

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19390100

研究課題名(和文) 非 CpG アイランド領域シトシンメチル化の包括的病態解析

研究課題名(英文) A Integrated Study of Pathological Significance of
Cytosine Methylation of Non-CpG Island

研究代表者

北澤 荘平 (KITAZAWA SOHEI)

神戸大学・大学院医学研究科・客員教授

研究者番号：90186239

研究成果の概要(和文)：種々の遺伝子の転写調節領域に存在する CpG island のシトシンメチル化は遺伝子発現を抑制的に制御することが知られている。一方で、非 CpG island 領域のシトシンメチル化についても、転写制御に重要な影響を示すものがあり、私どもは、膀胱癌における TGF- β シグナル経路の偽受容体 BAMBI と、糖尿病ラットの腎腫瘍発生と P16 の発現制御を対象として、メチル化の進展が腫瘍の形態変化に関与することを示した。

研究成果の概要(英文)：Cytosine methylation in CpG-island, located usually regulatory region of many genes, is well recognized as an inhibitory epigenetic regulator. On the other hand, biological significance of the cytosine methylation other than CpG-island is unclear. By focusing morphology-oriented microscopic dissection methods, we analyzed cytosine methylation status of the BAMBI gene promoter in bladder cancer and of the P16 in renal tumor of diabetic rats, and found that some of the cytosine methylation outside of the CpG-island contributes to the tumor development and progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
総計	7,800,000	2,340,000	10,140,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：非 CpG アイランド、メチル化、遺伝子プロモータ

1. 研究開始当初の背景

樹種の遺伝子転写調節領域に存在する CpG-island のメチル化は、遺伝子発現を抑制的に制御し、発がんや癌の進展過程で癌抑制遺伝子の不活化に関与している。私どもは、未だその病態的意義が殆ど知られていない非 CpG-island のシトシンメチル化による転写制御について、病理組織学的観察、つまり、形態学に即したエピジェネティクス研究を展開することを目指して、本研究を行った。

2. 研究の目的

非 CpG-island のシトシンメチル化による転写制御については、骨代謝関連遺伝子である RANKL および SFRP4 に関して、TATA-box の数塩基上流のシトシンのメチル化と MeCP2 結合による転写抑制の分子機構を解析した。形態学に即したエピジェネティクス解析として、病変部に顕微鏡的に認識される「特定の形態的变化」において、対象遺伝子のプロモータ領域の非定型的なメチル化シトシン

の解析を行うことが目標であり、病理組織標本上で mRNA や蛋白発現の評価をするとともに、形態学的特徴に基づいて特定部位の微小組織を選択的に採取して、対象遺伝子に関するメチル化シトシンの検出を行った。

3. 研究の方法

非 CpC アイランドのシトシンメチル化の意義として、ChIP アッセイやゲルシフトアッセイにて、TATA-box 直上のシトシンメチル化による転写制御を解析した。

形態学に基づいたエピジェネティクス制御研究としては、本邦およびミャンマーの膀胱癌政権組織、腎不全透析患者の副甲状腺組織、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの腎臓腫瘍に関して、組織標本の固定条件やマイクロウェーブ処理の効果などを検討し、膀胱に関しては、TGF- β シグナル系の遺伝子、副甲状腺、腎腫瘍については、P16 の蛋白発現を評価して、組織学的病変と対比するとともに、病変部位の微小組織より、対象遺伝子のメチル化を検出した。

4. 研究成果

①TATA-box 近傍の 1 カ所のメチル化による遺伝子発現抑制の新規メカニズムを報告した。マウス諸臓器と培養細胞で破骨細胞分化因子 RANKL 発現と CpG メチル化を比較検討すると、肝臓など RANKL を発現しない臓器では骨に比してメチル化が高頻度で、しかも TATA-box の 3 塩基上流側部分のシトシンメチル化が高率に検出されたが、RANKL を発現する骨芽細胞では、同部位のメチル化はなかった。RANKL 遺伝子プロモータ領域の TATA-box 直上の(CGaggTTTATAA)は、メチル化シトシン結合蛋白 (MeCP2) の DNA 認識配列 (CpG と 3-5 塩基間をおいた 4 個の連続した A or T 配列, Mol Cell, 2005)であり、この部位での MeCP2 結合は TATA-box 結合蛋白 (TBP)との結合を阻害して転写を抑制することを、世界に先駆けて報告した。更に BAMB I や SFRP-4 遺伝子プロモータについても、RANKL 遺伝子同様に、TATA-box 近傍に CpG 配列が存在しており、TATA-box 近傍のメチル化による MeCP2 蛋白結合を介する転写調節は、多くの遺伝子の発現制御に関与する、新たなエピジェネティクス発現制御機構であることが示唆された。

②TGF β は腫瘍細胞の増殖を促進するが、偽受容体 BAMB I は TGF β /BMP シグナルを遮断して、細胞増殖や骨形成を抑制する。膀胱癌、大腸癌、前立腺癌の病理組織検体を用いて、CpG メチル化による BAMB I 発現低下について解析した。ミャンマーと本邦の検体を比較検討して、組織亜型が high grade の群では low grade の群よりも CpG メチル化が高度で

BAMB I 発現が低く、さらにミャンマーの症例では本邦よりもメチル化が高頻度であった。さらに、各種膀胱癌培養細胞株を用いて、TGF β シグナルの細胞増殖、アポトーシス、細胞遊走能への効果を検討し、BAMB I の強制発現、siRNA の効果を解析した。BAMB I 強制発現は、膀胱癌細胞株のアポトーシスを増加させ、TGF β による細胞遊走を抑制することを明らかにした。

③腎不全の病因に関する研究として、ラット糖尿病性腎症における酸化ストレスと、増殖に関与する細胞周期関連遺伝子 P16 の発現制御を検討した。糖尿病性腎症では、酸化ストレスマーカー 8OHdG の増加と P16 蛋白発現の低下を示した。糖尿病マウスにおけるメチル化頻度の増加については、CpG のみならず TATA-box 近傍の non-CpG のシトシンメチル化頻度が高く、酸化ストレスに対する治療介入実験により、メチル化頻度が減少することを示した。さらに、メチル基転移酵素 dnmt に着目して、尿細管上皮の過形成から腫瘍発生までの病変を段階的に解析した。尿細管上皮過形成では P16 は高発現であるが、やがて顕微鏡レベルの結節形成に一致して dnmt3B の特異的亢進、de novo の CpG 非依存的な de novo methylation が起こり、その後 dnmt1 による選択的な維持メチル化により CpG に集積していくことが明らかになった。

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 44 件)

①Epigenetic Alteration by DNA Promoter Hypermethylation of Genes Related to Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Signaling in Cancer (review). Sann Sanda Khin, Kitazawa R, Kondo T, Idei Y, Fujimoto M, Haraguchi R, Mori K, Kitazawa S, Cancers, (in press), 査読あり

②Mukai S, Kitazawa R, Ishii J, Kondo T, Hakozaiki A, Hosiuchi K, Kiyoshi M, Kitazawa S. Identification and analysis of function of a novel splicing variant of mouse receptor activator of NF-kappaB. Mol Cell Biochem (in press), 査読あり

③Hisa I, Inoue Y, Hendy GN, Canaff L, Kitazawa R, Kitazawa S, Komori T, Sugimoto T, Seino S, Kaji H, Parathyroid hormone-responsive Smad3-related factor, Tmem119, promotes osteoblast

differentiation and interacts with the bone morphogenetic protein-Runx2 pathway. J Biol Chem, (in press), 査読あり

- ④ Komaba H, Goto S, Fujii H, Hamada Y, Kobayashi A, Shibuya K, Tominaga Y, Otsuki N, Nibu K, Kitazawa R, Fukagawa M. Depressed expression of Klotho and FGFR1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney Int* 77, 232-238, 2010, 査読あり.
- ⑤ Fujii H, Kono K, Nakai K, Goto S, Komaba H, Hamada Y, Shinohara M, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukagawa M. Oxidative and nitrosative stress and progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Am J Nephrol* 31, 342-352, 2010, 査読あり.
- ⑥ Oka M, Edamatsu H, Kunisada M, Dien S, Kitazawa R, Kataoka T, Nishigori C. Enhancement of ultraviolet B-induced skin tumor development in *phospholipase C* $\square\square$ knockout mice is associated with decreased apoptosis. *Carcinogenesis* 31, 1897-1902, 2010, 査読あり.
- ⑦ Sann Sanda Khin, Kitazawa R, Win N, Than TA, Mori K, Kondo T, Kitazawa S. BAMBI gene is epigenetically silenced in a subset of high-grade bladder cancer. *Int J Cancer*, 125, 328-338, 2009, 査読あり
- ⑧ Kondo T, Kitazawa R, Yamaguchi A, Kitazawa S. Dexamethasone Promotes Osteoclastogenesis by Inhibiting Osteoprotegerin through Multiple Levels. *J Cell Biochem*, 103, 335-345, 2008, 査読あり
- ⑨ Niemhom S, Kitazawa S, Kitazawa R, Maeda S, Leopairat J. Hypermethylation of Epithelial-cadherin Gene Promoter is Associated with Epstein-Barr Virus in Nasopharyngeal, Carcinoma. *Cancer Detect Prev*, 32, 127-134, 2008, 査読あり
- ⑩ Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W, Inoue K, Kitazawa R, Kitazawa S, Matsuki Y, Hiramatsu R, Masubuchi S, Omachi A, Kimura K, Saito M, Amo T, Ohta S, Yamaguchi T, Osumi T, Cheng J, Fujimoto T, Nakao H, Nakao K, Aiba A, Okamura H, Fushiki T, Kasuga M,

FSP27 Contributes to Efficient Energy Storage in Murine White Adipocytes by Promoting the Formation of Unilocular Lipid Droplets, *J Clin Invest*, 118, 2808-2821, 2008, 査読あり

- ⑪ Ishii J, Kitazawa R, Mori K, McHugh K. P., Morii E, Kondo T, Kitazawa S. Lipopolysaccharide Suppresses RANK Gene Expression in Macrophages by Down-Regulating PU.1 and MITF. *J Cellular Biochem*, 105, 896-904, 2008, 査読あり
- ⑫ Darwanto A, Kitazawa R, Kondo T, Kitazawa S, MeCP2 Expression and Promoter Methylation of Cyclin D1 Gene Are Associated with Cyclin D1 Expression in Developing Rat Epididymal Duct *Acta Histochem Cytochem*, 41, 135-142, 2008, 査読あり
- ⑬ Kitazawa R, Mori K, Yamaguchi A, Kondo T, Kitazawa S. Modulation of Mouse RANKL Gene Expression by Runx2 and Vitamin D3. *J Cellular Biochem*, 105, 1289-1297, 2008, 査読あり
- ⑭ Takahashi Y, Iida K, Takeno R, Kitazawa R, Kitazawa S, Kitamura H, Fujioka Y, Yamada H, Kanda F, Ohta S, Nishimaki K, Fujimoto M, Kondo T, Iguchi G, Takahashi K, Kaji H, Okimura Y, Chihara K, Hepatic failure and enhanced oxidative stress in mitochondrial diabetes. *Endocr J*, 55, 509-14. 2008, 査読あり
- ⑮ Kitazawa R, Kitazawa S. Methylation Status of a Single CpG Locus 3 Bases Upstream of TATA-box of RANKL Gene Promoter Modulates Cell- and Tissue-specific RANKL Expression and Osteoclastogenesis. *Mol Endocrinology*, 21, 148-158, 2007, 査読あり

[学会発表] (計 52 件)

- ① 北澤 莊平, 森清, 近藤武史, 北澤理子, STZ誘発糖尿病モデルラットにおける腎腫瘍発生初期におけるエピジェネティクス変化の解析, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2007.10.3-5 (大阪)
- ② Riko Kitazawa, Junko Ishii, Satomi Mukai, Takeshi Kondo, Michiko Mori, Kiyoshi Mori, Sohei Kitazawa. RANKL

upregulates mouse RANK gene transcription through the NFAT binding site of RANK gene promoter. 第10回世界骨粗鬆症学会, 2010.5.5-8 (フィレンツェ、イタリア)

③ Kiyoshi Mori, Riko Kitazawa, Takeshi Kondo, Satomi Mukai, Michiko Mori, Sohei Kitazawa, Derepression of mouse SFRP-4 gene expression by oxidative stress: A plausible mechanism leading to low-turnover osteoporosis in diabetes and senescence. 第10回世界骨粗鬆症学会, 2010.5.5-8 (フィレンツェ、イタリア)

④ Satomi Mukai, Riko Kitazawa, Junko Ishii, Takeshi Kondo, Akihiro Hakozaiki, Keisuke Horiuchi, Kiyoshi Mori, Sohei Kitazawa, Identification and functional analysis of a novel splicing variant of mouse RANK. 第14回国際内分泌学会, 2010.3.26-30 (京都)

⑤ Sohei Kitazawa, Sann Sanda Khin, Kiyoshi Mori, Takeshi Kondo, Riko Kitazawa, BAMBI gene is epigenetically silenced in a subset of high-grade bladder cancer. 第30回米国骨代謝学会議 2008.9-12-16 (デンバー, USA)

⑥ Riko Kitazawa, Kiyoshi Mori, Takeshi Kondo, Sohei Kitazawa, Modulation of mouse RANKL gene expression by Runx2 and vitamin D3. 第29回米国骨代謝学会議 2007.9-16-19 (ハワイ, USA)

⑦ Junko Ishii, Riko Kitazawa, Takeshi Kondo, Mori K, Kevin P McHugh, Sohei Kitazawa, Molecular cloning and characterization of mouse RANK gene promoter region, 第29回米国骨代謝学会議 2007.9-16-19 (ハワイ, USA)

⑧ サン サンダキン, 北澤理子, 近藤武史, 森清, タイタンエイ, ネウイン, 北澤荘平, 日本とミャンマーにおける膀胱腫瘍進展過程におけるBAMBI遺伝子のエピジェネティクス制御の変化, 第66回日本癌学会学術総会, 2007.10.3-5 (横浜)

[図書] (計 2件)

① 北澤荘平, 森清, 近藤武史, 北澤理子, 組織細胞化学2010・組織細胞化学イメージングの基礎と最前線: 生体内分子局在と機能を探る・日本組織細胞化学会編集 エピジェネティクスと病理組織学的変化, 2010

② Kitazawa S, Mori K, Kondo T, Fujimoto M, Kitazawa R, DNA Methylation Research Trends, Epigenetic roles of CpG methylation at non-CpG-islands revealed by morphology-oriented epigenetic research (Editor; Kobayashi TB), pp43-pp66, Nova

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/patho2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北澤荘平 (SOHEI KITAZAWA)

神戸大・医・客員教授

研究者番号: 90186239

(2) 研究分担者

武中 篤 (ATSUHI TAKENAKA)

鳥取大・医・教授

研究者番号: 50368669

梶 博史 (HIROSHI KAJI)

神戸大・医・特命准教授

研究者番号: 90346255

北澤理子 (RIKO KITAZAWA)

神戸大・医・特命准教授

研究者番号: 00273780