

対象研究テーマ：がんの発症・悪性化におけるヒストンのメチル化制御に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：DNA 脱メチル化関連酵素の幹細胞およびがん細胞における役割の解析

研究代表者：金沢大学医薬保健研究域医学系 准教授 小出 寛

研究成果の概要：

ゲノム DNA の積極的脱メチル化に関連する酵素群（ヒドロキシラーゼ、デアミナーゼ、グリコシラーゼ）について、胚性幹細胞（ES 細胞）やがん細胞株をはじめとする様々な細胞株での発現様式を定量 RT-PCR 法で測定した。DNA 脱メチル化の第一段階を担う TET1 ヒドロキシラーゼ遺伝子が、ES 細胞の分化・未分化状態、初代培養細胞の増殖・セネセンス状態に対応して、特徴的な発現を示すことが明らかになった。また、特定のがん細胞株における TET1 遺伝子の著しい発現低下は、がんの悪性度・予後と関係が深い CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) との関連が強く示唆された。

研究分野：分子生物学

キーワード：がん, 幹細胞, エピジェネティクス, DNA メチル化

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現の調節にとって、ゲノム DNA のメチル化は、重要なエピジェネティクス修飾のひとつである。特にシトシンの 5-メチル化は、正常な発生、細胞の分化や幹細胞の恒常性維持に必須であり、X 染色体不活性化、遺伝子刷り込み等で重要な役割を果たしている。また、DNA メチル化の異常は、様々なタイプの悪性腫瘍の発がん過程で検出されている。すなわち、がん細胞ゲノム全体における低メチル化は、ゲノム不安定性やレトロトランスポゾンの発現を誘導し、ゲノムの特定領域での高メチル化は、がん抑制遺伝子の転写抑制を引き起こして、がんの発症に寄与すると考えられている。さらに近年、DNA メチル化に加えて、ヒストンの翻訳後修飾やそれに関与する酵素の異常が、様々なかたちで発がん過程に関わることが報告されている。これらのエピジェネティクス制御異常による遺伝子発現の変化は、遺伝子自体に変異が存在するわけではなく、可逆的に元に戻すという治療戦略が想定されるため、次世代のがん治療の標的として注目が集まっている。これまで、DNA のメチル化についての解析は詳細に行われてきたが、脱メチル化に関係する酵素やその作用機構は不明のままであった。しかし最近、DNA 脱メチル化に関係する酵素として TET ヒドロキシラーゼファミリーが報告され、その機能に注目が集まっている。

2. 研究の目的

ES 細胞、初代培養細胞、がん細胞株等を対象に、DNA の積極的脱メチル化経路に関連する酵素群の発現様式と発現調節機構を解析して、ES 細胞の未分化性維持や多分化能、がん細胞の増殖や悪性化における DNA の脱メチル化経路の役割を明らかにすることを目的とする。ES 細胞とがん細胞を比較しながら解析することで、がん細胞の幹細胞的性質と DNA 脱メチル化経路との関連性を見だし、がん幹細胞を標的とする新しいエピジェネティック医薬の開発の可能性を探索することも目標のひとつとする。

3. 研究の方法

未分化 ES 細胞および特定の細胞系列に分化誘導した ES 細胞、マウス胚線維芽細胞 (MEF)、様々ながん細胞株を対象に、DNA 脱メチル化関連酵素群（ヒドロキシラーゼ、デアミナーゼ、グリコシラーゼ）の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法で測定する。特徴的な発現変化を示す酵素について、shRNA によるノックダウンなどを用いて、細胞の増殖、未分化性、運動能などの表現型に与える影響を調べる。特に、TET1 ヒドロキシラーゼ遺伝子の発現制御の分子機構に関して、遺伝子制御領域における DNA の高メチル化との関連を解析する。

4. 研究成果

DNA の積極的脱メチル化経路の第一段階を担う TET1 ヒドロキシラーゼの発現は、未分化 ES 細胞で極めて高く、神経や心筋への分化誘導を行うことにより、その発現が著しく低下することが確認された。また、MEF 細胞をさまざまな細胞密度や血清濃度で培養すると、それに応じてダイナミックな TET1 の発現変化が観察されることがわかった。さらに種々の刺激によって細胞のセネセンスを誘導した状態でも発現変化が見られることがわかり、細胞の増殖状態やセネセンスと TET1 の発現が密接な関係があることが示唆された。また、特定のがん細胞株では、TET1 遺伝子の著しい発現抑制が検出されるが、これらのがん細胞は、CpG アイランドの同時多発的なメチル化をもつ CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) を示す傾向があることを見いだした。CIMP 表現型は、がんの悪性度・予後と深く関わっていることから、CIMP 表現型や TET1 遺伝子の発現抑制を導く分子メカニズムについて、さらに解析を進めている。

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 2 件)

Tavares, L., Dimitrova, E., Oxley, D., Webster, J., Poot, R., Demmers, J., Bezstarosti, K., Taylor, S., Ura, H., Koide, H., Wutz, A., Vidal, M., Elderkin, S., Brockdorff, N. RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at Polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell*, 148, 664-678, 2012.

Uranishi, K., Akagi, T., Sun, C., Koide, H., Yokota, T. Dax1 associates with Esrrb and regulates its function in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 印刷中

[学会発表] (計 6 件)

Akagi, T., Kuure, S., Koide, H., Constantini, F., Yokota, T. Involvement of Ets-related transcription factors ETV4 and ETV5 in pluripotency and proliferation of mouse embryonic stem cells. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2012.6. 横浜

Tada, Y., Akagi, T., Yokota, T., Koide, H. Nanog/Zfp57 pathway promotes anchorage-independent growth of HT1080 cells by inducing imprinted genes expression. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2012.6. 横浜

Uranishi, K., Akagi, T., Sun, C., Koide, H., Yokota, T. Dax1 associates with Esrrb and functions as a repressor in embryonic stem cells. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2012.6. 横浜

Koide, H. Epigenetic control in embryonic stem cells. Japan-Korea Joint Symposium on Recent Advance in Medical Science, 2012.11. 金沢

金井 大, 武石 健, 上田 篤, 赤木 紀之, 小出 寛, 横田 崇 マウス ES 細胞における LRR-1 の増殖制御機構の解析 第 85 回日本生化学会大会, 2012. 12. 福岡

藤井優佳, 懸川まどか, 赤木紀之, 小出 寛, 横田 崇 zfp296 のマウス ES 細胞における役割 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 12. 福岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金沢大学医薬保健研究域医学系・准教授
小出 寛

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

機能ゲノミクス・教授 鈴木健之