

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870222

研究課題名(和文) DNA脱メチル化関連酵素TET1のがん細胞における機能解析

研究課題名(英文) An investigation for involvement of TET1 gene in tumorigenesis

研究代表者

丹下 正一郎 (Tange, Shoichiro)

金沢大学・医学系・博士研究員

研究者番号：40571211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞のがん化とゲノムDNAのメチル化との関連については膨大な研究の蓄積があるのに対し、がん化とDNAの脱メチル化制御についての研究は未だ十分ではない。申請者はがん培養細胞株において、DNAの能動的な脱メチル化機構の一員であるTET1(Ten-eleven translocation 1)遺伝子の発現レベルの上昇と低下がそれぞれ異なる局面において起こることを見出したことから、同遺伝子の転写制御機序と悪性腫瘍における機能の解析を行うこととした。これにより、TET1遺伝子の転写抑制が起きる培養環境や、同遺伝子の標的遺伝子候補の同定がなされた。

研究成果の概要(英文)：On the other hand there have been many reports of the relationship between the molecular machinery of DNA methylation and malignant tumor, the relationship of DNA demethylation mechanism and cancer remains unclear. Upon starting the research, we have found that the transcriptional level of TET1 (Ten-eleven translocation 1) gene, a member of active DNA demethylation pathway, is not only upregulated in some cell lines but also downregulated in other cancer cell lines. We found the cellular environment inducing transcriptional repression or upregulation of TET1 gene and the candidate of TET1 target genes.

研究分野：ゲノム医化学

キーワード：DNA脱メチル化

1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞のゲノム DNA 上におけるシトシン(C)-グアニン(G)の順で連続する配列 (CpG 配列) の C がメチル化されるという現象は、遺伝子の転写制御に関わる修飾の一つとして古くから知られている。この一方で、メチル化シトシンがシトシンに戻るという現象は、細胞の増殖に伴う新規 DNA 鎖合成によって起こることが示唆されていたものの、それ以外に能動的に起こるものであるかは長く未解明であった。2009年、それまで詳細が明らかになっていなかった DNA の脱メチル化という現象が TET1 酵素によって触媒されることが報告された (Tahiliani et al., 2009)。以後、TET ファミリー遺伝子の研究が盛んになされるようになった。TET ファミリー遺伝子の研究において先行したのは胚性幹 (ES) 細胞を用いた研究であり、TET1 蛋白質の脱メチル化活性は ES 細胞の未分化性の維持に貢献してされていることが報告された (Ito et al., 2010)。申請者が研究を始めた当初は、白血病細胞における *TET2* 遺伝子の変異や乳がんにおける *TET1* 遺伝子の発現低下の報告がなされていた。*TET1* 遺伝子は悪性腫瘍においてどのようにして転写が抑制されるのか、あるいは *TET1* 蛋白質が悪性腫瘍において何らかの機能を持つのかという検証は進んでいなかった。

2. 研究の目的

申請者は、癌細胞株を用いた予備実験において、*TET1* 遺伝子の発現量が極端に低い細胞株の存在と、上皮性の肺がん細胞株に上皮間葉転換 (EMT) を誘導させた際に *TET1* mRNA の転写量が上昇することを見出した。悪性腫瘍においては、*TET1* 遺伝子の転写抑制が複数報告されていたために、同遺伝子はがん抑制遺伝子であると考えられていたが、申請者は、*TET1* 遺伝子は単にがん抑制遺伝子と区分すべきではなく、異なる局面において腫瘍の抑制あるいは進展に繋がる複数の機能を果たすものであると考えた。そのため、これら *TET1* 遺伝子の転写制御が腫瘍の特性に影響を及ぼす可能性について検証するため、研究を行った。

3. 研究の方法

各種癌細胞株において、*TET1* 遺伝子をノックダウンまたは強制発現し、表現型を観察した。また、これらの実験系とは別に、培養環境やサイトカイン刺激等、*TET1* 遺伝子の転写機構に変化を与える状況を網羅的に探索した。上記の結果が臨床検体におけるものを反映しているのか検討するため、公共のデータベース The Cancer Genome Atlas (TCGA, <https://cancergenome.nih.gov/>) に収録されている RNA シークエンシング (RNA-Seq) デ

ータ、ならびにゲノム DNA のメチル化アレイデータを取得し、解析を行った。RNA-Seq データは、TCGA に収録されている Illumina 製 Genome Analyzer II によるデータセットおよび HiSeq2000 によるデータセットの双方、DNA メチル化データについては、TCGA に収録されている Illumina 製 Infinium HM27 と HM450 によるデータセットの双方を用いた。

4. 研究成果

・大腸がん細胞株由来の cDNA を用いて定量 PCR を行った結果、一部の大腸がん細胞株で

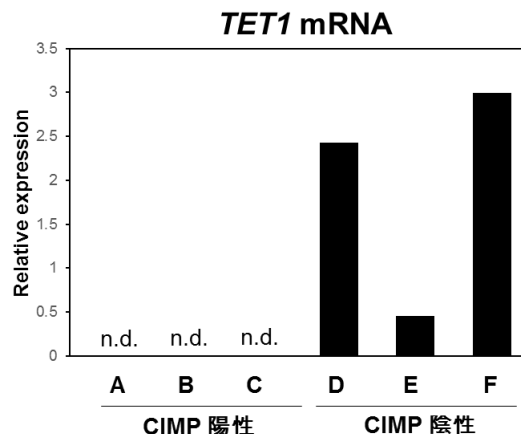


図1、大腸がん細胞株6種のcDNAを鋳型として、TET1 遺伝子の検出を行った。検出結果は18S rRNAを指標としてノーマライズした。

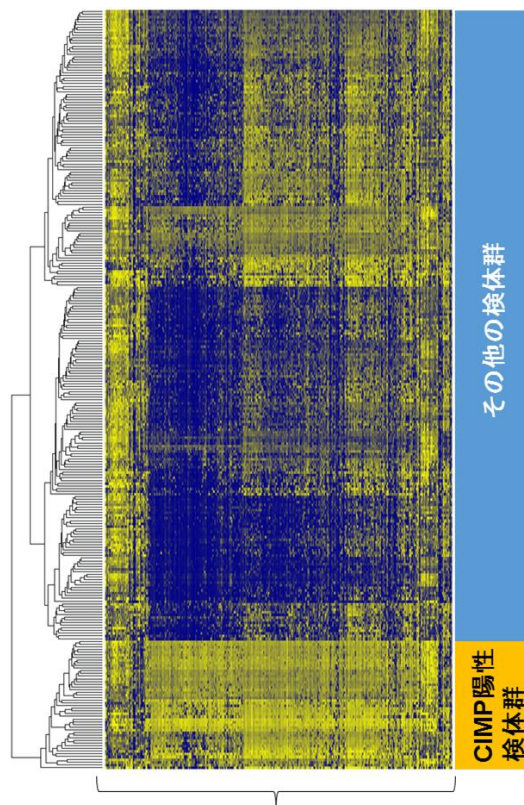


図2、TCGAから取得した大腸がん検体のDNAメチル化データを元に、各CpG領域のDNAメチル化の強度からCIMP陽性とその他のグループの2群に分割した。青は低メチル化、黄は高メチル化を示す。

は、極端に *TET1* 遺伝子の mRNA レベルが低いことが見出された(図1)。*TET1*mRNA の発現量が低い細胞群(図1、細胞株 A~C)は、遺伝子の転写調節領域における CpG メチル化が高度に起きている「CpG アイランドメチル化表現型」(CIMP、Toyota et al., 1999)であることが他グループによって報告されているものであった。この結果が細胞株特有のものであるのか、あるいは臨床検体のデータを反映しているものであるのかを検証するため、公共のデータベース TCGA に収録されている大腸がん検体群を、ゲノム DNA のメチル化アレイデータを用いて CIMP 陽性・陰性に群別する作業を行い(図2)、細胞株と同様に CIMP 陽性の患者群で *TET1*mRNA 量の低下が確認された(図3A および B、未発表)。これら2群の検体間で発現が著明に変化している遺伝子を解析したところ、*TET1* mRNA の発現低下と一部サイトカインシグネチャーの活性化とが相関していることが示された(未発表)。この結果を踏まえ、*TET1* 遺伝子の発現が確認されている大腸がん細胞株を当該するサイトカインを含む培地で培養した結果、同遺伝子の

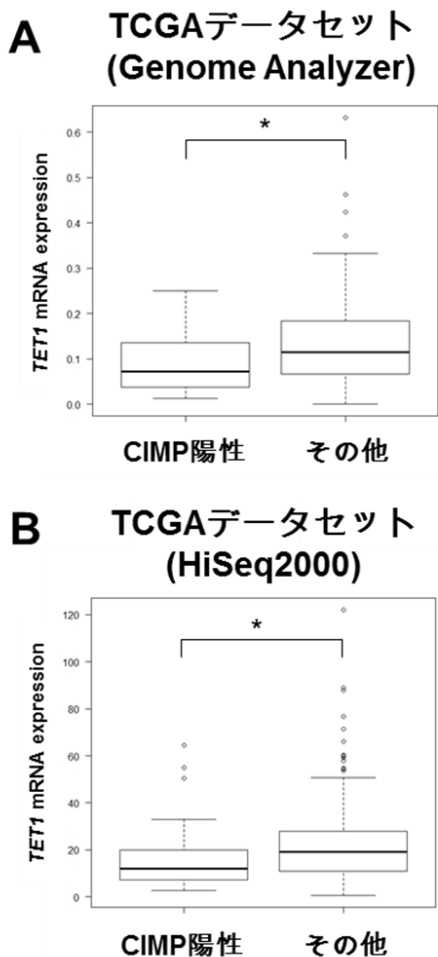


図3. TCGAから取得した大腸がん検体のRNA-SeqデータをCIMP陽性、その他のグループの2群に分割し、*TET1*mRNA の発現量を示した。いずれのデータセットにおいても、CIMP陽性検体群において*TET1* mRNA量は有意に低下していた。

転写抑制が起こることが示された(図4、未発表)。脱メチル化反応を行う遺伝子たる *TET1*

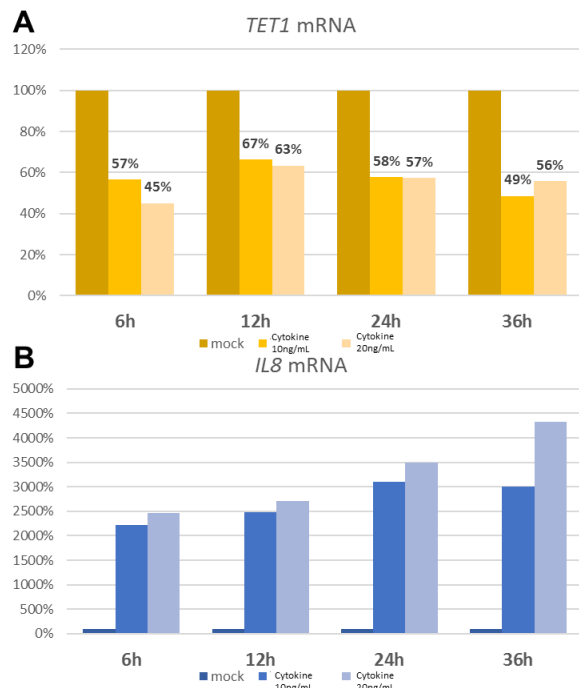


図4. 大腸がん細胞株をサイトカイン誘導し、*TET1*(A)及び誘導の指標として*IL8*(B)のmRNA量を定量PCRによってそれぞれ測定した。各サンプルのmRNA量はGAPDHによってノーマライズされ、さらに各タイムポイントにおいてサイトカイン非投与群(mock)の量を1とした相対値を表示している。どのタイムポイントにおいても、*TET1* mRNA量の低下が認められた。

の転写抑制と、ゲノム DNA メチル化の亢進とが単なる相関関係であるのか、または因果関係をもつものであるのかは引き続き解明を進めていく。

・申請者らは、もう一つの研究アプローチとして、上皮間葉転換(EMT)モデルを用いた。すなわち、上皮性の特徴をもつ肺がん細胞株を TGFβ を含む培地で培養することで上皮性細胞の特徴が失われ、細胞の形態や運動能が変化する現象を、腫瘍の悪性進展過程のモデルと位置づけた。この誘導過程における *TET1* 遺伝子の機能を探ることを始めた。

申請者らは、上皮性肺癌細胞株 A549 を TGFβ によって EMT 誘導することで、*TET1*mRNA の発現量が上昇することを確認した。この結果から、上皮性の喪失、または間葉の特性の獲得のいずれかの過程において *TET1* の機能が必要であることが示唆された。

TET1 特異的な shRNA を発現するレンチウイルスを A549 細胞に感染させた上で EMT の誘導を行ったところ、上皮細胞において発現している遺伝子のダウンレギュレーションが起こらないことが定量PCRによって確認された。上皮としての特性の喪失は EMT において重要な局面である。これらの結果から、EMT の過程において *TET1* 遺伝子が寄与し、さらに腫瘍の悪性化にも貢献していることが示唆された(未発表)。今後は、クロマチン免疫沈降法(ChIP)および ChIP-シーケンス法を

組み合わせて、これらの遺伝子が TET1 の直接の標的であるのか、あるいは別の蛋白質を介したメカニズムであるのかを検討していく予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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 :

出願年月日 :

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

丹下 正一郎 (Tange, Shoichiro)

金沢大学, 医学系, 博士研究員

研究者番号 : 40571211

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :