

令和元年5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15661

研究課題名(和文) 膵癌の発生・進展におけるホメオボックス遺伝子IRX4高度メチル化の役割

研究課題名(英文) The role of hypermethylated homeobox gene IRX4 in pancreatic tumorigenesis in

研究代表者

顧兆悌(Gu, Zhaodi)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：40451520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌において高頻度のプロモーター高度メチル化を示すIRX4遺伝子の役割を明らかにするため、膵癌細胞株PK-1、PK-9を用いてテトラサイクリン投与でIRX4発現誘導できる細胞株を作製した。IRX4の発現を誘導すると細胞増殖が抑制され、PK-1ではアポトーシスが引き起こされた。IRX4の下流遺伝子を探索した結果、IRX4発現に伴いCRYAB、CD69、IL32といった癌抑制活性を有する癌関連遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。これらの結果は、IRX4のDNAメチル化を介した転写抑制は、下流の癌抑制遺伝子の発現を抑制し、膵腫瘍形成に貢献する可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティックな異常が腫瘍形成に重要な役割を果たすにも関わらず、癌細胞中のDNAメチル化異常は数多く、その中から真のドライバー異常を見出すのは難しい。膵癌形成に重要な役割を果たすDNAメチル化異常を見出すため、DNAメチル化阻害剤、MeTA法の2つの方法で共通にIRX4が同定された。IRX4の遺伝子座5p15.33は、これまで報告されてきた膵癌感受性遺伝子座に一致する。本研究によりIRX4の膵癌における高度メチル化、低発現、IRX4発現の膵癌細胞に与える影響、その原因となるIRX4下流遺伝子群が明らかになった。これらの知見は、膵癌の診断、治療戦略を考える上で、貴重な情報となる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic gene silencing by aberrant DNA methylation is one of the important mechanisms leading to the loss of key cellular pathways in tumorigenesis. In order to clarify the significance of aberrant promoter hypermethylation of IRX4 (Iroquois homeobox 4) in pancreatic cancer, we have constructed a tetracycline-inducible IRX4 expressing system using pancreatic cancer cell lines PK-1 and PK-9. IRX4 induction significantly suppressed cell growth and caused apoptosis in PK-1 and PK-9. Because IRX4 is a sequence-specific transcription factor, we tried to analyze IRX4 downstream events by performing microarray analyses using IRX4 inducible PK-1 and PK-9 cells with or without tetracycline. We found that IRX4 induction upregulated several genes that had tumor suppressive functions such as CRYAB, CD69, and IL32. These results suggest that DNA methylation-mediated silencing of IRX4 may contribute to pancreatic tumorigenesis through aberrant transcriptional regulation of cancer-related genes.

研究分野：分子病理学

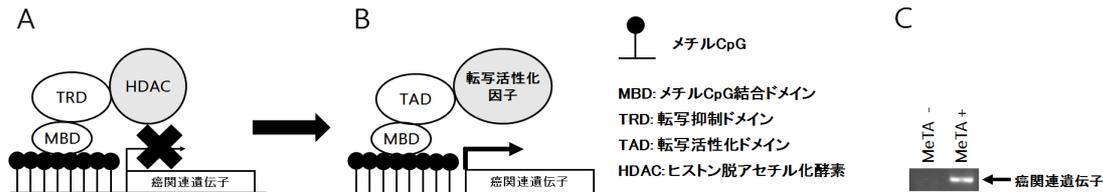
キーワード：DNAメチル化 膵癌 IRX4 腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化やヒストン修飾などエピジェネティックな異常は突然変異などのジェネティックな異常と同様、癌の発生・進展において重要な役割を果たしている。特に、癌抑制遺伝子プロモーター領域の高度メチル化は、転写抑制と密接に関連し、腫瘍形成の主要なメカニズムの一つとなっている (Jones PA & Baylin SB, Nat Rev Genet 3: 415-428, 2002)。膵癌の5年相対生存率は9%と極めて低く (国立がん研究センターがん情報サービス 2016)、膵癌の診断、治療成績向上には、癌の発生・進展過程の分子レベルでの理解が急務である。膵癌のジェネティックな異常としては、*KRAS*、*TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* などの変異が知られる。一方、エピジェネティックな異常に関しては、多くの報告があるにも関わらず、一部の膵癌に *CDKN2A* プロモーターの高度メチル化が見られる以外、ドライバーとなる遺伝子は今だ、発見されていない。

図1 MeTAの概要図



我々はこれまで DNA メチル化情報を下流のエフェクターに伝え、癌関連遺伝子の転写抑制へと導くメチル CpG 結合ドメイン (Methyl-CpG binding domain: MBD) 蛋白の解析をおこなってきた (図 1 A)。この研究から我々の研究室では、一般的な DNA メチル化阻害剤を用いる方法とは全く異なる高度メチル化遺伝子探索法 MeTA (Methyl-CpG targeted transcriptional activation) 法を開発した (Fukushige S et al, Biochem Biophys Res Commun 377: 600-605, 2008)。MeTA 法では、細胞に MBD と転写活性化ドメイン (TAD) の融合遺伝子を導入し、メチル化プロモーターに転写活性化因子をリクルートすることによりメチル化遺伝子を再活性化する (図 1 B & C、Fukushige S et al, Biochem Biophys Res Commun 379: 1021-1026, 2009)。MeTA 法と DNA メチル化阻害剤による再活性化遺伝子の重複は比較的少ないことから、MeTA 法の適用は、新たなメチル化遺伝子の発見に繋がる可能性を持つ (Sato Y et al, Epigenetics 6: 752-759, 2011)。我々は、12 種の膵癌細胞株および正常膵管上皮細胞株 HPDE に MeTA 法を適用し、膵癌細胞株で共通に再活性化される 7 種の高度メチル化遺伝子 (*IRX4*、*LHX6*、*NEFH*、*NEFL*、*NEFM*、*NPTX2*、*TMEM204*) を同定した。この中で転写因子であり、前立腺癌感受性遺伝子の一つ *IRX4* に着目した (Nguyen HH et al, Hum Mol Genet: 21, 2076-2085, 2012)。興味深いことに *IRX4* の位置する 5p15.33 は、膵癌感受性遺伝子座としても同定されている (Zhang M et al, Oncotarget doi: 10.18632/oncotarget.11041)。

まず、定量 RT-PCR をおこない、12 種の膵癌細胞株すべてで *IRX4* の発現が HPDE に比べ著しく低下していることを見出した。次に、*IRX4* 発現低下の原因を探るため、20 種の膵癌細胞株のメチル解析をおこない、すべての膵癌細胞株で *IRX4* プロモーター領域のメチル化を検出した (20/20: 100%)。さらに、膵癌手術切除標本 22 症例を用いたメチル解析でも 68% (15/22) という高率で癌特異的に *IRX4* プロモーターのメチル化が観察された。また、*IRX4* 発現のコロニー形成能に与える影響を解析するため、*IRX4* 発現ベクターと空ベクターを 2 種の膵癌細胞株 PK-1、PK-9 にトランスフェクションした結果、どちらの膵癌細胞株においても *IRX4* 発現がコロニー形成を著しく阻害した。これらの結果は、膵癌での *IRX4* プロモーター領域における高度メチル化が *IRX4* 発現の低下を引き起こし、癌細胞の増殖に何らかの影響を与えている可能性を強く示唆した。

2. 研究の目的

我々は、独自に開発した高度メチル化遺伝子探索法 (MeTA 法) を用い、膵癌の高度メチル化遺伝子として *IRX4* (Iroquois homeobox 4) を同定した。*IRX4* は膵癌感受性遺伝子座 (5p15.33) に位置し、解析した 20 種の膵癌細胞株すべてでメチル化され (20/20、100%)、発現が著しく低下していた。さらに、22 症例の膵癌手術切除標本でも 68% (15/22) で癌特異的にプロモーターのメチル化が見られた。また、膵癌細胞株に *IRX4* 発現ベクターを導入したところ、空ベクターを導入した場合に比べ、コロニー形成が著しく阻害された。本研究では、1) *IRX4* 発現回復の癌細胞に与える影響、2) 癌化における *IRX4* メチル化や発現変化の詳細な解析により膵癌形成過程における *IRX4* 高度メチル化の役割を明らかにすることを目的とした。

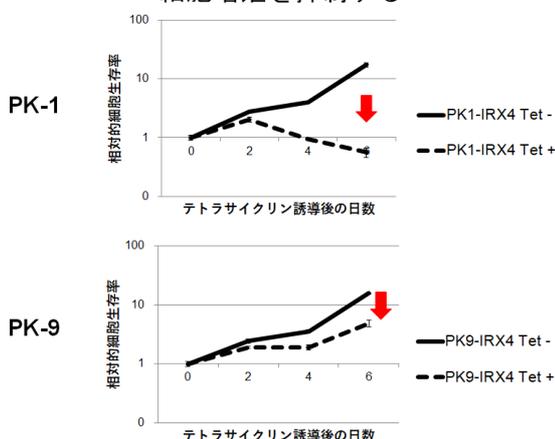
3. 研究の方法

膵癌細胞株で *IRX4* 発現による細胞増殖能の変化を見るため、高度メチル化により *IRX4* 発現がまったく見られない PK-1、PK-9 の 2 種の膵癌細胞株と *IRX4* を高発現している正常膵

管上皮細胞株 HPDE に Tet リプレッサー (TetR) 発現コンストラクトを導入後、*IRX4* 遺伝子を Tet オペレーター (TetO₂) 下流に挿入した DNA コンストラクトを導入し、*IRX4* 蛋白を発現誘導する細胞株を作製した。これらの細胞株にテトラサイクリン (tet) を投与し、*IRX4* を発現誘導した時の細胞増殖能をアラマブルーアッセイで、細胞周期解析をフローサイトメトリーで検討した。*IRX4* 蛋白の発現はウエスタンブロット法により解析し、*IRX4* の発現回復が細胞増殖に与える影響について考察した。

また、*IRX4* 発現によってコロニー形成能に大きな違いが見られることから、*IRX4* 発現誘導で細胞増殖能、移動能、浸潤能、転移能、造腫瘍能など癌細胞の特性に何らかの変化が見られることが予測された。これらの違いの原因を探るため、*IRX4* 発現の有無による遺伝子発現の変化をマイクロアレイで解析した。PK-1、PK-9 の Tet リプレッサー発現細胞株 (親株) とそれらの細胞株から派生する *IRX4* 発現誘導細胞株のテトラサイクリン投与前後の細胞から RNA を調製し、ラベル化 cRNA のマイクロアレイスライドへのハイブリダイゼーションにより転写因子 *IRX4* の下流に位置する遺伝子を網羅的に探索した。癌細胞の特性に影響を及ぼすと考えられる重要な遺伝子に関しては、*IRX4* 発現との相関を調べるため、RT-PCR 法により RNA レベルでの解析をおこなった。また、これら *IRX4* 下流遺伝子のうち、PK1、PK9 で共に *IRX4* 発現により発現上昇が見られた 3 つの遺伝子 (*CRYAB*, *CD69*, *IL32*) の発現ベクターを作製し、空ベクタートランスフェクションとの比較によってコロニー形成能への影響を調べた。これらの解析により *IRX4* がどのような細胞内経路で機能しているのか検討した。

図 2 *IRX4* 発現はPK-1 およびPK-9膵癌細胞株の細胞増殖を抑制する



(Tet) を投与し、*IRX4* を発現誘導した時の細胞増殖能をアラマブルーアッセイで、細胞周期における変化をフローサイトメトリーで検討した。その結果、合計 4 種の PK-1、PK-9 膵癌細胞株はすべて *IRX4* 発現誘導により細胞増殖が著しく阻害されるという結果を得た (図 2)。

図 3 *IRX4* 発現はPK-1膵癌細胞株にアポトーシスを引き起こす

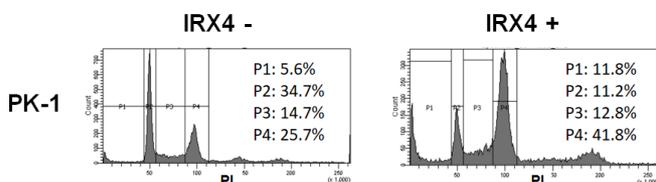
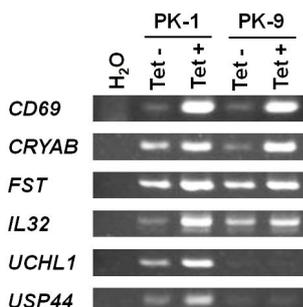


図 4 *IRX4* 発現は癌抑制遺伝子の発現を回復させる



4. 研究成果

膵癌細胞株で *IRX4* 発現による細胞増殖能の変化を見るため、高度メチル化により *IRX4* 発現がまったく見られない 2 つの膵癌細胞株 (PK-1 および PK-9) および *IRX4* を高発現している正常膵管上皮細胞株 HPDE を用い、薬剤投与により *IRX4* 蛋白を発現誘導する細胞株を作製した。そのため、まず、PK1、PK9 膵癌細胞株に Tet リプレッサー (TetR) 発現コンストラクトを導入し、次に、*IRX4* 遺伝子を Tet オペレーター (TetO₂) 下流に挿入した DNA コンストラクトを導入した。PK1、PK9 それぞれ 2 株ずつ *IRX4* 発現誘導細胞株を作製した後、これらの細胞株にテトラサイクリン

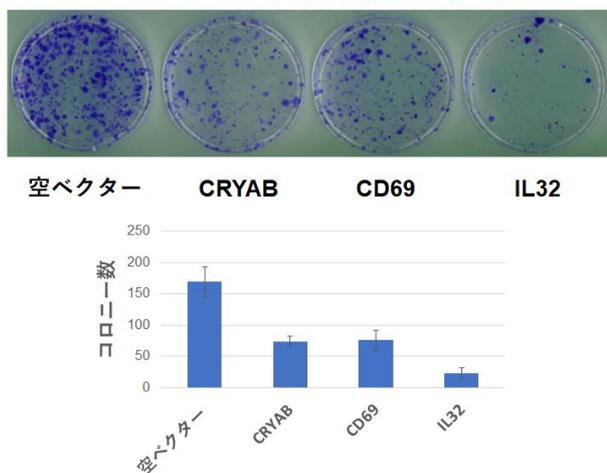
による細胞増殖能の変化を見るため、高度メチル化により *IRX4* 発現がまったく見られない 2 つの膵癌細胞株 (PK-1 および PK-9) および *IRX4* を高発現している正常膵管上皮細胞株 HPDE を用い、薬剤投与により *IRX4* 蛋白を発現誘導する細胞株を作製した。そのため、まず、PK1、PK9 膵癌細胞株に Tet リプレッサー (TetR) 発現コンストラクトを導入し、次に、*IRX4* 遺伝子を Tet オペレーター (TetO₂) 下流に挿入した DNA コンストラクトを導入した。PK1、PK9 それぞれ 2 株ずつ *IRX4* 発現誘導細胞株を作製した後、これらの細胞株にテトラサイクリン (Tet) を投与し、*IRX4* を発現誘導した時の細胞増殖能をアラマブルーアッセイで、細胞周期における変化をフローサイトメトリーで検討した。その結果、合計 4 種の PK-1、PK-9 膵癌細胞株はすべて *IRX4* 発現誘導により細胞増殖が著しく阻害されるという結果を得た (図 2)。

さらに、フローサイトメーターを用いた解析により、PK-1 膵癌細胞株では *IRX4* 発現誘導が subG1 分画 (P1) の著しい増加を引き起こすことが明らかとなった (図 3)。これらの結果は、膵癌における *IRX4* の高度メチル化、発現抑制は癌の増殖に大きな影響を与えていることを強く示唆するものと考えられた。

IRX4 はホメオボックス遺伝子で、転写因子として機能することが予想されたため、*IRX4* 発現の有無による遺伝子発現の変化をマイクロアレイで解析し下流に位置する遺伝子を網羅的に探索した。2 種の膵癌細胞株、PK-1、PK-9 の Tet リプレッサー発現細胞株 (親株) とそれらの細胞株から派生する *IRX4* 発現誘導細胞株のテトラサイクリン投与前後の細胞から RNA を調製し、ラベル化 cRNA のマイクロアレイスライドへのハイブリダイゼーションをおこなった。その結果、*CRYAB*、

CD69、IL32 遺伝子など癌抑制活性を有する複数の遺伝子が *IRX4* 発現に伴って PK1、PK9

図5 *CRYAB*、*CD69*、*IL32* 発現は膵癌細胞株のコロニー形成を阻害する



両細胞株で発現上昇することを見出した(図4)。

これらの遺伝子の発現ベクターを作製し、PK1、PK9 細胞へのトランスフェクション後、コロニー形成能を検討したところ、3つの遺伝子すべてでベクタートランスフェクションに比べ、コロニー形成能の著しい抑制効果が見られた(図5)。特に、IL32 のコロニー形成阻害の効果は他の2つの遺伝子に比べ強い傾向を示した。これらの実験結果は、*IRX4* 発現はこれら複数の遺伝子を発現上昇させることによって、膵癌細胞の増殖を抑制する癌抑制遺伝子としての

機能をもつことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

福重真一、Zhaodi Gu、堀井明、*IRX4*, a hypermethylated gene in pancreatic cancer, regulates expression of a subset of cancer-related genes. 第77回日本癌学会学術総会、2018年9月27日~9月29日、大阪国際会議場(大阪)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

東北大学大学院医学系研究科病理学講座

分子病理学分野

<http://www.molpath.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。