

26-A-15 エピジェネティクスを標的とした予防・診断・治療法開発基盤の構築

牛島 俊和

国立がん研究センター 研究所

研究の分類・属性

TR/早期開発分野

研究の概要

エピジェネティック薬は、血液腫瘍に対して実用化され、国外では固形腫瘍での臨床試験も進んでいる。また、各種がんでの全ゲノム解読の結果、高頻度の変異を示す新規のがん関連遺伝子は存在しないこと、がん関連遺伝子の変異のみでは遺伝子異常の全貌が説明できないのみならず、既知がん関連遺伝子の変異が認められないがんも存在することが明らかになった。従って、エピジェネティック異常を標的とした予防・診断・治療は、今後、益々重要になることが予測される。本研究では、1) エピジェネティック予防のための基盤として、ピロリ菌感染期間と DNA メチル化異常の程度の相関を明らかにし、一旦蓄積した異常の解除による予防効果を明らかにすること、2) エピジェネティック診断の基盤として、胃粘膜に蓄積した DNA メチル化異常を用いて異時性多発胃がんのリスクを診断する前向き研究（2008 年開始）の大規模患者コホート（826 名）を維持すること、また、一般健常者を対象としたリスク診断の前向き研究のプロトコールを作成すること（第 1 年次のみ）、さらに、センター内外で行われている萌芽期にあるエピジェネティック診断開発研究の基盤的支援を行うこと、3) エピジェネティック治療開発の基盤として、神経芽細胞腫における前臨床研究を実施すること（第 1 年次のみ）、また、胃がんにおける突然変異・DNA メチル化異常の全体像を明らかにし、最適治療プロトコールを確立（前臨床研究）することを目的とする。

平成 27 年度研究経費

20,000 千円

研究班の組織

研究者名	所属研究機関名・職名	分担研究課題名
牛島 俊和	国立がん研究センター研究所 エピゲノム解析分野・分野長	エピジェネティック予防の基盤構築
中島 健	国立がん研究センター中央病院 消化管内視鏡科・医長	エピジェネティック診断の基盤構築・患者コホートの維持
島津 太一	国立がん研究センターがん予防・検診研究センター 予防研究部・室長	エピジェネティック診断の基盤構築・患者コホートの維持

一瀬 雅夫	和歌山県立医科大学第二内科・教授	エピジェネティック診断の基盤構築・患者コホートの維持
山道 信毅	東京大学医学部附属病院・消化器内科・助教	エピジェネティック診断の基盤構築・患者コホートの維持
横井 千寿	国立国際医療研究センター消化器内科・医員	エピジェネティック診断の基盤構築・患者コホートの維持
片井 均	国立がん研究センター中央病院胃外科・科長	胃がんでのエピジェネティック治療の基盤構築
森 源喜	聖路加国際病院救急部・医師	エピジェネティック診断の基盤構築・患者コホートの維持

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(背景)

DNA 脱メチル化剤・ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤などのエピジェネティック薬は、骨髄異形成症候群などの血液腫瘍に対して実用化されており、さらに、固形腫瘍でも臨床試験が進行中である。また、次世代シーケンサーを用いた各種がんでの全ゲノム解読の結果から、変異のみならずエピジェネティック異常が重要であることが示唆されている。申請者自身も、胃がん 30 検体を既知がん関連遺伝子 55 個の変異について解析、変異が全く見つからない検体が半数近く存在することを示した[Cancer Lett, 330:33, 2013]。

さらに、申請者は世界のエピジェネティクス研究をリードする成果として、1)ピロリ菌感染により DNA メチル化異常が誘発され、その蓄積がヒト胃がんの原因となること[Clin Cancer Res, 12:989, 2006; Cancer Res, 70:1430, 2010]、2)複数の CpG アイランドの DNA メチル化異常を示す (CIMP 陽性) 神経芽細胞腫は極めて予後不良で、CIMP は MYCN 陰性症例でも強力な予後不良因子であること[Cancer Res, 65:828, 2005; JCO, 43:641, 2013]、3)CIMP 陽性の神経芽細胞腫に対して DNA 脱メチル化剤と分化誘導剤の併用が高い分化誘導効果を示すこと[Oncology, 74:50, 2008]、4)ピロリ菌を感染させたスナネズミで DNA 脱メチル化剤 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC)により DNA メチル化異常を抑制すると、胃がん発生が半分程度に抑制されること[Cancer Prev Res, 6:263, 2013]、などを証明してきた。

(目的と到達目標)

1. 予防

背景 4)の成果に基づき、今後ヒトへの応用に向け、副作用がほとんどない DNA 脱メチル化剤の開発や対象者の絞り込みのマーカーの開発を進める必要がある。そのための基盤として、胃粘膜の DNA メチル化レベルがピロリ菌感染期間と相関するの否かを、また、一旦蓄積した DNA メチル化異常の解除による予防効果を、明らかにする。

2. 診断

背景 1)の成果に基づき、胃粘膜での DNA メチル化異常の蓄積の程度を測定し、内視鏡的胃がん治療後の胃がんの異時性多発を予測する前向き臨床研究を 2008 年から開始した。これまでに 826 名の胃がん患者を登録、胃粘膜での DNA メチル化異常の測定が完了した。本研究では、この患者コホートを追跡観察、維持する。また、ピロリ菌を除菌した一般健常者についてもリスク診断を実現する必要がある、そのための準備を進める（厚労科研に移行のため第 1 年次のみ）。さらに、センター内外で行われている萌芽期にあるエピジェネティック診断開発研究の基盤的支援を行う。

3. 治療

背景 2)及び 3)の成果は、神経芽細胞腫におけるエピジェネティック治療の有効性を強く示唆する。本研究では、神経芽細胞腫にてエピジェネティック治療第 VIII 相試験を行うための基盤となる前臨床試験のデータを作成する（厚労科研に移行のため第 1 年次のみ）。また、胃がんでは突然変異が少ないこと、DAC が胃がん細胞株に強い増殖抑制作用を示すことは、特定の胃がん症例においてはエピジェネティック治療が有効であることを示唆する。本研究では、胃がんでのエピジェネティック治療適格症例を明らかにする基盤として、さらに胃がんでの突然変異・DNA メチル化異常の全体像の解析を進め、また、胃がんにおける最適なエピジェネティック治療プロトコルを確立する（前臨床研究）。

第 2 年次

(到達目標)

1. エピジェネティック予防研究において、マウスモデルを確立し、一旦蓄積した異常を解除する研究の基盤を作る。
2. エピジェネティックリスク診断研究のため、大規模患者コホート（826 名）を維持、異時性多発胃がん発生の追跡を継続する。さらに、センター内外で行われている萌芽期にあるエピジェネティック診断開発研究の基盤的支援を行う。
3. 胃がんにおける最適なエピジェネティック治療プロトコルを確立する（前臨床研究）。

(年次評価時点の実績要点)

1. エピジェネティック予防の研究
 - ・ ヘリコバクター・フェリス感染による胃炎でも胃粘膜（マウス）に DNA メチル化異常が誘発されることを世界で初めて示した。マウスでの DNA メチル化異常誘発モデルの確立は、エピジェネティック予防等の研究を推進するために極めて有用である。
2. エピジェネティック診断の研究
 - ・ 「組織に蓄積したエピジェネティック異常を測定することで発がんリスク診断が可能」という本研究により世界で初めて臨床的に示したコンセプトを、確固たるものにした。
 - ・ センター内外で行われている萌芽期にあるエピジェネティック診断開発研究を支援し、治療効果予測マーカーの同定や新規現象の解明につなげた。
3. エピジェネティック治療の研究
 - ・ 胃がんにおける抗がん剤耐性が、エピジェネティック薬により解除できることを示した。

研究成果と考察

第 2 年次評価時点

1. エピジェネティック予防の研究

ヘリコバクター・フェリス（フェリス菌）感染による胃炎が、DNA メチル化異常を誘発するかどうかを効率よく明らかにするために、まず、DNA メチル化異常が誘発されやすい遺伝子をスクリーニングした。即ち、マウス胃粘膜において、DNA メチル化誘発のプレマークとして知られる H3K27 トリメチル化が高レベルに存在する遺伝子を 355 個同定した。次に、これらの遺伝子のうち、H3K27 トリメチル化レベルが高い 10 遺伝子について、高感度な方法（定量 MSP 法）で DNA メチル化異常誘発を解析した結果、*Hoxc10* 遺伝子及び *Pcdh7* 遺伝子において DNA メチル化レベルの上昇が認められた。これにより、フェリス菌感染による胃炎でも胃粘膜に DNA メチル化異常が誘発されることが世界で初めて示された。マウスでの DNA メチル化異常誘発モデルは、エピジェネティック予防の研究を推進するために極めて有用である他、慢性炎症による DNA メチル化異常のメカニズムの解明等、多くの研究での利用が期待できる。

2. エピジェネティック診断の研究

異時性多発胃癌の発生予測の多施設共同前向き研究では、内視鏡的胃癌治療後に胃粘膜 DNA メチル化レベルを測定した胃癌患者 826 例の追跡を継続し、新たに 31 例の異時性多発胃癌の発生（累積で 123 例、追跡期間の中央値；4.8 年）を認めた。症例登録時の DNA メチル化異常の蓄積の程度と異時性多発胃癌の発生を解析したところ、ハザード比 2.8 (95%信頼区間 1.3-5.8、 $P=0.0016$) であった。これにより、前回解析時 [追跡期間の中央値；3.0 年、ハザード比 2.2 (95%信頼区間 1.1-4.4)、 $P=0.032$] に証明した組織に蓄積したエピジェネティック異常を測定することで発がんリスク診断が可能であるというコンセプトを確固たるものにした。エピジェネティック異常は様々な環境要因に曝露することで誘発されるため、個人の生活歴を反映した疾患リスク診断への幅広い応用が期待される。

また、センター内外で行われている萌芽期にあるエピジェネティック診断開発研究において採取された検体について、Infinium HumanMethylation450 BeadChip array を用いた DNA メチル化解析（頭蓋内胚細胞性腫瘍 61 例、乳がん 34 例、成人 T 細胞白血病 2 症例、骨肉腫 14 症例）、Ion Proton シークエンサーを用いた突然変異解析（リンパ腫 27 症例、大腸ポリープ 288 症例、脳腫瘍 24 症例）等の支援を行った。その結果、HER2 陽性乳がんにおけるトラスツズマブ及びパクリタキセル併用治療の効果予測マーカーの同定（向井博士）や頭蓋内胚細胞性腫瘍の発生起源の解明（市村博士）などにつなげた。

3. エピジェネティック治療の研究

エピジェネティック薬が、現在臨床で用いられている抗がん剤耐性に対する解除効果を有するか否かを解析するために、イリノテカン耐性の胃癌細胞株 OCUM-2M を低濃度 (300 nM) の DAC により 3 日間処理し、その後、0 から 100 nM の SN38 (イリノテカンの活性代謝物) により 3 日間処理した。その結果、DAC 非処理群と比較して、処理群において SN38 感受性の上昇が認められた。従って、エピジェネティック薬による抗がん剤耐性解除という戦略が、胃癌においても有用であることが示された。

また、胃癌細胞株 44As3 を 0.1 μM のデシタビン (DAC) 及び 0.3 μM の entinostat で処理したところ、DAC 単独では 52%程度、entinostat 単独では 47%の増殖阻害が認められた。それに対して、DAC と entinostat を併用した場合は、82%の増殖阻害が認められた。これにより、DAC と entinostat の組み合わせが胃癌治療でも有効であることが確認された。

エピジェネティック reader 阻害剤である BET 阻害剤は、約 50%の大腸がん細胞株の増殖を強く抑制することを明らかにした。また、BET 阻害剤と BRAF 阻害剤 vemurafenib の併用投与は、BRAF V600E 変異を持つ大腸がん細胞株の増殖抑制に対して相乗効果を示すことが示された。以上の結果は、胃癌などの固形がんにおけるエピジェネティック治療第 I/II 相試験を実施するための基盤情報として重要である。

倫理面への配慮

ヒトの臨床試料解析に関しては、倫理審査委員会の承認を得て実施する。研究対象者に十分な説明を行った後、文書による同意を得て実施する。臨床試料並びに附随する臨床情報・患者背景情報等は、個人情報管理者により匿名化した後に研究に用いる。DNA メチル化等の遺伝的素因を明らかにしない遺伝情報の解析では、「疫学研究に関する倫理指針」を遵守する。申請時には、遺伝子多型・生殖細胞突然変異等の遺伝的素因を明らかにする遺伝情報の解析は含まれないが、解析する必要が生じた場合には「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」を遵守する。臨床試験の計画に際しては「臨床研究に関する指針」を遵守する。動物実験については、実験動物倫理審査委員会の承認を得て、動物実験指針に従って実施する。

本研究に関連する、本研究期間中の主な論文・学会発表等

第 2 年次

(雑誌論文)

- ・ 国立がん研究センター研究開発費による成果であることが記載されているもの

【研究内容に即したもの】

1. Mori G, Nakajima T, Asada K, Shimazu T, Yamamichi N, Maekita T, Yokoi C, Fujishiro M, Gotoda T, Ichinose M, Ushijima T and Oda I. Incidence and risk factors of metachronous gastric cancer after endoscopic *Helicobacter pylori* eradication: results of a large-scale, multicenter cohort study in Japan. **Gastric Cancer**, online.

【本研究費が論文の研究内容に間接的に貢献したもの】

1. Yoshida S, Yamashita S, Niwa T, Mori A, Ito S, Ichinose M and Ushijima T. Epigenetic inactivation of FAT4 contributes to gastric field cancerization. **Gastric Cancer**, online.
 2. Shimazu T, Asada K, Charvat H, Kusano C, Otake Y, Kakugawa Y, Watanabe H, Gotoda T, Ushijima T and Tsugane S. Association of gastric cancer risk factors with DNA methylation healthy Japanese: a cross-sectional study. **Carcinogenesis**, 36: 1291-1298, 2015.
- 国立がん研究センター研究開発費による成果であることが記載はないが、関連するもの
1. Yamamichi N, Hirano C, Ichinose M, Takahashi Y, Minatsuki C, Matsuda R, Nakayama C, Shimamoto T, Kodashima S, Ono S, Tsuji Y, Niimi K, Sakaguchi Y, Kataoka Y, Saito I, Asada-Hirayama I, Takeuchi C, Yakabi S, Kaikimoto H, Matsumoto Y, Yamaguchi D, Kageyama-Yahara N, Fujishiro M, Wada R, Mitsushima T and Koike K. Atrophic gastritis and enlarged gastric folds diagnosed by double-contrast upper gastrointestinal barium X-ray radiography are useful to predict future gastric cancer development based on the 3-year prospective observation. **Gastric Cancer**, online.
 2. Kataoka Y, Tsuji Y, Sakaguchi Y, Kodashima S, Yamamichi N, Fujishiro M and Koike K. Preventing esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection: steroid injection and shielding with polyglycolic acid sheets and fibrin glue. **Endoscopy**, 47 Suppl 1: E473-474, 2015.
 3. Ono S, Sakaguchi Y, Tsuji Y, Kodashima S, Yamamichi N, Fujishiro M and Koike K. Foam plompage: a novel technique for optimal fixation of polyglycolic acid sheets positioned using "clip and pull" after esophageal endoscopic submucosal dissection. **Endoscopy**, 47 Suppl 1 UCTN: E435-436, 2015.
 4. Yamamichi N, Hirano C, Takahashi Y, Minatsuki C, Nakayama C, Matsuda R, Shimamoto T, Takeuchi C, Kodashima S, Ono S, Tsuji Y, Fujishiro M, Wada R, Mitsushima T and Koike K. Comparative analysis of upper gastrointestinal endoscopy, double-contrast upper gastrointestinal barium X-ray radiography, and the titer of serum anti-*Helicobacter pylori* IgG focusing on the diagnosis of atrophic gastritis. **Gastric Cancer**, online.
 5. Okushin K, Takahashi Y, Yamamichi N, Shimamoto T, Enooku K, Fujinaga H, Tsutsumi T, Shintani Y, Sakaguchi Y, Ono S, Kodashima S, Fujishiro M, Moriya K, Yotsuyanagi H, Mitsushima T and Koike K. *Helicobacter pylori* infection is not associated with fatty liver disease including non-alcoholic fatty liver disease: a large-scale cross-sectional study in Japan. **BMC Gastroenterol**, 15: 25, 2015.
 6. Yamamichi N, Shimamoto T, Takahashi Y, Sakaguchi Y, Kakimoto H, Matsuda R, Kataoka Y, Saito I, Tsuji Y, Yakabi S, Takeuchi C, Minatsuki C, Niimi K, Asada-Hirayama I, Nakayama C, Ono S, Kodashima S, Yamaguchi D, Fujishiro M, Yamaji Y, Wada R, Mitsushima T and Koike K. Trend and risk factors of diverticulosis in Japan: age, gender, and lifestyle/metabolic-related factors may cooperatively affect on the colorectal diverticula formation. **PLoS One**, 10: e0123688, 2015.
 7. Tsuji Y, Fujishiro M, Kodashima S, Ono S, Niimi K, Mochizuki S, Asada-Hirayama I, Matsuda R, Minatsuki C, Nakayama C, Takahashi Y, Sakaguchi Y, Yamamichi N and Koike K. Polyglycolic acid sheets and fibrin glue decrease the risk of bleeding after endoscopic submucosal dissection of gastric neoplasms (with video). **Gastrointest Endosc**, 81: 906-912, 2015.
 8. Sakaguchi Y, Tsuji Y, Ono S, Saito I, Kataoka Y, Takahashi Y, Nakayama C, Shichijo S, Matsuda R, Minatsuki C, Asada-Hirayama I, Niimi K, Kodashima S, Yamamichi N, Fujishiro M and Koike K. Polyglycolic acid sheets with fibrin glue can prevent esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection. **Endoscopy**, 47: 336-340, 2015.
 9. Charvat H, Sasazuki S, Inoue M, Iwasaki M, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T and Tsugane S; JPHC Study Group. Prediction of the 10-year probability of gastric cancer occurrence in the Japanese population: the JPHC study cohort II. **Int J Cancer**, 138: 320-331, 2016.
 10. Ma E, Sasazuki S, Shimazu T, Sawada N, Yamaji T, Iwasaki M, Inoue M and Tsugane S. Reactive oxygen species and gastric cancer risk: a large nested case-control study in Japan. **Eur J Epidemiol**, 30: 589-594, 2015.
 11. Moribata K, Kato J, Iguchi M, Nakachi K, Maeda Y, Shingaki N, Niwa T, Deguchi H, Inoue I, Maekita T, Tamai H and Ichinose M. Endoscopic features associated with development of metachronous gastric cancer in patients who underwent endoscopic resection followed by *Helicobacter pylori* eradication. **Dig Endosc**, online.
 12. Fukatsu K, Kato J, Niwa T, Iguchi M, Muraki Y, Maekita T, Inoue I, Tamai H, Deguchi H, Motibata K, Nakamura Y, Murata S and Ichinose M. Microscopic invasion patterns and epithelial cell-phenotypes in early gastric cancer with submucosal invasion. **J Cytol Histol**, online.

(学会発表)

1. 牛島俊和. 生活履歴を刻むエピゲノム. 第29回日本医学会総会 2015 関西, 2015年4月. (京都)
2. 前田将宏. 活性化胃癌関連線維芽細胞には多くのエピジェネティック変化が存在する. 第9回日本エピジェネティクス研究会年会, 2015年5月. (東京)
3. Mori G. Incidence and risk factors of metachronous gastric cancer after endoscopic resection for early gastric cancer and successful *Helicobacter pylori* eradication : results from a large-scale, multicenter cohort study in Japan. DDW2015, Washington DC, May, 2015.
4. 竹島秀幸. Tet3 is down-regulated by chronic inflammation, potentially via induction of multiple microRNAs. 第40回内藤コンファレンス, 2015年9月. (札幌)
5. 牛島俊和. Multiple pathways, highly diverse among individual cells, are normalized by epigenetic therapy. 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月. (名古屋)
6. 前田将宏. 活性化胃癌関連線維芽細胞には多くのエピジェネティック異常が存在する. 第26回日本消化器癌発生学会総会, 2015年11月. (米子)
7. 竹島秀幸. 慢性炎症による Tet 遺伝子の抑制には、多数のマイクロ RNA が関与する. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会), 2015年12月. (神戸)
8. 竹島秀幸, 牛島俊和. 慢性炎症による異常 DNA メチル化誘発の分子機構. 第32回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 2016年1月. (香川)
9. 島津太一. 検診受診者における胃がんリスク要因と胃粘膜 DNA メチル化レベルとの関連. がん予防学術大会 2015 さいたま, 2015年6月. (さいたま市)
10. Iguchi M, Kato J, Yamamoto Y, Nakachi K, Yoshida T, Maeda Y, Moribata K, Muraki Y, Deguchi H, Inoue I, Maekita T, Tamai H and Ichinose M. Extensive mucosal atrophy quantified by serum pepsinogen levels can predict metachronous gastric cancer development after endoscopic resection regardless of *Helicobacter pylori* eradication. DDW2015, Washington DC, May, 2015.
11. Moribata K, Iguchi M, Deguchi H, Maeda Y, Shingaki N, Niwa T, Inoue I, Maekita T, Tamai H, Kato J and Ichinose M. Predictive factors for metachronous gastric cancer after HP eradication in the post-ESD status. UEGW, Barcelona, Spain, 2015.
12. 吉田岳市, 加藤順, 一瀬雅夫. *H. pylori* 除菌後の胃癌発生リスク第57回日本消化器病学会大会, 2015年10月. (東京)
13. 吉田岳市, 加藤順, 一瀬雅夫. *H. pylori* 感染胃炎と除菌後の胃がん発生-健常者の長期追跡研究-第101回日本消化器病学会総会, 2015年4月. (仙台)