

研究報告書

「細胞老化のエピジェネティクスとその破綻による発癌機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 金田 篤志

1. 研究のねらい

発癌にはエピジェネティックな異常が深く関与することが知られている。これまで申請者は、エピジェネティック異常の1つである IGF2 遺伝子インプリンティング消失(Loss of imprinting, LOI)の関与についてマウスモデルを用いて研究を行った。Igf2 のLOIが腸管に起きると、腸管前駆細胞がより未分化な状態となり、腸管腫瘍発症リスクを上昇させることを同定した。LOI(+)細胞はIGF2 刺激に対し鋭敏な状態となっており、IGF2 シグナルを受容体阻害剤投与により遮断すると、Igf2 LOI(+)マウス特異的に細胞増殖関連遺伝子の発現が減少し腸管腫瘍リスクが低下するがわかった。エピジェネティック異常が癌発症リスクなど発癌に原因として関わり、特異的な治療標的とすることが可能であることを示唆している。つまり癌はエピゲノム異常特性によって異なる治療が可能であり、癌症例をエピゲノム異常特性によって分類する必要性を考えた。

まずは大腸癌について、代表的エピジェネティック異常である DNA メチル化異常に関して、MeDIP-chip 法を用いて DNA 異常メチル化部位をゲノム網羅的に同定した。その結果大腸癌新規のメチル化マーカー数十個を樹立し、大腸癌症例におけるそれらマーカーのメチル化を定量的に解析した。すると、大腸癌症例は3つのエピジェノタイプに分類され、各メチル化エピジェノタイプは癌遺伝子変異と強く相関するデータを得た。これらのエピジェノタイプはどのように成立し、何故癌遺伝子変異と相関するのか。癌遺伝子活性化はそもそも早期細胞老化を誘導することが知られるが、その際にエピゲノム変化を誘導した結果がこれらのエピジェノタイプなのか。細胞老化とは並行してDNAメチル化異常が起きて、細胞老化に重要な因子がDNAメチル化異常のため破綻し細胞老化できずに癌化しているのか。これらを解明する目的に、癌遺伝子変異による早期細胞老化において網羅的エピゲノム解析・発現解析を行い重要な因子を同定すること、その破綻による大腸癌発生機構を解明すること、大腸癌を含めて癌のエピジェノタイプの原因を解明することをねらいとした今研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

大腸癌症例のDNAメチル化を網羅的解析し、階層的クラスタリングを用いて3つのエピジェノタイプに分類した。高メチル化群は癌遺伝子 BRAF 変異と、中メチル化群は癌遺伝子 KRAS 変異と、それぞれ強く相関し、発癌機構が全く異なる3群の大腸癌の存在が示唆された(論文1)。これら相関の原因はわかっていないが、i)癌遺伝子変異が特定のエピジェノタイプを誘導する、ii)エピジェネティクス異常の蓄積が遺伝子変異を誘導する、iii)癌遺伝子変異とエピジェネティクス異常はそれぞれ独立事象であるが重なることで癌化している、などの可能性を考えた(総説1)。

大腸前癌病変の解析の結果、エピジェノタイプの形成と癌遺伝子変異との相関は腺腫の段階ですでに完成していた。癌遺伝子変異による限局的増殖にとどまっている異常陰窩と、そこにメチル化異常が加わり腫瘍性増殖を呈した腺腫・癌、という構図が考えられた(論文5)。

そこで癌遺伝子が活性化した際に起きる早期細胞老化において、誘導されるエピゲノム変化、早期細胞老化における重要な因子を探索した。MeDIP-seq 解析の結果、Ras 活性化で DNA メチル化変化が誘導されることはなかった。一方ヒストン修飾は、活性化マーク H3K4me3、不活化マーク H3K27me3 を含めてダイナミックに変化した。発現との統合解析の結果、Bmp2-Smad1 シグナルを活性化する分泌蛋白 Bmp2 の発現上昇、阻害する因子である Smad6, Noggin の発現低下が重要であることが示唆され、Bmp2-Smad1 シグナルを活性化することが Ras 誘導性細胞老化に必須であることが示された。シグナル下流標的因子探索の結果、ネガティブフィードバックを形成していた Smad6 を含め、細胞老化の誘導に対して負の調節因子は動的エピゲノム変化により不活化し、正に調節する下流標的因子を選択的に持続的に活性化していることが示唆された(論文3)。これら細胞老化に重要な因子が、DNA メチル化異常により破綻することが大腸発癌に重要であると考えた。

胃癌を同様に DNA メチル化網羅的解析し階層的クラスタリングすると、胃癌は我々が以前同定していた低メチル化群と高メチル化群だけでなく、もう1つ超高メチル化群が存在することがわかり、EB ウィルス感染が超高メチル化を誘導する原因であることを証明した(論文4)。

(2) 詳細

(1) 研究テーマ「エピゲノム変化とそれに制御されるシグナルネットワークの解明」

マウス胎児線維芽細胞(MEF)にレトロウィルスをを用いて活性化癌遺伝子を導入し早期細胞老化を誘導した。エピゲノム変化を MeDIP-seq 法・ChIP-seq 法により、発現変化を発現アレイを用いて系統的に解析した。

DNA メチル化は Ras 変異で誘導されることはなかった。少なくとも MEF を用いた系では、癌遺伝子 Ras の変異により DNA メチル化異常が誘導されることも否定された。

一方ヒストン修飾は、活性化マーク H3K4me3、不活化マーク H3K27me3 を含めてダイナミックに変化した。発現との統合解析を行うと、H3K27me3 マークが消失し H3K4me3 マークが上昇する遺伝子は優位に発現上昇し、最も発現上昇する遺伝子群に分泌蛋白 Bmp2 が含まれていた。逆に、H3K27me3 マークを新たに獲得し H3K4me3 マークが消失する遺伝子は有意に発現低下し、最も発現低下した遺伝子 Smad6 や、Nog など Bmp2-Smad1 シグナルを阻害する因子が含まれていた(図1)。Bmp2 のノックダウン、Smad6, Nog の発現誘導により細胞老化の回避を認め、Bmp2-Smad1

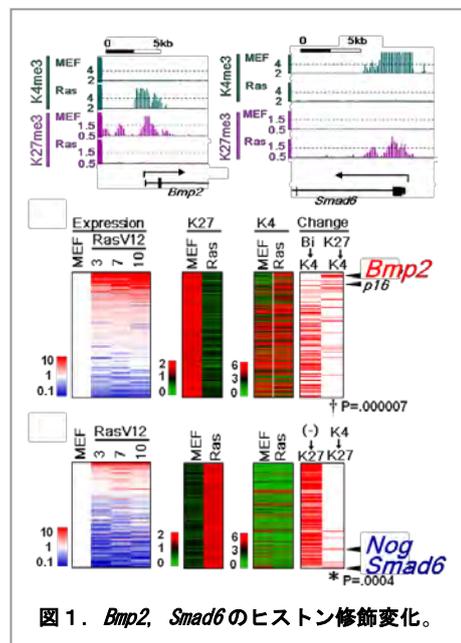


図1. Bmp2, Smad6のヒストン修飾変化。

シグナルの活性化が Ras 誘導性細胞老化に必須であることを示した。

(2) 研究テーマB「活性化されたシグナルの標的遺伝子の解明」

Bmp2-Smad1 シグナルの下流標的遺伝子を探るため、抗 Smad1 抗体を用いた ChIP-seq 法により Smad1 結合部位をゲノムワイドに同定した。Smad1 結合部位は転写開始点近傍に濃縮し、Smad1 標的遺伝子は発現上昇と有意に相関した。Smad6 は Smad1 標的遺伝子の1つであり、すなわちネガティブフィードバックを形成する。Smad6 を含め、Bmp2-Smad1 の下流遺伝子の一部を H3K4me3 消失や H3K27me3 獲得など動的・緻密なエピゲノム制御により発現抑制し、残る標的遺伝子を選択的に発現上昇させていることを明らかにした(図2) [Kaneda et al, *PLoS Genet* 2011]。

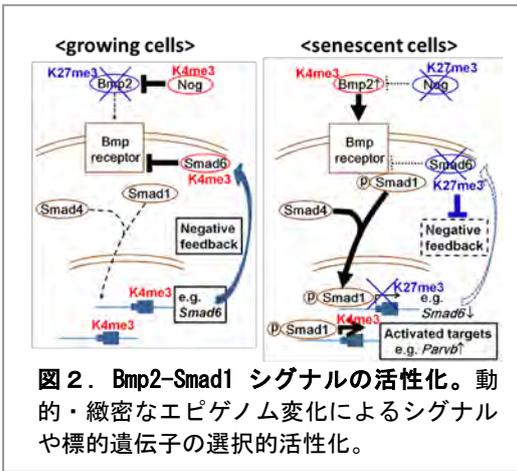


図 2. Bmp2-Smad1 シグナルの活性化。動的・緻密なエピゲノム変化によるシグナルや標的遺伝子の選択的活性化。

(3) 研究テーマC「癌におけるエピジェノタイプの解明」

(3)-1 大腸癌エピジェノタイプ

大腸癌 149 症例における DNA メチル化を網羅的・定量的に解析し、階層的クラスタリングを用いて大腸癌を3つのエピジェノタイプに分類した。高メチル化群は癌遺伝子 BRAF 変異と、中メチル化群は癌遺伝子 KRAS 変異と、それぞれ強く相関し、大腸癌発生機序が全く異なる3グループの存在が示唆された(図3) [Yagi et al, *Clin Cancer Res* 2010]。これら相関の原因はわかっていないが、i)癌遺伝子変異が特定のエピジェノタイプを誘導する、ii)エピジェネティクス異常の蓄積が遺伝子変異を誘導する、iii)癌遺伝子変異とエピジェネティクス異常はそれぞれ独立事象であるが重なることで癌化している、などの可能性を提唱した [Kaneda & Yagi, *Cancer Sci* 2011]。

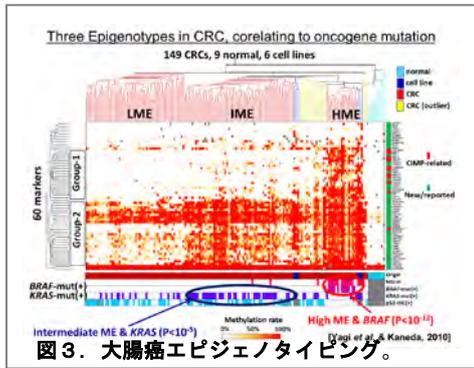


図 3. 大腸癌エピジェノタイプ化。

大腸前癌病変の解析の結果、定量的なメチル化量は腺腫と癌では全く差がなく、エピジェノタイプの形成は腺腫の段階で完成おり、3つのエピジェノタイプおよび癌遺伝子変異との相関も癌と同様に認められた。癌遺伝子変異による限局的増殖にとどまっている異常陰窩と、そこにメチル化異常が加わり腫瘍性増殖を呈した腺腫・癌、という構図が考えられた[Yagi et al, *Am J Pathol* 2012]。

(3)-2 胃癌エピジェノタイプ

胃癌は、以前のメチル化網羅的解析で新規メチル化標的遺伝子の同定や高メチル化症例群と低メチル化症例群の存在を報告している[Kaneda et al. *Cancer Res* 2002]。今回、Infinium ビーズアレイを用いて 51 症例の胃癌の DNA メチル化を網羅的に解析した。階層的クラスタリ



ングを行うと、高メチル化群と低メチル化群に加えて、超高メチル化群ともよぶべき第3番目のエピジェノタイプの存在がわかった(図4)[Matsusaka et al. *Cancer Res* 2011]。エピジェノタイプと多因子との相関を解析すると、超高メチル化群の胃癌症例は全てEB ウィルス陽性胃癌であり、逆にEB ウィルス陽性胃癌は1例の例外もなく超高メチル化を呈した。低メチル化群の胃癌細胞株にEB ウィルスを感染させると、18週以内に超高メチル化が誘導され、新規メチル化標的遺伝子は発現抑制された。胃癌の二大病因としてピロリ菌とEB ウィルスが知られるが、その病因の1つが胃癌エピジェノタイプの成立に原因として深く関わっていることが証明された。

EB ウィルス感染がDNA 異常メチル化を誘導する分子機構を解明する目的にEB ウィルスが胃癌細胞に潜伏感染した際に発現している潜伏遺伝子を1つ1つ胃癌細胞で強制発現しても異常メチル化は誘導されなかった。各ウィルス遺伝子よりむしろ、ウィルス感染そのもの、ウィルス感染に対する宿主細胞の防御機構が重要と考えられた。胃癌だけでなく他のEB ウィルス感染細胞を解析しても、ウィルスゲノムのメチル化状態と宿主ゲノムのメチル化状態はよく相関していた。ウィルス感染に対し、ウィルスゲノムをメチル化する宿主細胞の防御機構が過って宿主ゲノムにまで及ぶことが、新規メチル化に関与している可能性を考えた[Kaneda, et al. *Cancer Res* 2012]。

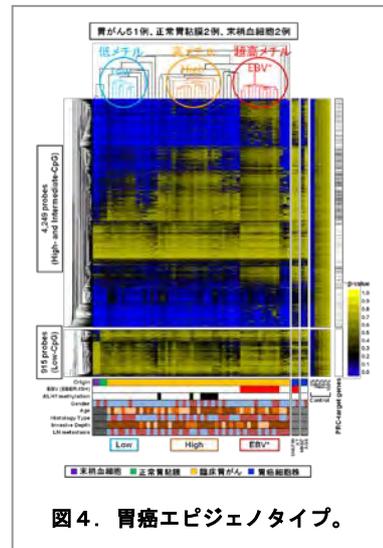


図4. 胃癌エピジェノタイプ。

3. 今後の展開

正常細胞で癌遺伝子変異が起きると、細胞は発癌を回避するために早期細胞老化する。このとき細胞は、ダイナミックなヒストン修飾変化を生理的に行い細胞老化に重要なシグナルを緻密に制御していた。このように細胞は、発癌ストレスに対し発癌しないよう生理的にエピゲノム変化させることを明らかにしたが、そのために必要な因子や機構は何であろうか。その因子が破綻すると発癌するのか、因子の破綻は大腸癌のエピジェノタイプと関連があるのか。これらの解明が、大腸癌の高リスク因子や癌細胞を細胞老化させる手法の確立につながるだろう。

EB ウィルスは成人のほとんどが潜伏感染で保持しているウィルスである。ここで疑問なのは、EB ウィルスが高い再現性で複数の癌抑制遺伝子を含む遺伝子群をメチル化するならば、なぜ一部の人しかEB ウィルス陽性胃癌を発症しないのだろうか。胃上皮細胞への感染が稀にしか成立しないのか。それとも感染そのものは稀ではなく、通常の正常細胞は感染したとしても異常メチル化しないような機構を持っていて、その機構が破綻しているときのみ異常メチル化が誘導されるのか。これらの解明は、ピロリ菌除菌という胃癌予防策が普及している現在、胃癌を完全に予防するための重要な知見となるだろう。

4. 自己評価

正常細胞で癌遺伝子変異が起きると、細胞は発癌を回避するために早期細胞老化する。このとき細胞は、ダイナミックなヒストン修飾変化を生理的に行い細胞老化に重要なシグナルを

緻密に制御していた。テーマ A「エピゲノム変化とそれに制御されるシグナルネットワークの解明」、テーマ B「活性化されたシグナルの標的遺伝子の解明」により、早期細胞老化における重要因子を解明するねらいは果たされた。

もう一つのねらい、研究テーマC「癌におけるエピジェノタイプの解明」については、大腸癌エピジェノタイプは腺腫の段階ですでに成立しており、癌遺伝子変異がDNAメチル化を誘導するのではなく、詳細な原因は不明だがおそらく癌遺伝子変異と並行して蓄積していて、癌遺伝子変異による細胞老化を回避させて癌化するのに必要な形質だと考えられた。Raf/Ras 変異が多いことで知られる甲状腺癌など他の癌種でもエピジェノタイプについて検討を加えたところ、同じ消化管腫瘍である胃癌において、3つの明瞭に異なるエピジェノタイプを同定した。胃癌においては、超高メチル化群と相関する EB ウィルス感染そのものが、超高メチル化を誘導する原因であることを証明できた。

総じて今研究課題のねらいはほぼ目標通りに達成したと思われる。また今後の展望に上述したように新たな発展的課題を2つ得、それぞれの実験モデルも構築できたことは、持続的に科学技術イノベーションを創出していく上での源泉を創出する「さきがけ」の目的と照らし合わせても、目標を達成できたのではないかと思われる。

5. 研究総括の見解

元来大腸がん、胃がん症例の解析を行うことでエピジェノタイプを明らかにし、その解析結果を元にごん化の仮説を立て、老化のメカニズム、細胞のがん化、特にエピゲノム変化と遺伝的変化、シグナル経路との関係などについて研究を進めた。細胞老化に関しては、そのシグナルネットワークを解明し、Bmp2-Smad1 系の活性化が Ras 誘導性細胞老化に必須であることを示した。次いで活性化されたシグナルの標的遺伝子も明らかにした。がん化に関しては、老化の破綻によるがん化という仮説を支持する結果を得た。また、胃がん発症における EB ウィルス感染とDNAメチル化のかかわりを示すデータも得た。このように研究課題のねらいは、積極的な研究の展開のもと目標通りに十分達成されており、高く評価する。

これら課題を達成する中で次ぎにめざす課題も見えてきた。細胞老化におけるエピゲノム変化を制御している因子や機構の存在である。仮説に関わる因子の同定とその機能解析に進んで欲しい。また、EB ウィルスについても一部のヒトしか発症しないメカニズムを明らかにして欲しい。

一山超えたら、また次の山が見えてきた。理想的な研究の展開である。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yagi K, Akagi K, Hayashi H, Nagae G, Tsuji S, Isagawa T, Midorikawa Y, Nishimura Y, Sakamoto H, Seto Y, Aburatani H, Kaneda A†. Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. Clin Cancer Res, 16:21-33, 2010.
2. Deng YB, Nagae G, Midorikawa Y, Yagi K, Tsutsumi S, Yamamoto S, Hasegawa K, Kokudo N, Aburatani H, Kaneda A†. Identification of genes preferentially methylated in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Cancer Sci, 101:1501-10, 2010.

3. Kaneda A†, Fujita T, Anai M, Yamamoto S, Nagae G, Morikawa M, Tsuji S, Oshima M, Miyazono K, Aburatani H. Activation of Bmp2-Smad1 signal and its regulation by coordinated alteration of H3K27 trimethylation in Ras-induced senescence. *PLoS Genet*, 7:e1002359, 2011.
4. Matsusaka K, Kaneda A†, Nagae G, Ushiku T, Kikuchi Y, Hino R, Uozaki H, Seto Y, Takada K, Aburatani H, Fukayama M. Classification of Epstein-Barr virus positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. *Cancer Res*, 71:7187-97, 2011.
5. Yagi K, Takahashi H, Akagi K, Matsusaka K, Seto Y, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A†. Intermediate methylation epigenotype and its correlation to KRAS mutation in conventional colorectal adenoma. *Am J Pathol*, 180:616-25, 2012.

(2)特許出願

該当なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な学会発表

1. Kaneda A., et al. “Cancer Epigenotyping.”第68回日本癌学会学術総会シンポジウム「From cancer genomics to cancer pathway analysis」, 2009.
2. Kaneda A. “Epigenotypes in gastrointestinal cancer and their causes/roles in carcinogenesis.” 13th Japanese-German Cancer Workshop, 2011.
3. Kaneda A., et al. “Harmonized epigenomic regulation of secreted protein signal in Ras-induced senescence and its disruption in cancer.” 第70回日本癌学会総会シンポジウム「Cancer microenvironment: Biology and its application」, 2011.
4. Kaneda A. “Cancer epigenotypes and tumor development mechanisms.” 第71回日本癌学会学術総会シンポジウム「Recent progress of epigenetics and cancer biology」, 2012.
5. Kaneda A. “Infection of Epstein-Barr virus is epigenetic driver of tumorigenesis.” 2nd Japanese-French Cancer Workshop, 2012.

総説論文

1. Kaneda A†, Yagi K. Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci*, 102: 18-24, 2011.
2. Kaneda A†, Matsusaka K, Aburatani H, Fukayama M. Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. *Cancer Res*, 72:3445-50, 2012.

英文著書

1. Kaneda A. Cancer classification by genome-wide and quantitative DNA methylation analyses. In “Epigenomics From Chromatin Biology to Therapeutics”, Krishnarao Appasani Ed. Pp. 293-305, 2012.

和文著書

1. 金田篤志:「DNA メチローム会式技術の発展と最新ストラテジー」, 実験医学, 28:1765-73, 2010.
2. 金田篤志:「がん診断とエピゲノム」, 医学のあゆみ, 235: 1038-44, 2010.
3. 金田篤志:「HCC とエピゲノム」, 肝胆膵, 62: 933-43, 2011.
4. 金田篤志、油谷浩幸:「がんのエピゲノム異常」, 細胞, 43: 504-7, 2011.
5. 金田篤志:「がんエピゲノムマーカー」. 日本臨床. 70:749-53,2012.