

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18420

研究課題名(和文) 時期特異的な発がん感受性におけるbivalentヒストン修飾の意義の解明

研究課題名(英文) Involvement of bivalent histone modification in age-specific cancer susceptibility

研究代表者

服部 奈緒子(Hattori, Naoko)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：30611090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、時期特異的な発がん感受性の機構を明らかにする目的で、乳腺におけるbivalent修飾の解析を行った。ラット乳腺上皮細胞のChIP-chipから、高感受性時期の乳腺上皮細胞に特異的なbivalent遺伝子91個を抽出した。その内、乳腺腫瘍でDNAメチル化を受けているのは7遺伝子であった。4遺伝子は、正常乳腺上皮細胞で低発現であり、ヒト乳がんではメチル化サイレンシングのがん抑制遺伝子も含まれていた。以上のことから、発がん物質に高感受性時期の乳腺のbivalent遺伝子が同定された。それらの一部は、がんではDNAメチル化されており、発がんにおけるbivalent修飾の意義が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To reveal the molecular mechanism of age-specific cancer susceptibility of mammary glands, I investigated the involvement of bivalent histone modification. ChIP-chip analysis of H3K4me3 and H3K27me3 using rat mammary epithelial cells showed that 91 genes were identified as the bivalent genes in sensitive period. Among the 91 genes, 7 genes were methylated in rat mammary carcinomas, and 4 genes did not express in normal mammary epithelial cells. The human homolog of one gene was known as a tumor suppressor gene that is methylation-silenced in breast cancer. I identified the sensitive period-specific bivalent genes in mammary gland, which were methylated in mammary carcinoma, suggesting that bivalent modification might be a seed of DNA methylation during carcinogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス ヒストン修飾 乳腺発がん

^1. 研究開始当初の背景

ヒト疫学研究及びラット乳腺発がんモデル研究から、第二次性徴期の乳腺は、環境要因に対して感受性が高い事が知られている。しかし、この分子機構は不明であり、動物モデルでは、高感受性時期の乳腺でも突然変異の頻度が高くはないこと[AJP 2004]、乳腺幹細胞の割合も高くはないこと[Nature 2006]が示されている。

一方、多能性幹細胞に特徴的な抑制型(H3K27me3)と活性型(H3K4me3)のヒストン修飾が同時に存在する「bivalent 修飾」が、細胞の可塑性に関与している事も知られている。ES 細胞で bivalent 修飾を持つ遺伝子は、がん細胞で DNA メチル化されやすく、つまり、bivalent 修飾を持つ細胞は、どちらの方向にも向かうことが可能な、可塑性の高い状態にある。

申請者はこれまでに、高感受性と低感受性時期のラット乳腺から上皮細胞のみを単離し、H3K4me3 及び H3K27me3 の ChIP-chip を行った。その結果、第二次性徴期の細胞では、bivalent 修飾を有する領域が増加していることを見出した。また、高感受性時期特異的に bivalent 修飾を持つ乳腺発達に関連する遺伝子も同定している。よって、申請者は、第二次性徴期の乳腺上皮幹細胞は、bivalent 修飾領域を多く持ち、可塑性が高くなっているために、発がん感受性が高いと考えた。

2. 研究の目的

乳腺発がん動物モデル系を用いて、時期特異的な発がん感受性への bivalent 修飾の関与を明らかにする。具体的に以下の3点を目的とする。

【Aim 1】 Bivalent 修飾のゲノム領域の同定

高感受性と低感受性時期のラット乳腺管腔上皮幹細胞の ChIP-sequencing を行い、高感受性時期特異的な bivalent 修飾領域を同定する。

【Aim 2】 Bivalent 修飾を持つ細胞の同定

申請者が独自に確立した bivalent 修飾可視化技術と細胞表面抗原マーカーを組み合わせ、bivalent 修飾を持つ細胞の局在及び細胞の種類(幹細胞・前駆細胞等)を明らかにする。

【Aim 3】 Bivalent 修飾の発がん感受性への関与の証明

乳腺発達に関与して乳がんで DNA メチル化により発現抑制されている bivalent 遺伝子の機能解析を行う。さらに、ヒストン修飾関連酵素の遺伝子改変動物・阻害剤を用い、bivalent 修飾を人為的に変化させ、

発がん感受性への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 乳腺管腔上皮幹細胞を用いた ChIP-sequencing 【Aim 1 に対応】

申請者は既に、ラット乳腺上皮細胞(管腔上皮・基底上皮及び幹細胞・分化細胞の混合細胞集団)の ChIP-chip から、第二次性徴期の細胞では、bivalent 修飾を有する領域が増加していることを見出した。

本研究では、より高感度・高精度な解析を行う為、ラット乳腺から管腔上皮幹細胞のみを単離し、ChIP-seq を行い、高感受性時期特異的な bivalent 修飾領域を抽出する。その後、ChIP-qPCR による同定と、Sequential-ChIP により同一細胞内の同一アレルで生じていることの確認も行う。

(2) Bivalent 修飾を持つ細胞の可視化 【Aim 2 に対応】

申請者が確立した可視化法[Hattori et al, Nucleic Acids Res, 41:7231-7239, 2013]を用い、bivalent 修飾を持つ細胞の乳腺組織切片上の局在を解析する。細胞マーカーの免疫染色結果との比較や組織学的特徴から、同修飾を持つ細胞の特徴を明らかにする。

(3) ラット乳がんの DNA メチル化及び遺伝子発現情報との比較 【Aim 3 に対応】

ChIP-seq データとラット乳がんの DNA メチル化及び遺伝子発現データを比較し、高感受性時期特異的に bivalent 修飾を持ち、乳がんで DNA メチル化抑制される遺伝子(群)の候補を抽出する。さらに、多数乳がん検体を用いた DNA メチル化解析、正常乳腺細胞での発現解析、DNA 脱メチル化剤での発現回復実験等を行う。申請者は既に DNA メチル化解析・発現解析を行っており、論文として報告している[Hattori et al, Cancer Sci. 102:1337-1343, 2011]。

(4) 高感受性時期特異的な bivalent 遺伝子(群)の機能解析 【Aim 3 に対応】

Bivalent 修飾を持つ乳腺発達関連遺伝子は、分化誘導刺激に応答して正常な乳腺発達に寄与する。一方、発がん刺激曝露によりエピゲノム異常が生じ易く、発がんにも寄与する場合がありますと考えられる。

過剰な 17β-estradiol 及び変異原物質 PhIP 投与直後のラット乳腺幹細胞を単離し、エピゲノム状態を bivalent 遺伝子領域とそれ以外の領域で比較し、同修飾を持つ遺伝子領域ではエピゲノム異常が生じ易い事を証明する。次に、乳腺上皮細胞を初代培養し、ノックダウン細胞を作製、17β-estradiol 及び PhIP を添加して、細胞形態変化・EMT 誘導・DNA ダメージを解

析する。

(5) Bivalent 修飾の人為的増加による発がん感受性への影響【Aim 3 に対応】

マウスはラットよりも発がん感受性が低い、遺（子改変や薬剤投与実験が容易であるため、本研究では、bivalent 修飾状態を人為的に上昇させたマウスを用いて発がん感受性が高くなる事を証明する。ヒストンメチル化酵素 (Ezh2, MLL 等) の乳腺上皮細胞特異的な高発現、ヒストン脱メチル化酵素 (Jmjd3, Jhdm1b, Jarid1b 等) の阻害剤投与後、17 β -estradiol 及び PhIP を投与して発がん実験を行う。

4. 研究成果

(1) 乳腺管腔上皮幹細胞の単離

本研究では、より高感度・高精度な解析を行う為、ラット乳腺から管腔上皮幹細胞のみを単離するため、管腔上皮細胞の単離に成功した (図 1)。

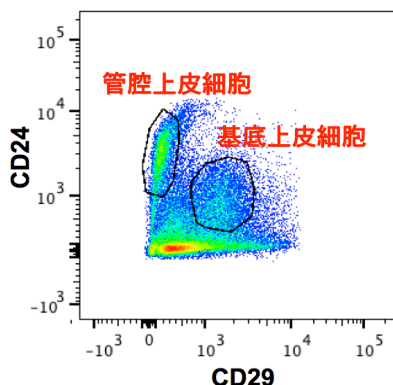


図 1 ラット乳腺管腔上皮細胞をセルソーターで単離した。

(2) 高感受性時期特異的な bivalent 遺伝子 (群) の同定

乳腺上皮細胞の ChIP-chip データの詳細な解析を行った。まず、高感受性時期 (7 週齢) の乳腺上皮細胞において特異的に bivalent 修飾を有する遺伝子 91 個を抽出した (図 2)。

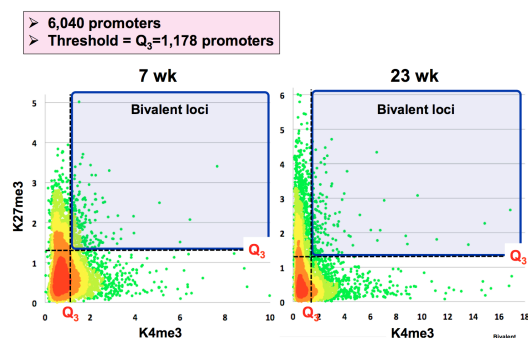


図 2 乳腺上皮細胞の H3K4me3 と H3K27me3 の ChIP-chip データを、高感受性時期 (7 週齢) と低感受性時期 (23 週齢) で比較した。

その gene ontology 解析から、Notch シグナル・kinase 活性・細胞接着に関わる遺伝子が濃縮された。

また、ChIP-chip データの確認のために、小数細胞での ChIP assay の条件検討も行い、10000 細胞で bivalent 修飾の ChIP が可能な条件を見いだした。

(3) ラット乳がんの DNA メチル化及び遺伝子発現情報との比較

正常幹細胞の bivalent 遺伝子は、がんでは DNA メチル化されやすいことが知られている。そこで、独自のラット乳腺腫瘍 DNA メチル化データを用い、乳がんではメチル化されているのは 7 領域を抽出した。また、正常乳腺上皮細胞で低発現の 4 遺伝子 (*Cnnm3*, *Higd1a*, *Leprel1*, *Mdga2*)、高発現の 1 遺伝子 (*Noth3*) を同定した。*Leprel1* は、ヒト乳がんではメチル化サイレンシングされているがん抑制遺伝子であった。

現在は、過剰発現およびノックダウンの準備を行っている。

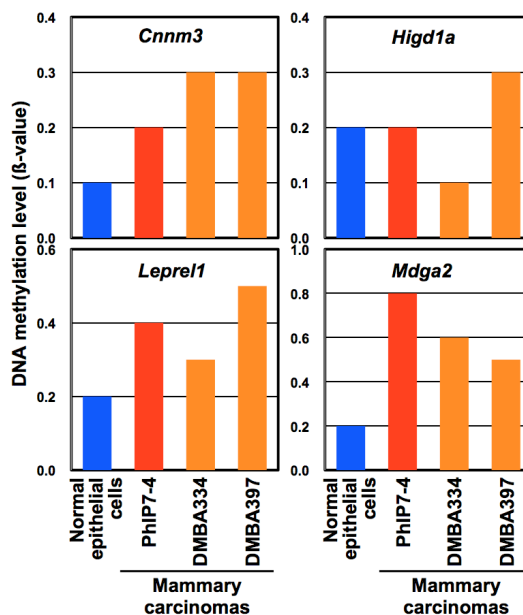


図 3 高感受性時期に bivalent であり、ラット乳がんではメチル化されている遺伝子が同定された。その中には、がん抑制遺伝子も含まれていた。

(4) まとめ

以上のことから、発がん物質に高感受性時期の乳腺の bivalent 遺伝子が同定された。それらの一部は、がんでは DNA メチル化されており、発がんにおける bivalent 修飾の意義が示唆された。

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1件）

Hattori N and Ushijima T. Epigenetic impact of infection on carcinogenesis: mechanisms and applications. Genome Med. 2016 28;8(1):10. doi: 10.1186/s13073-016-0267-2.

〔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：
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

服部 奈緒子 (HATTORI, Naoko)
国立研究開発法人国立がん研究センター・
研究所・研究員

研究者番号：30611090

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()