

尿路上皮がんにおける DNA メチル化異常とがん診断への応用

奈良県立医科大学分子病理学講座

千原良友

ABERRANT DNA METHYLATION IN UROTHELIAL CANCER

YOSHITOMO CHIHARA

Department of Molecular Pathology, Nara Medical University

Received October 15, 2010

Abstract: エピジェネティクス異常は種々のがんで認められる現象であり, がん発生における遺伝子発現異常に関与することが明らかになってきた。がん研究の分野ではエピジェネティクス異常を指標とした診断や治療への応用の試みが盛んである。

尿路上皮がんはがん細胞が尿中に存在するため, 尿を用いた低侵襲な新しい診断法が期待されているが未だ臨床応用に十分な分子マーカーは存在しない。

本稿では, DNA メチル化を指標とした尿路上皮がん診断について述べる。

Key words : urothelial cancer, DNA methylation, diagnosis

はじめに

エピジェネティクスは塩基配列の変化を伴わない遺伝子制御機構であり, ゲノム上の多数の遺伝子を選択的に活性化または不活性化することで細胞の発生, 分化に重要な役割を担う。がんにおけるエピジェネティクスの異常は多段階発がん過程のごく早期から認められ, 多数の異常が蓄積することで遺伝子異常を誘導することが報告されている。したがって, 多段階発がん過程に生じるエピジェネティクス異常の解明は, がんの予防・診断・治療への応用のみならず, がんの生物学的特性を明らかにするという観点からも期待されている。

エピジェネティクスによる遺伝子制御機構は, 1) DNA メチル化, 2) ヒストン修飾, 3) ナクロオソームポジションと, これらの相互作用によるクロマチン構造の変化による調節, および 4) マイクロ RNA による調節に大別される。とくに DNA メチル化異常は発がんの初期段階から高頻度に存在していること, 微量の臨床試料から定量解析が簡便に行える等の理由から, がんを診断するマーカーとして優れている。

われわれは尿路上皮がんにおける DNA メチル化異常の解析と, 尿中剥離細胞を用いた診断マーカーの開発に

取り組んできた。本稿ではわれわれの研究成果を中心に尿路上皮がんにおける DNA メチル化異常と臨床応用の可能性について概説する。

がんで認められる DNA メチル化異常

DNA メチル化は CpG 部位(シトシン, グアニンの連続配列)のシトシン 5 位炭素原子にメチル基が付加される現象をいう。DNA メチル化は DNA メチル基転移酵素によって調節される生理的, 可逆的な反応であり, 遺伝子発現の調節を行う機構の一つであると考えられている。哺乳類のゲノム DNA では全 CpG 部位のうち約 80% がメチル化されている¹⁾。CpG 部位が多く存在する領域は LINE, SINE などのレトロトランスポゾン由来の繰り返し配列であり, この領域に存在する CpG 部位は生理的にメチル化されている。また, 遺伝子プロモーター領域には CpG アイランドと呼ばれる CpG 部位が高頻度に出現する領域があり, この CpG 部位は生理的にはメチル化されていない²⁾。遺伝子プロモーター領域に CpG アイランドが存在する遺伝子は, この領域の DNA メチル化状態は遺伝子の転写を制御している。

がん組織における DNA メチル化異常は「ゲノム全体の低メチル化と局所的な高メチル化」である。LINE,

SINE などの繰り返し配列は全ゲノムの40%以上を占めるため、これらの領域はがんにおいては一様に低メチル化を示し、ゲノム全体の低メチル化に寄与している。ゲノムの低メチル化は染色体不安定性を来し、リンパ腫などの腫瘍発生を促進する⁹⁾。また、近年膀胱がんにおいて Met 遺伝子の発現上昇と Met 特異的 LINE1 の低メチル化との関連が報告されたが⁴⁾、ゲノム全体に存在する繰り返し配列のメチル化異常とがん関連遺伝子群との関係は明らかになっていない。一方、CpG アイランドの高メチル化は下流に位置する p16, MLH1, E-cadherin など主ながん抑制遺伝子の発現低下を来すため⁵⁾、種々のがんが積極的に研究が行われてきた。正常細胞では発現している遺伝子を例にみると、その遺伝子はがん化に向かうにつれプロモーター領域のメチル化が蓄積され、ついには遺伝子がサイレンシングされる (Fig. 1)。がん化に向かう細胞では異常メチル化が蓄積されるが、病理学的に正常で遺伝子発現も正常である前がん状態(前がん病変とは異なる)が存在する。エピジェネティクスを用いたがん診断の最大のメリットはこの前がん状態を識別しうることにある。マイクロアレイ等を用いた全ゲノム

領域の網羅的解析では、遺伝子発現に関与しないがん随伴性の DNA メチル化異常が種々のがんが報告されており⁶⁾、DNA メチル化異常を示標としたがんの存在診断、リスク診断および病態診断の臨床的有用性が検討されている。

尿路上皮がんにおける DNA メチル化異常

尿路上皮がんに生じる DNA メチル化異常の解析も様々ながん関連遺伝子群のプロモーター領域の解析に始まり、遺伝子発現、悪性度、予後との関連が多方面から報告されてきた。例えば、膀胱上皮内がん(CIS: Carcinoma in situ)においては、細胞間接着分子である E-cadherin のプロモーター領域が高頻度にメチル化され遺伝子発現が低下する。その結果、がん細胞は容易に尿中に剥離し、高率に尿細胞診で診断可能である⁷⁾。また、正常尿路上皮で発現している ABO 遺伝子は、膀胱がんでは染色体欠失とメチル化の2ヒットによって発現が消失し、これまで染色体欠失だけでは説明できなかった ABO 遺伝子発現異常の原因が明らかになった⁸⁾。この報告では膀胱異形成では遺伝子発現は保たれていたが、膀胱異

Gene expression

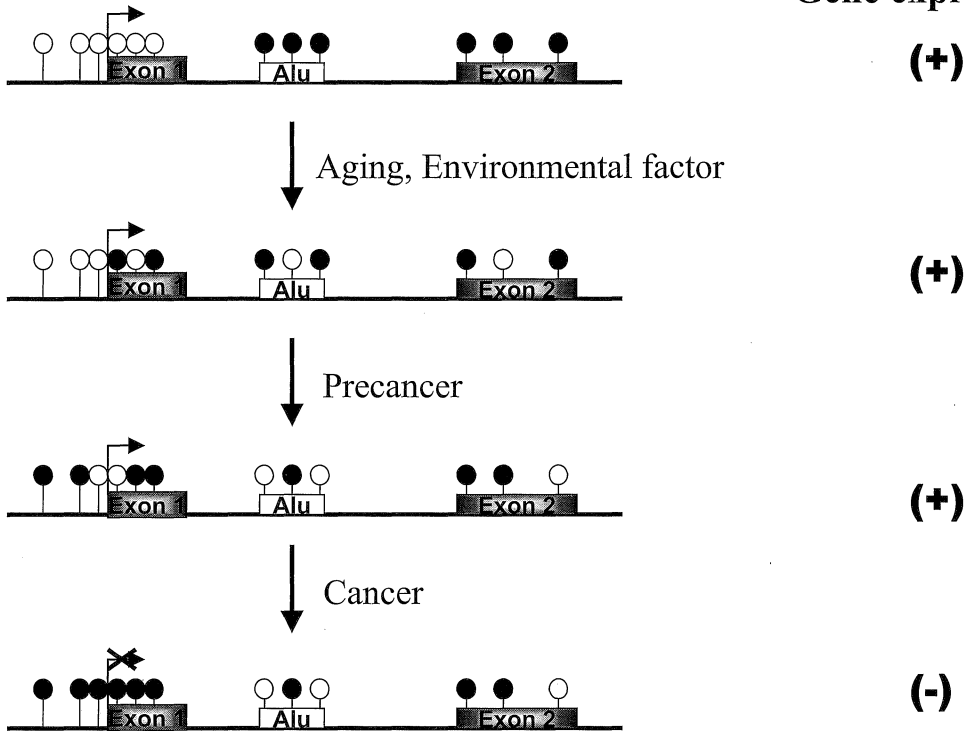
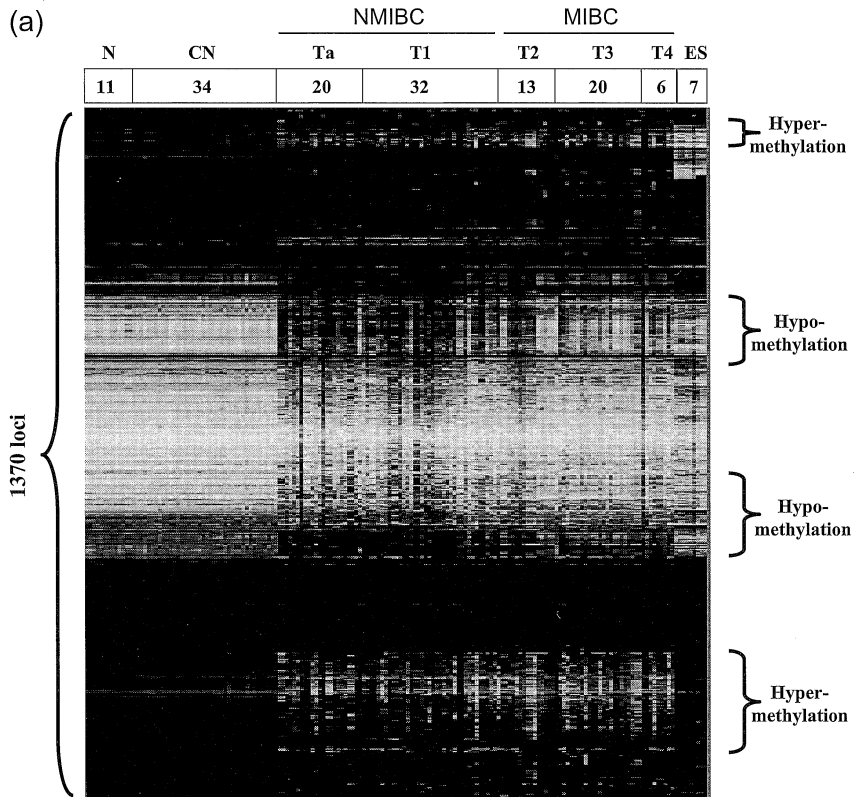


Fig. 1. Role of 5-Methylcytosine in Cancer.



(b) Hypermethylated Loci

Hypomethylated Loci

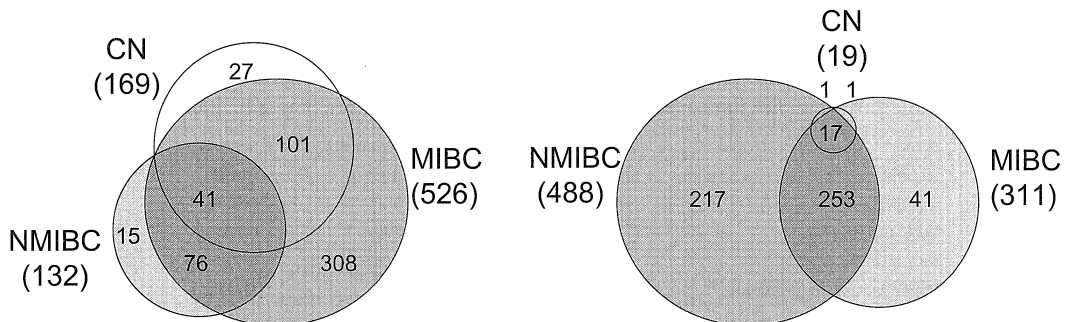


Fig. 2. (a) : Supervised cluster analysis of bladder samples at 1,370(784 genes) using Illumina GodenGate methylation assay. N (n=11) represents normal tissue from patients without urothelial cancer (UC), CN (n=34) represents corresponding normal-appearing tissue from UC patients, Ta-T1 (n=49) represents NMIBC, and T2-T4 (n=38) represents MIBC. Seven embryonic stem cells (ES) were used for reference. No methylation is shown in black with increasing DNA methylation is shown in white. (b): Venn diagram of the overlap of hypermethylated and hypomethylated loci. The hypermethylated and hypomethylated cancer-specific loci were determined using three separate comparisons of tissue from UC patients (CN, NMIBC, and MIBC) to 11 N samples (5% FDR, Wilcoxon test).

形成においてDNAメチル基転移酵素(DNMT: DNA methyltransferase)の活性が上昇⁹⁾, 遺伝子発現異常の前段階でのDNAメチル化異常が指摘された。また尿路上皮がんの既存リスクとしての喫煙とRUNX3の高メチル化の関連性が報告された¹⁰⁾。このように尿路上皮がんにおけるDNAメチル化異常は泌尿器科医が臨床で遭遇するconventionalな事象を分子生物学的に説明する興味深いツールとなった。

尿路上皮がんは同時性異時性の多中心性発生が最大の特徴である。内視鏡的切除で治癒可能な非筋層浸潤性膀胱がん(NMIBC: Non muscle invasive bladder cancer)は高頻度に再発し、一部は筋層浸潤性がん(MIBC)へ進展するため厳重な経過観察が必要である。この一因として担がん尿路上皮に“がん発生の素地(Field effect)”が形成されると考えられている。Field effectは前がん状態に相当し、既にメチル化異常が認められると考えられる。

われわれは正常尿路上皮(N), 担がん尿路上皮(CN)と各深達度の膀胱がん(T)計136サンプルを対象として、Illumina GoldenGate assayを用いた全ゲノム領域の網羅的メチル化解析を行った(Fig. 2a)¹¹⁾。X染色体を除いた1370カ所のCpG部位のうち、Nと比較してTにおいて有意に高メチル化を示したCpG部位はNMIBC: 132カ所、MIBC: 526カ所であった。一方、低メチル化を認めたCpG部位はNMIBC: 488カ所、MIBC: 311カ所であった。CNにおいては169カ所に高メチル化、19カ所に低メチル化CpG部位を認めた。NMIBCとMIBCの比較では、NMIBCに認めた高メチル化領域はMIBCにおいても共通に認められた。また、308カ所のCpG部位はMIBCにのみ高メチル化を認め、217カ所のCpG部位で

NMIBCにのみ低メチル化を認めた(Fig. 2b)。これらの結果から、担がん尿路上皮には既に膀胱がんが生じるDNAメチル化異常が生じており、膀胱がん発がん過程におけるエピジェネティックfield effectが示された。NMIBCとMIBCの異常メチル化領域が異なることから、両者の発がんには異なった遺伝子が関与することが示唆された。

DNAメチル化を示標とした尿路上皮がん診断

尿路上皮がんが生じるDNAメチル化異常をがん診断に応用する試みも多い。とくに尿路上皮がんは尿中剥離細胞としてがん細胞や前がん状態の細胞が存在し、またこれらの細胞由来のDNAが尿中に(浮遊または溶解して)存在すると考えられるため、尿を用いた低侵襲な診断法の開発が期待されている。

診断マーカーとしてのターゲットは必ずしも遺伝子発現には関与しないがん随伴性のDNAメチル化異常に言及されることも多い。Table 1に定量的メチル化解析を用いて行われた報告を示す。がん組織を対象にした報告では1遺伝子のメチル化異常から高特異度の結果が得られている。一方、尿を対象とした報告では高感度、高特異度を得るためには複数のマーカーの組み合わせが必要となる。またターゲット遺伝子も一定の見解を得ない。これは尿試料の解析がいかに困難であるかを示している。

尿中DNAは微量である上に様々な細胞のコンタミネーションとそれらの細胞由来のものが存在し、また尿自体による変性を生じる。DNAメチル化マーカーはがん早期の変化を検出可能であるが、DNAメチル化は環境因子や炎症等でも生じる可逆的な変化であること、組織

Table 1. Key studies in quantitative DNA methylation-based detection of bladder cancer

	Genes	Sensitivity	Specificity	Method	References
Tissue	<i>DAPK1</i>	74%	100%	QMSP	12
Tissue	<i>IGFBP1</i>	66%	100%	QMSP	12
Tissue	<i>APC, GSTP1, TIGI</i>	80%	93%	QMSP	13
Urine	<i>BCL2, DAPK, TERT</i>	78.4%	100%	QMSP	14
Urine	<i>CDKN2A, GATP1, MGMT, p14^{ARF}</i>	82%	96%	Methylight	15
Urine	<i>TWIST1, NID2</i>	90%	93%	QMSP	16
Urine	<i>CCNA1</i>	57%	100%	QMSP	17
Urine	<i>MINT1</i>	31%	100%	QMSP	17
Urine	<i>CRBP</i>	39%	96%	QMSP	17
Urine	<i>CCND2</i>	33%	100%	QMSP	17
Urine	<i>PGP9.5</i>	41%	100%	QMSP	17
Urine	<i>CALCA</i>	28%	88%	QMSP	17
Urine	<i>AIM1</i>	54%	100%	QMSP	17

特異的にメチル化状態が異なることから、がん特異的なメチル化を検出することが困難になるというジレンマがある。

われわれはこれらの欠点を解消するために一連の研究をデザインした(Fig. 3)。十分な試料を得るため、また人種間の Bias を考慮し、海外を含む多施設共同研究とした。第一段階は前述の網羅的解析による尿路上皮がん特異的に DNA メチル化を生じる CpG 部位の同定であり、この結果から 23 遺伝子上の 30 カ所の CpG 部位を選出した(Table 2)。これらの遺伝子群は尿路上皮がんにおいてはこれまでメチル化異常の報告がない遺伝子群であった。

第 2 段階では異なるサンプルセットを用いて Pyrosequence 法による候補 CpG 部位の定量解析を行った。各 CpG 部位のメチル化頻度のカットオフ値を設定した。このテストセットにおいて各遺伝子単独では、感度(83.2%-94.4%)、特異度(84.4%-100%)、AUC(0.85-0.97)の正確さで膀胱がん診断が可能であった。さらにこれらの組み合わせ用いてヒストグラムを作成した(Fig. 4a)。このヒストグラムを用いて 13 遺伝子中 7 カ所以上の CpG 部位で異常メチル化を認める組織をがんと規定すると感度 94.3%、特異度 97.8% の正確さで膀胱がん診断が可能であった(存在診断)。同様に別の遺伝子の組み合わせでは

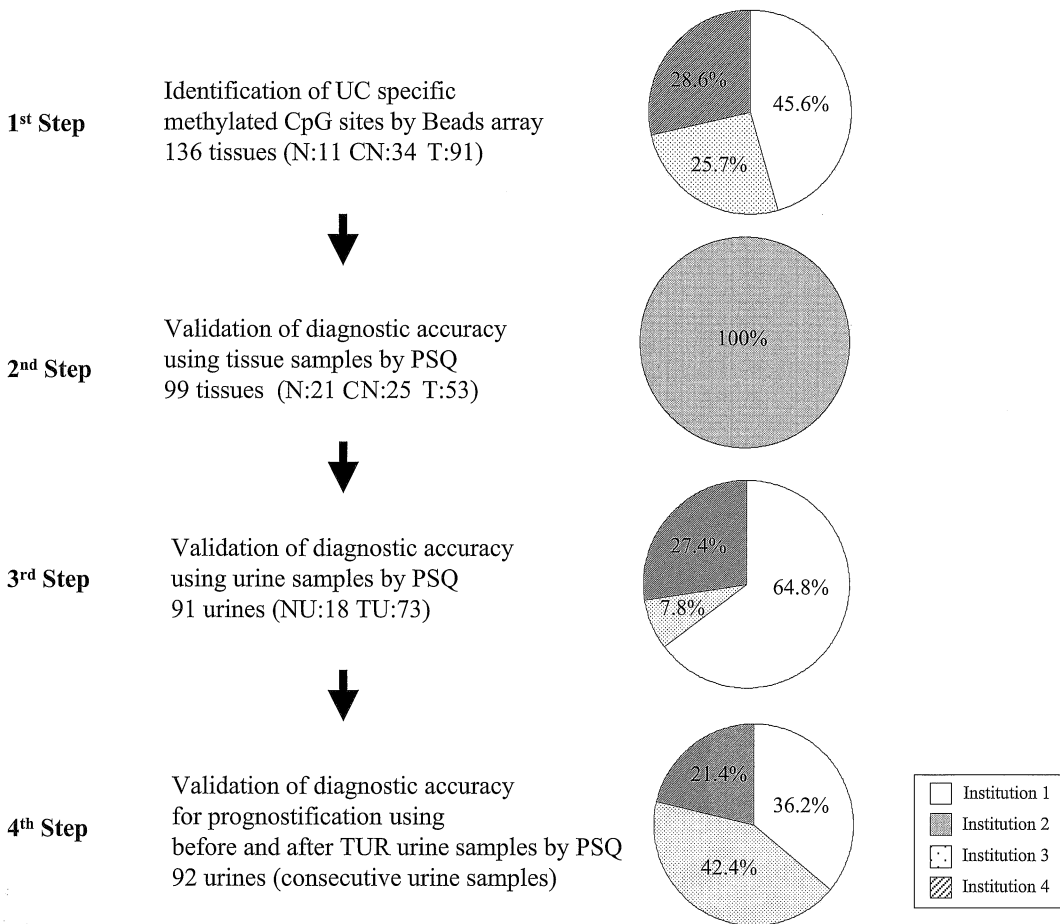


Fig. 3. Design of establishing DNA methylation indicators for UC diagnosis. N:normal urothelia, CN: corresponding normal urothelia from UC patient, T: tumor, PSQ: pyrosequencing, NU: normal urine, TU: urine from UC patient, TUR: trans urethral resection. Institution 1: Dept. of urology, Norris comprehensive cancer center, University of southern California. Institution2: Urology division, National cancer center hospital, Tokyo. Institution 3: Dept of urology, Nara Medical University. Institution 4: Dept. of urology, Tochigi Cancer Center Hospital.

Table 2. Thirty candidate indicators from 23 genes based on DNA methylation for UC diagnosis

Gene	Annotation
Hypermethylation	
<i>TJP2</i>	Tight junction protein 2
<i>MYOD1</i>	Myogenic differentiation 1
<i>HOXA9</i>	Homeo box A9
<i>SOX1</i>	Sex determining region Y box1
<i>CDH13</i>	Cadherin 13
<i>EYA4</i>	Eyes absent homolog 4
<i>CYP1B</i>	Cytochrome P450 family 1
<i>IRAK3</i>	Interleukin-1 receptor-associated kinase 3
<i>NPY</i>	Neuropeptide Y
<i>IPF1</i>	Insulin promoter factor 1
<i>GALR1</i>	Galanin receptor 1
<i>DLK1</i>	Delta-like 1
<i>RIPK3</i>	Receptor-interacting serine-threonine kinase 3
Hypomethylation	
<i>CEACAM1</i>	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
<i>CAPGP</i>	Capping protein
<i>HLADPA1</i>	Major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
<i>VAMP8</i>	Vesicle-associated membrane protein 8
<i>SPP1</i>	Secreted phosphoprotein 1
<i>CASP8</i>	Caspase 8
<i>IFNG1</i>	Interferon gamma receptor 1
<i>NOS3</i>	Nitric oxide synthase 3
<i>CLDN4</i>	Claudin 4
<i>NBL1</i>	Neuroblastoma suppression of tumorigenicity 1

感度76.0%,特異度100%の正確さで正常尿路上皮と担がん尿路上皮を区別可能であった(リスク診断)(Fig. 4b). 第3段階は尿路上皮がんを有する患者尿と健常者尿を用いた比較で,先の存在診断の遺伝子群を用いて感度94.4%,特異度100%の正確さで尿路上皮がんを診断可能であった(Fig. 4c).

このように尿路上皮がんが生じるDNAメチル化異常は尿からも高頻度に検出可能である.しかしながら感度,特異度ともに満足できる結果を得るためには13遺伝子が必要であった.ヒストグラムに示すように個々のマーカーを比較すると尿中がん細胞の検出感度はがん組織よりはるかに低下する.現在,第4段階として膀胱がん症例の術後経時的尿を前向きに解析する研究を進めている.

これらのDNAメチル化マーカーの再発予測に対する有用性を検討するとともに,実際の臨床応用を目指しさらに候補遺伝子を絞り,検出感度を上げる定量系を確立する必要がある.

おわりに

低侵襲で正確ながんの診断法を確立するために分子マーカーの担う役割は大きい.DNAメチル化はがん細胞に生じる分子生物学的変化の一面にすぎないが,がんにおける様々な異常に関連し,異常にアプローチする有効な手段の一つである.エピジェネティクスの解析法は急速に進行しており,日常臨床に活用される日も近いと思われる.

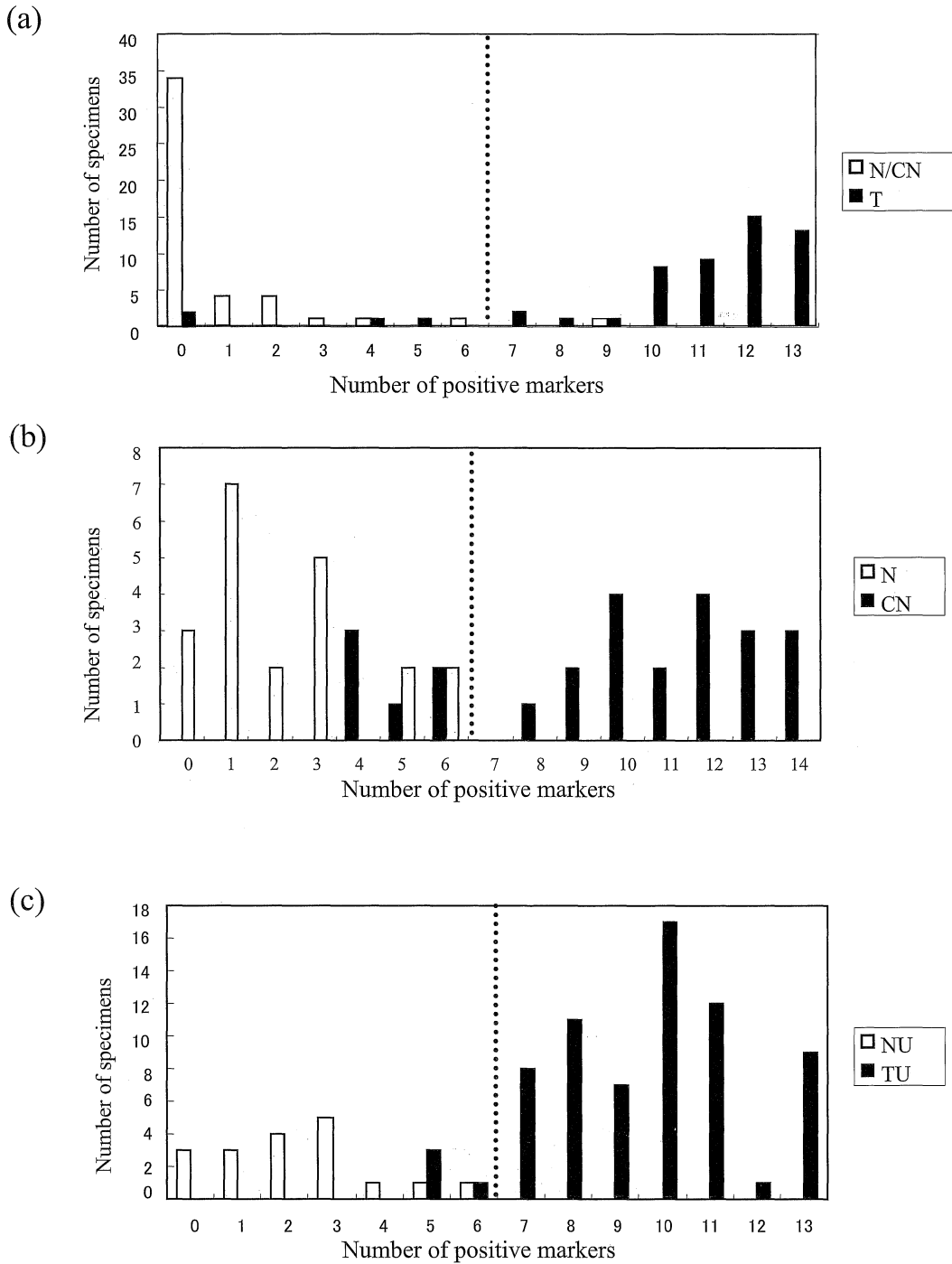


Fig. 4. Histogram showing the number of indicators satisfying the criteria based on the each cut-off value (data not shown). (a) Based on this histogram, if the numbers of positive indicator are 7 or more, they are diagnosed as Tumor. Based on these criteria, the sensitivity and specificity in this cohort were 94.3% and 97.8% respectively (T vs.N/CN). (b) CN vs. N. 76.0% of sensitivity, 100% of specificity. (c) TU vs. NU. 94.4% of sensitivity, 100% of specificity.

文 献

- 1) Razin, A. and Riggs, A.D. : DNA methylation and gene function. *Science* **210** : 604-610, 1980.
- 2) Jones, P.A. and Takai, D. : The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293** : 1068-1070, 2001.
- 3) Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J.W., Leonhardt, H. and Jaenisch, R. : Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* **300** : 489-492, 2003.
- 4) Wolff, E.M., Byun, H.M., Han, H.F., Sharma, S., Nichols, P.W., Siegmund, K.D., Yang, A.S., Jones, P.A. and Liang, G. : Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer. *PLoS Genet.* **6** : e1000917, 2010.
- 5) Ushijima, T. and Sasako, M. : Focus on gastric cancer. *Cancer Cell* **5** : 121-125, 2004.
- 6) Ushijima, T. : Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer* **5** : 223-231, 2005.
- 7) Horikawa, Y., Sugano, K., Shigyo, M., Yamamoto, H., Nakazono, M., Fujimoto, H., Kanai, Y., Hirohashi, S., Kakizoe, T., Habuchi, T. and Kato, T. : Hypermethylation of an E-cadherin (CDH1) promoter region in high grade transitional cell carcinoma of the bladder comprising carcinoma in situ. *J. Urol.* **169** : 1541-1545, 2003.
- 8) Chihara, Y., Sugano, K., Kobayashi, A., Kanai, Y., Yamamoto, H., Nakazono, M., Fujimoto, H., Kakizoe, T., Fujimoto, K., Hirohashi, S. and Hirao, Y. : Loss of blood group A antigen expression in bladder cancer caused by allelic loss and/or methylation of the ABO gene. *Lab. Invest.* **85** : 895-907, 2005.
- 9) Nakagawa, T., Kanai, Y., Saito, Y., Kitamura, T., Kakizoe, T. and Hirohashi, S. : Increased DNA methyltransferase 1 protein expression in human transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.* **170** : 2463-2466, 2003.
- 10) Wolff, E.M., Liang, G., Cortez, C.C., Tsai, Y.C., Castelao, J.E., Cortessis, V.K., Tsao-Wei, D.D., Groshen, S. and Jones, P.A. : RUNX3 methylation reveals that bladder tumors are older in patients with a history of smoking. *Cancer Res.* **68** : 6208-14, 2008.
- 11) Wolff, E.M., Chihara, Y., Pan, F., Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Laird, P.W., Sugano, K., Kawashima, K., Jones, P.A. and Liang, G. : Unique DNA methylation patterns distinguish superficial and invasive bladder cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. *Cancer Res.* **70** (20) : 8169-8178, 2010.
- 12) Christoph, F., Weikert, S., Kempkensteffen, C., Krause, H., Schostak, M., Miller, K. and Schrader, M. : Regularly methylated novel proapoptotic genes associated with recurrence in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int. J. Cancer* **119** : 1396-1402, 2006.
- 13) Ellinger, J., El Kassem, N., Heukamp, L.C., Matthews, S., Cubukluoz, F., Kahl, P., Perabo, F.G., Müller, S.C., von Ruecker, A. and Bastian, P.J. : Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with bladder cancer. *J Urol.* **179** : 346-352, 2008.
- 14) Friedrich, M.G., Weisenberger, D.J., Cheng, J.C., Chandrasoma, S., Siegmund, K.D., Gonzalzo, M.L., Toma, M.I., Huland, H., Yoo, C., Tsai, Y.C., Nichols, P.W., Bochner, B.H., Jones, P.A. and Liang, G. : Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **10** : 7457-7465, 2004.
- 15) Hoque, M.O., Begum, S., Topaloglu, O., Chatterjee, A., Rosenbaum, E., Van Criekinge, W., Westra, W.H., Schoenberg, M., Zahurak, M., Goodman, S.N. and Sidransky, D. : Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J. Natl. Cancer Inst.* **98** : 996-1004, 2006.
- 16) Renard, I., Joniau, S., van Cleynenbreugel, B., Collette, C., Naômé, C., Vlassenbroeck, I., Nicolas, H., de Leval, J., Straub, J., Van Criekinge, W., Hamida, W., Hellel, M., Thomas, A., de Leval, L., Bierau, K. and Waltregny, D. : Identification and validation of

the methylated TWIST1 and NID2 genes through real-time methylation-specific polymerase chain reaction assays for the noninvasive detection of primary bladder cancer in urine samples. *Eur. Urol.* **58** : 96-104, 2009.

17) **Brait, M., Begum, S., Carvalho, A.L., Dasgupta,**

S., Vettore, A.L., Czerniak, B., Caballero, O.L., Westra, W.H., Sidransky, D. and Hoque, M.O. : Aberrant promoter methylation of multiple genes during pathogenesis of bladder cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17** : 2786-2794, 2008.