

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04302

研究課題名(和文)慢性炎症によるDNAメチル化異常誘発の分子機構の解明と制御

研究課題名(英文)Clarification of molecular mechanism of aberrant DNA methylation induction by chronic inflammation

研究代表者

牛島 俊和 (Ushijima, Toshikazu)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：90232818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症によるメチル化関連因子の制御異常を解析した結果、1)ヘリコバクターに感染した胃粘膜ではTET遺伝子群の発現が低下すること、2)一酸化窒素(NO)への曝露は、DNMT酵素活性が増加することを見出した。TET遺伝子群の発現低下には、NF-κB経路の下流で活性化する複数のマイクロRNAが関与することを示した。さらに、TET遺伝子の発現抑制とNO刺激の組み合わせにより、異常DNAメチル化が誘発されることを明らかにした。以上より、生体内での異常DNAメチル化誘発には、NF-κB経路の活性化によるTET遺伝子群の発現抑制、及び、NOによるDNMT活性化の組み合わせが重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Analysis of dysregulation of DNA methylation machineries revealed 1) that Tet methylcytosine dioxygenases (Tet) genes, Tet1, Tet2, and Tet3, were repressed by NF-κB signaling, downstream of IL-1 and TNF- α , via up-regulation of specific miRNAs, such as miR-26b and miR-29c, and 2) that exposure to nitric oxide, produced by Nos2, enhanced enzymatic activity of DNA methyltransferases (DNMTs). In cultured cells, TET repression by overexpression of one of the identified miRNAs did not induce aberrant DNA methylation, while triple knockout of all the three TET genes induced aberrant DNA methylation at thousands of genomic loci. The number of hypermethylated loci became larger in combination with exposure to nitric oxide. These results suggested that, in human tissues, a vicious combination of TET repression and increased DNMT activity biologically induce aberrant DNA methylation.

研究分野：分子生物学、エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA メチル化異常は慢性炎症に伴うがんの原因として重要である

近年の全ゲノム解析により、胃がんなどドライバーとなる突然変異が少ない(ほとんどない)がんが存在することが明らかになっている。そのようながんには慢性炎症が関与するものが多く、また、DNA メチル化異常が多い[TCGA, Nature, 513: 202, 2014]。一方、我々及び他のグループは、DNA メチル化異常の誘発要因として慢性炎症が重要であることを示してきた。

(2) DNA メチル化異常誘発と *Il1b*, *Tnfa*, *Nos2* の発現が関連する (これまでの成果)

DNA メチル化異常誘発に関与する要因を解明するために、これまで幾つかの動物モデルを用いて解析を進めてきた。スナネズミ胃粘膜において、*H. pylori* 感染による慢性炎症は DNA メチル化異常を誘発するが、高濃度食塩やエタノールによる長期間の炎症では DNA メチル化異常は誘発されなかった。また、マウスでの dextran sodium sulfate (DSS) 誘発大腸炎モデルでは、T 及び B 細胞を欠失する SCID マウスにおいても DNA メチル化異常が誘発されることが明らかになった。これらの DNA メチル化異常が誘発される炎症では、*Il1b*, *Tnfa*, *Nos2* の発現が特徴的に上昇していた。また、DNA メチル化異常が誘発されても、DNA メチル基転移酵素の発現量及び活性は変化しなかった。

(3) 慢性炎症により *Tet3* の発現が低下する (予備的成果)

H. pylori 感染スナネズミの胃粘膜上皮細胞、及び、*H. felis* 感染マウスの胃粘膜上皮細胞では、DNA 脱メチル化に関与する *Tet3* の発現量が低下することを見いだした。

2. 研究の目的

DNA メチル化異常は慢性炎症等による発がん極めて重要な役割を果たす。一方で、慢性炎症による DNA メチル化異常誘発機構の詳細は分かっていない。本研究では、これまでに関与の可能性を示してきた IL-1 β , TNF- α 及び活性酸素などの炎症関連因子、及び、上皮細胞内での NF- κ B シグナルの活性化

と *TET3* の発現低下に着目し、DNA メチル化異常誘発の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) DNA メチル化活性測定

一酸化窒素持続処理が DNA メチル化活性に影響を与えるかどうかを明らかにするために、胃がん細胞株 HSC41 及び TMK1 から抽出した核タンパク質を、一酸化窒素ドナーである NOC18 または SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine) により処理、DNA メチル化活性を EpiQuikTM DNMT Activity/Inhibition Assay Ultra Kit (Epigentek) により測定した。

(2) マイクロ RNA 発現解析

慢性炎症に曝露したマウス胃粘膜上皮細胞におけるマイクロ RNA の発現変化を、Mouse miRNA Microarray, Release 21.0, 8x60K (Agilent Technologies) により解析した。

(3) プロモーターアッセイ

miR-26b プロモーターを pGL3-Basic ベクター (Promega) にクローニングした。そのベクターを 293FT 細胞に導入し、RELA 高発現の有無がプロモーター活性に影響するかどうかを Dual-Glo Luciferase Assay System を用いて調べた。

(4) *TET* 遺伝子のノックアウト

293FT 細胞に、Edit-R Cas9 Nuclease mRNA (GE Healthcare Japan)、Edit-R tracrRNA (GE Healthcare Japan)、*TET* 遺伝子に対する Edit-R crRNA (GE Healthcare Japan) を DharmaFECT Duo (GE Healthcare Japan) を用いて導入した。その後、限外希釈法により *TET* 遺伝子が両アレルノックアウトされたクローンを取得した。

(5) DNA メチル化解析

ゲノム網羅的 DNA メチル化解析は、Infinium MethylationEPIC Kit (Illumina) を用いておこなった。

4. 研究成果

【平成 27 年度】

平成 27 年度は、まず、DNA メチル化異常が誘発される細胞内環境をもつ細胞につ

いて、DNA メチル化異常が誘発され易い領域を作出・同定することで、DNA メチル化異常測定系を確立した。高頻度に DNA メチル化異常をもつ大腸がん細胞株 HCT116 については、DNA 脱メチル化剤で処理、もともとメチル化されていた（即ち、メチル化されやすい）CpG アイランドを非メチル化状態としたクローン を 9 個得た。また、IL-1 受容体、TNF 受容体を発現している胃がん細胞株 HSC41 及び TMK1 について、DNA メチル化の pre-mark となる H3K27me3 修飾をもつ DNA 非メチル化領域として、HSC41 において 20 領域、TMK1 において 103 領域を同定した。これらにより、DNA メチル化異常誘発の測定系を確立することができた。

次に、HSC41 及び TMK1 細胞株を用いて、IL-1 β 、TNF- α 及び活性酸素による処理条件をそれぞれの経路の下流遺伝子の発現を指標として最適化した。また、最適化した条件により細胞株を処理し、DNA メチル化異常誘発を解析した。その結果、TMK1 では解析した 13 領域のうち *ATL1* 及び *HAND2* 遺伝子において、HSC41 では解析した 7 領域のうち *APCDD1*、*PCSK5* 及び *PLCXD3* 遺伝子において微少ではあるものの DNA メチル化レベルの上昇が認められた。

【平成 28 年度】

平成 28 年度は、まず、DNA メチル化異常誘発の最終エフェクターである DNA メチル基転移酵素 DNMT1、3A、及び 3B について、一酸化窒素持続処理が DNA メチル化活性に影響を与えるかどうかを調べた。胃がん細胞株 HSC41 及び TMK1 から抽出した核タンパク質を、一酸化窒素ドナーである NOC18、または SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine) により処理したところ、NOC18 処理により 3-5 倍程度、SNAP 処理により 1.5 倍程度の DNA メチル化活性の上昇が認められた。

次に、慢性炎症による *Tet* 遺伝子発現低下の分子メカニズムを解明するために、ヘリコバクター感染により発現が上昇するマイクロ RNA を探索した結果、36 個のマイクロ RNA の発現上昇が認められた。これらのマイクロ RNA について、*Tet* 遺伝子を標的とするか否かをデータベース検索した結果、12 個のマイクロ RNA (miR-16、miR-20a、miR-20b、

miR-26a、miR-26b、miR-29c、miR-106b、miR-135b、miR-140、miR-142、miR-203 及び miR-222) が同定された。これらのマイクロ RNA のうち、miR-26b 及び miR-29c について、*TET* 遺伝子の抑制を *in vitro* で確認した結果、miR-26b が *TET2* 及び 3 を、miR-29c が *TET1*、2 及び 3 を強く抑制することを明らかにした。

【平成 29 年度】

平成 29 年度は、まず、平成 28 年度に解明した *Tet* 遺伝子を標的とするマイクロ RNA の発現上昇に関して、NF- κ B の活性化 (IL-1 β 及び TNF- α による) の関与の有無を調べた。その結果、miR-26b や miR-29c の推定プロモーター領域には NF- κ B の結合が認められることを明らかにした。さらに、プロモーターアッセイを行った結果、RELA の高発現 (NF- κ B の活性化) により miR-26b プロモーターの転写活性が上昇することを明らかにした。

次に、*TET* 遺伝子の発現抑制と一酸化窒素刺激による異常 DNA メチル化誘発を解析した。その結果、3 種類全ての *TET* 遺伝子のノックアウトにより 7,568 箇所のゲノム領域においてメチル化誘発が認められた。また、一酸化窒素刺激 (DNMT 活性を上昇させる) を組み合わせることにより、メチル化されるゲノム領域数はさらに増加 (14,963 箇所) することを明らかにした。

以上の結果より、生体内での異常 DNA メチル化誘発には、NF- κ B 経路の活性化による *TET* 遺伝子群の発現抑制、及び、一酸化窒素による DNMT 活性上昇の組み合わせが重要であることが示唆された。

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)

1. Hattori N, Ushijima T. Epigenetic impact of infection on carcinogenesis: mechanisms and applications. *Genome Med*, 8: 10, 2016. 査読有. doi:10.1186/s13073-016-0267-2
2. Yoda Y, Takeshima H, Niwa T, Kim JG, Ando T, Kushima R, Sugiyama T, Katai H, Noshiro H, Ushijima T. Integrated analysis of cancer-related pathways

affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 18: 65-76, 2015. 査読有. doi:10.1007/s10120-014-0348-0

[学会発表] (計 15 件)

1. 竹島秀幸, 丹羽透, 山下聡, 牛島俊和. 炎症の悪い組み合わせは、DNA メチル化関連因子の制御異常を引き起こす. 第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会, 2017/12/6-9, 神戸.
 2. Ushijima T. Induction of an epigenetic field involving epithelial and stromal cells by chronic inflammation. France Japan Epigenetics Workshop 2017, 2017/11/6-8, Paris, France.
 3. 竹島秀幸, 丹羽透, 山下聡, 若林美香, 牛島俊和. 慢性炎症により誘発される DNA メチル化装置制御異常の悪い組み合わせ. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017/9/28-30, 横浜.
 4. Ushijima T., Takeshima H, Maeda M. Induction of an epigenetic field involving epithelial and stromal cells by chronic inflammation. The 72nd Fujihara Seminar, 2017/9/13-15, 苫小牧.
 5. Takeshima H, Niwa T, Yamashita S, Ushijima T. Vicious combination of dysregulated methylation machineries induced by chronic inflammation. The 72nd Fujihara Seminar, 2017/9/13-15, 苫小牧.
 6. Takeshima H, Niwa T, Yamashita S, Ushijima T. Vicious combination of dysregulated methylation machineries induced by chronic inflammation. 12th Asian Epigenomics Meeting, 2017/9/12-13, 苫小牧.
 7. 牛島俊和. エピジェネティック治療の重要性とさらなる応用拡大. 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2017/7/27-29, 神戸.
 8. 竹島秀幸, 丹羽透, 豊田武士, 山下聡, 牛島俊和. 組織におけるエピゲノム傷害の程度は、発がん要因への曝露期間により決まる. 第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2017/5/22-23, 東京.
 9. Ushijima T. Methylation burden and gastric cancer. The 12th International Gastric Cancer Congress (IGCC), 2017/4/20-23, Beijing, China.
 10. Ushijima T. Molecular mechanism of gastric carcinogenesis: for precision risk diagnosis and epigenetic therapy. The 12th International Gastric Cancer Congress (IGCC), 2017/4/20-23, Beijing, China.
 11. 牛島俊和. 一件正常な細胞での DNA メチル化異常の蓄積とがん発症. 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/24 -27, 仙台.
 12. 牛島俊和. 慢性炎症による疾患におけるエピジェネティック異常の重要な役割. 第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2016/5/19-20, 大阪.
 13. 牛島俊和. Field cancerization now gains ground. 第 102 回日本消化器病学会総会, 2016/4/21-23, 東京.
 14. 竹島秀幸, 丹羽透, 若林美香, 山下聡, 牛島俊和. 慢性炎症による Tet 遺伝子の発現抑制と異常 DNA メチル化誘発. 第 30 回発癌病理研究会, 2015/8/26-28, 小豆島.
 15. Ushijima T. Mechanisms of formation of epigenetic cancerization field by chronic inflammation. GRL Korea-Japan Epigenome Medicine Meeting 2015, 2015/5/17-18, 那覇.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
牛島 俊和 (USHIJIMA TOSHIKAZU)
国立がん研究センター・研究所・分野長
研究者番号: 90232818
 - (2) 研究分担者
竹内 由佳 (TAKEUCHI YUKA)
国立がん研究センター・研究所・研究員
研究者番号: 20590417

前田 将宏 (MAEDA MASAHIRO)
国立がん研究センター・研究所・研究員
研究者番号: 30738703