫瘍発生・進展に重要である。本研究は、遺伝子の特定部位、特に調節遺伝子 promoter 領域に存在する CpG-island や、ゲノム刷り込み現象に關与する部位のメチル化シトシンを、細胞や組織の形態を保ったまま in situ で検出する組織化学的手法を世界に先駆けて開発することを目指したものである。特定塩基配列のメチル化シトシンを認識する ICON プローブと組織切片・染色体上

での常温 Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification, LAMP 法との併用による新たな病理診断手法により、腫瘍をはじめとする種々の病態発生に關与するエピジェネティクス変化を最も早期に検出できる検査法の開発を当該研究の目標としている。

## 3. 研究の方法

当該研究の前半期で、標的のメチル化シトシンに対してオスミウム錯体を形成し、標的 DNA との間にクロスリンク体を生成する ICON プローブを中心にメチル化部位特異的なプライマー作成と、組織切片・染色体上での常温 DNA 増幅法 (LAMP 法) の条件最適化を重点的に行い、後半期には単一遺伝子での検出と病理診断への応用研究を行う。

## 4. 研究成果

「形態学に即したエピジェネティクス研究」は、申請者等が独自に開発した microdissection 検体のアガロースビーズ法を中心とした研究手法により開かれた研究分野であり、当該研究はそれを更に一步押し進めるものである。特に、顕微鏡的に認識される「特定の形態学的変化を示す病変部分」における遺伝子発現制御の解析を、細胞・組織構築を保ったまま行うことを目標としており、従来の組織化学的手法では解析不可能であった遺伝子発現調節、とくに非 CpG-island を含めた多様な DNA メチル化を中心としたエピジェネティクス制御機構を形態学的研究へと広く展開させ、さらに再生医学や悪性腫瘍に対する治療戦略に発展する可能性を持つ、分野横断的で、きわめて独創的な手技の開発を進めることが出来た。

## 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 24 件)

Usefulness of low-dose splenic irradiation prior to reduced-intensity conditioning regimen for hematopoietic stem cell transplantation in elderly patients with myelofibrosis. Etsuko Matsubara, Jun Yamanouchi, Riko Kitazawa, Taichi Azuma, Hiroshi Fujiwara, Takaaki Hato and Masaki Yasukawa. Case Reports in Hematology, 2016;2016:8751329. 2016 Oct 20. 査読有り

TDRG1 functions in testicular seminoma are dependent on the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Yong Wang, Yu Gan, Zhengyu Tan, Jun Zhou, Riko Kitazawa, Xianzhen Jiang, Yuxin Tang, and Jianfu Yang, OncoTargets and Therapy, 9: 409-420, 2016. 査読有り

Inflammatory Fibroid Polyps of Large Bowel with PDGFRA Mutation. Kanazu Ariyasu, Riko Kitazawa, Ryuma Haraguchi, Yasuo Ueda, Yukino Kawanami, Yukiko Nishi, Yuri Kameoka, Yosuke Mizuno and Sohei Kitazawa, J Cell Sci Ther, 7: 234. doi:10.4172/2157-7013.1000234, 2016. 査読

有り

Hepatic Sinusoidal Obstruction Syndrome without Preceding Medical Events. Yukino Kawanami, [Riko Kitazawa](#), Ryuma Haraguchi, Yasuo Ueda, Yukiko Nishi, Kanazu Ariyasu, Yosuke Mizuno, [Sohei Kitazawa](#), Case Reports in Clinical Medicine, Vol.05 No.03(2016), Article ID:64674, 4 pages 10.4236/crcm.2016.53019, 2016. 査読有り

Primary adrenal leiomyosarcoma with lymph node metastasis: a case report. Onishi T, Yanagihara Y, Kikugawa T, Miura N, Noda T, Kakuda T, [Kitazawa R](#), Tanji N. World J Surg Oncol. 2016 Jul 2;14(1):176. doi: 10.1186/s12957-016-0936-z. 査読有り

A case of multicentric gliomas in both supra- and infratentorial regions with different histology: a case report. Inoue A, Ohnishi T, Kohno S, Mizuno Y, [Kitazawa R](#), Nakamura Y, Ohue S. World J Surg Oncol. 2016 May 26;14(1):152. doi: 10.1186/s12957-016-0907-4. PMID: 27230073 査読有り

sFRP4-dependent Wnt signal modulation is critical for bone remodeling during postnatal development and age-related bone loss. Ryuma Haraguchi, [Riko Kitazawa](#), Kiyoshi Mori, Ryosuke Tachibana, Hiroshi Kiyonari, Yuuki Imai, Takaya Abe, [Sohei Kitazawa](#), Scientific Reports, 2016 Apr 27;6:25198. doi: 10.1038/srep25198. 査読有り

Phospholipase C Activates Nuclear Factor- $\kappa$ B Signaling by Causing Cytoplasmic Colocalization of Ribosomal S6 Kinase and Facilitating Its Phosphorylation of Inhibitor  $\kappa$ B in Colon Epithelial Cells. Masahiro Wakita, Hironori Edamatsu, Mingzhen Li, Aki Emi, [Sohei Kitazawa](#), and Tohru Kataoka, JBC, 2016. 査読有り

TDRG1 regulates chemosensitivity of seminoma TCam-2 cells to cisplatin via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and mitochondria-mediated apoptotic pathway. Gan Y, Wang Y, Tan Z, Zhou J, [Kitazawa R](#), Jiang X, Tang Y, Yang J. Cancer Biol Ther. 2016 Apr 22;1-10. 査読有り

Epigenetic regulation of Tbx18 gene expression during endochondral bone formation. Haraguchi R, [Kitazawa R](#), [Kitazawa S](#). Cell and Tissue Research, 359(2):503-512, 2015. 査読有り

Parathyroid hormone-related peptide-producing multiple myeloma and renal impairment: A case report, Masaru Kinomura, Noriaki Shimada, Mana Nishikawa, Kazuyoshi Omori, Tomoyasu Jo, Yasunori Ueda, Kenji Notohara, [Riko Kitazawa](#), [Sohei Kitazawa](#), Masaki Fukushima, and Kenichiro Asano, Internal Medicine, 54(23): 3029-3033, 2015. 査読有り

Reactivation of CDX2 in gastric cancer as

mark for gene silencing memory. Kameoka Y, [Kitazawa R](#), Ariasu K, Tachibana R, Mizuno Y, Haraguchi R, [Kitazawa S](#). Acta Histochem Cytochem, 48(4): 115-124, 2015. 査読有り

Re-evaluation of MRgFUS treatment for uterine myoma with a higher signal intensity than that of myometrium on T2-weighted MR images. H. Fukunishi, K. Funaki, H. Sasaki, H. Shirafuji, T. Maruo, [R. Kitazawa](#) and [S. Kitazawa](#), Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, Article first published online: 1 OCT 2015, DOI: 10.1002/uog.15644, 2015. 査読有り

A Case of Mediastinal Granular Cell Tumor with Horner's Syndrome. Shikatani Y, Okazaki M, Sakao N, Yukumi S, Shigematsu H, [Kitazawa S](#), Sano Y. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2015 Jun 2. [Epub ahead of print], doi: 10.5761/atcs.cr.15-00112. 査読有り

今月の話題：骨巨細胞腫の原因遺伝子と抗 RANKL 抗体を用いた治療法の開発。北澤荘平、北澤理子, 病理と臨床 11 月号, 2015. 査読有り

Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. Hiroaki Asai, Hiroshi Fujiwara, [Sohei Kitazawa](#), Naoto Kobayashi, Toshiki Ochi, Yukihiro Miyazaki, Fumihiko Ochi, Yoshiki Akatsuka, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kiyotaka Kuzushima, Hiroaki Ikeda, Hiroshi Shiku and Masaki Yasukawa, Journal of Hematology & Oncology 2014, 7:3 査読有り

Acquisition of MYD88 L265P mutation during treatment of diffuse large B-cell lymphoma of parotid gland. Koto Fujiishi, [Riko Kitazawa](#), Yusa Nagai, Takafumi Watanabe, Kenji Bando, Shinji Kobayashi, Yoshihiro Yakushijin, Ryuma Haraguchi, [Sohei Kitazawa](#). Virchows Archiv, 464(1), 121-124, 2014. 査読有り

Tumor necrosis factor  $\alpha$ - and lymphotoxin  $\alpha/\beta$ -mediated lymphocyte recruitment to testicular seminoma via high endothelial venule-like vessels. Sakai Y, Hoshio H, [Kitazawa R](#), Kobayashi M. J Andrology, Volume 2, Issue 2, pages 282–289, March 2014. 査読有り

Primary malignant lymphoma of prostate with silent MYD88 mutation. Keisuke Yoshida, [Riko Kitazawa](#), Munenori Komoda, Chihiro Ito, Ryuma Haraguchi, [Sohei Kitazawa](#). Case Reports in Clinical Medicine, Vol.3 No.3(2014), Article ID:43506,4 pages DOI:10.4236/crcm.2014.33031. 査読有り

Gastric adenocarcinoma arising in gastritis cystica profunda presenting with selective loss of KCNE2 expression. Natsumi Kuwahara, [Riko Kitazawa](#), Koto Fujiishi, Yusa Nagai, Ryuma Haraguchi, [Sohei Kitazawa](#), World

Clinical Case Report, 1(2):507-510, 2014. ISBN 978-0-9914430-1-7 査読有り

- ②① Renin-Angiotensin System Inhibitors Reduce Serum Asymmetric Dimethylarginine Levels and Oxidative Stress in Normotensive Patients with Chronic Kidney Disease. Hideki Fujii, Keiji Kono, Kentaro Nakai, Shunsuke Goto, Riko Kitazawa, Masafumi Fukagawa, Shinichi Nishi, Nephron Extra, 4: 18-25, 2014. 査読有り
- ②② BOB.1-positive Classical Hodgkin's Lymphoma carries Hypermethylation of Gene Promoter as Molecular Marker of Gene-silencing Memory Takafumi Watanabe, Riko Kitazawa, Yosuke Mizuno, Natsumi Kuwahara, Chihiro Ito, Atsuro Sugita, Ryuma Haraguchi, Sohei Kitazawa, Acta Histochem Cytochem, (2014), 47 (3), 125-131. 査読有り
- ②③ Diabetic Osteopenia by Decreased  $\beta$ -Catenin Signaling Is Partly Induced by Epigenetic Derepression of sFRP-4 Gene. Kiyoshi Mori, Riko Kitazawa, Takeshi Kondo, Michiko Mori, Yasuhiro Hamada, Michiru Nishita, Yasuhiro Minami, Ryuma Haraguchi, Yutaka Takahashi and Sohei Kitazawa, PlosOne, (2014), 9 (7), e102797. 査読有り
- ②④ Duodenal gastric heterotopia, sporadic or fundic gland polyp-associated, frequently carries  $\beta$ -catenin mutation. Miku Nakagawa, Riko Kitazawa, Takeshi Kondo, Kosuke Ninomiya, Masayoshi Okita, Ryuma Haraguchi, Sohei Kitazawa, Virchows Archiv, (2014), 465 (3), 253-256. 査読有り

[学会発表](計18件)

破骨細胞におけるヘッジホッグシグナル伝達系の機能解析, 原口 竜摩, 北澤 理子, 今井 祐記, 北澤 荘平, 日本組織細胞化学会総会 2016 (杏林大学井の頭キャンパス、東京都三鷹市)

長管骨におけるヘッジホッグシグナル依存的な糖尿病合併症 遺伝子改変マウスモデルを用いた細胞系譜追跡システムによる分子病理学的研究, 永山 正和, 原口 竜摩, 工藤 聡, 北澤 理子, 北澤 荘平, 日本組織細胞化学会総会 2016 (杏林大学井の頭キャンパス、東京都三鷹市)

上部消化管におけるヘッジホッグシグナル依存的な糖尿病合併症 遺伝子改変マウスモデルを用いた細胞系譜追跡システムによる分子病理学的研究, 玉井 優衣, 原口 竜摩, 西村 智達, 北澤 理子, 北澤 荘平, 日本組織細胞化学会総会 2016 (杏林大学井の頭キャンパス、東京都三鷹市)

中枢神経系におけるヘッジホッグシグナル依存的な糖尿病合併症 遺伝子改変マウスモデルを用いた細胞系譜追跡システムによる分子病理学的研究, 池田 真子, 原口 竜摩, 山下 百合菜, 本間 理沙子, 北澤 理子, 北澤 荘平, 日本組織細胞化学会総

会 2016 (杏林大学井の頭キャンパス、東京都三鷹市)

破骨細胞系列におけるヘッジホッグシグナル伝達系の機能解析, 原口 竜摩, 北澤 理子, 今井 祐記, 北澤 荘平, 日本骨代謝学会学術集会 2016 (大阪国際会議場、大阪府大阪市)

破骨細胞分化因子受容体 RANK の新規変異体 vRANK の機能解析, 北澤 理子, 原口 竜摩, 水野 洋輔, 上田 康雄, 小林 泰浩, 北澤 荘平, 日本骨代謝学会学術集会 2016 (大阪国際会議場、大阪府大阪市)

糖尿病による精子形成能低下とヘッジホッグシグナル経路の関連性について, 大野 輝之, 原口 竜摩, 齋藤 洋太, 下山 貴幸, 北澤 理子, 北澤 荘平, 日本病理学会 2016 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

Padlock probe を用いた H-RCA 法による組織切片上での p16 遺伝子メチル化シグナル検出, 二宮 鴻介, 北澤 荘平, 原口 竜摩, 北澤 理子, 日本病理学会 2016 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

マウス前破骨細胞株 RAW264 細胞における受容体 RANK 遺伝子発現調節領域のメチル化と破骨細胞分化能の解析, 村田 夕紀, 北澤 荘平, 原口 竜摩, 北澤 理子, 日本病理学会 2016 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

髄膜腫における砂粒体形成とカルシウム感知受容体 CaSR 発現との関連について, 石村 菜穂, 北澤 理子, 水野 洋輔, 原口 竜摩, 北澤 荘平, 日本病理学会 2016 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

ヒト白血病細胞株 HL60 の破骨細胞への分化誘導の検討, 田中 いつみ, 北澤 荘平, 原口 竜摩, 北澤 理子, 日本病理学会 2016 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

骨巨細胞腫ホルマリン固定パラフィン包埋検体を抗原とするモノクローナル抗体 1G7 の樹立と認識抗原の解析, 木内 理奈, 北澤 理子, 森 礼子, 水野 洋輔, 原口 竜摩, 北澤 荘平, 日本病理学会 2016 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

腎臓におけるヘッジホッグシグナル依存的な糖尿病合併症, 島瀬 奈津子, 原口 竜摩, 池田 真子, 小野田 杏奈, 北澤 理子, 北澤 荘平, 日本病理学会 2016 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

下部消化管糖尿病合併症におけるヘッジホッグシグナル経路の関与, 倉田 菜央, 原口 竜摩, 伊吹 優里, 玉井 優衣, 西村 智達, 北澤 理子, 北澤 荘平, 日本病理学会 2016 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

Padlock probe を用いた H-RCA 法による病理組織切片上での DNA1 塩基突然変異の検出法の開発, 沖田 将慶, 北澤 理子, 原口 竜摩, 北澤 荘平, 日本病理学会 2016 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

アガロースビーズ法で 10 年以上前の肺生検 HE 染色標本から EML4-ALK キメラ遺伝子

の存在とその亜型を同定できる, 廣瀬 未優, 北澤 理子, 原口 竜摩, 北澤 莊平, 日本病理学会 2016 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

破骨細胞系列におけるヘッジホッグシグナル伝達系の機能解析, 原口 竜摩, 北澤 理子, 小林 泰浩, 今井 祐記, 北澤 莊平, 日本病理学会 2016 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

破骨細胞分化因子受容体 RANK の新規変異体 vRANK の解析 (Identification and analysis of function of a novel splicing variant of receptor activation of NF- $\kappa$ B), 北澤 理子, 原口 竜摩, 水野 洋輔, 北澤 莊平, 日本病理学会 2016 (仙台国際センター、宮城県仙台市)

〔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

北澤 莊平 (Kitazawa, Sohei)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 90186239

### (2) 研究分担者

北澤 理子 (Kitazawa, Riko)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 00273780

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし