

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007 ~ 2008
 課題番号： 19590566
 研究課題名 (和文) ヒストンメチレーションからアプローチする病態分子診断法の開発
 研究課題名 (英文) Molecular diagnosis by evaluating histone methylation
 研究代表者 安達 正晃 (ADACHI MASAOKI)
 札幌医科大学・医学部・准教授
 研究者番号： 70240926

研究成果の概要：ヒストンメチレーションがストレス状態によって変化しうることが明らかとなった。フローサイトメトリーを用いたリンパ球の解析から、ホストのストレス状態を把握できる可能性があり、診断法開発への基盤となる成果が得られたといえる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ヒストンメチル化、小胞体ストレス、酸化ストレス、クロマチン構造

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクス研究の多くは、DNAメチル化の機能に集中している。DNAメチル化は、癌細胞における癌抑制遺伝子のサイレンシングや遺伝に関わるゲノムインプリンティングなど、その生物学的役割はかなり解明されつつある。一方、遺伝子発現をダイナミックに制御していると推測されているヒストンメチル化の生物学的意義 (Nat Rev Mol Cell Biol. 6:838-849, 2005) については、未解決な点が多い。とくにヒストンメチル化と病態との関連性については、ほとんど知られていない。当該研究は、臨床医という立場から、ヒストン

メチル化の意義を疾患・病態との関連性に着目して探求するものであり、疾患発症メカニズムの解明または、診断法の開発につながる極めて新規性の高いものと位置づけできる。

申請者らは、これまでにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によってヒストンアセチル化を惹起しクロマチン構造を変化させることにより、アポトーシス誘導蛋白 Bim、Bmf などの転写が亢進すること。さらにその結果、アポトーシス誘導や放射線照射後のDNA傷害の増強が生じることなどを世界に先駆けて報告してきた。またChIPアッセイによって、Bmf 遺伝子上流の

プロモーター領域の選択的アセチル化を証明してきた(Cell Death Differ. 13:129-140, 2006; Apoptosis. 11:1349-1357, 2006; Int J Cancer. 110:301-308, 2004)。したがって、クロマチン構造変化が及ぼす遺伝子発現調節機構の重要性を認知し、その解析を進めてきたことが、本研究の着想に至った経緯である。申請者が行ってきたヒストンアセチル化レベルの解析結果やテクニックを基盤として、ヒストンメチル化レベルを解析してゆく研究であることから、これまでの研究成果を発展させる研究といえる。

2. 研究の目的

細胞株や、さまざまな疾患を有する患者様から得られたリンパ球、悪性細胞、さらに正常コントロール細胞におけるヒストンコア蛋白のメチル化レベルを検出し、疾患・病態との関わりを探索する。また、ヒストンメチル化酵素発現を人為的に制御し、過剰発現や siRNA による発現抑制による細胞特性への影響についても解析をすすめ、ヒストンダイナミズムの分子機構と疾患との関連性を総合的・論理的に解明して行く。

3. 研究の方法

(1.) ヒストンメチル化レベルの評価

得られた臨床材料(血液疾患、免疫異常のある患者様からのリンパ球や腫瘍細胞)のヒストンメチル化レベルを、3つのステップで解析してゆく。すなわち、細胞全体(核内)、染色体上、さらに特定の遺伝子・マイクロRNAの発現調節領域のヒストンメチル化レベルを評価する。細胞全体のメチル化は、抗メチル化ヒストン抗体を用いたウエスタンブロット法によって行う。細胞間のヒストンメチル化レベルの差異を検出するために、フローサイトメトリー法によって、表面抗原を蛍光ラベルした後、サポニンによって膜透過性を亢進させ、抗メチル化ヒストン抗体によって、核内のメチル化レベルを検出する。これによって、血液中の白血病細胞と正常細胞を同時に比較検討しうる。また、CD3、CD4、CD20抗体などを駆使し、免疫担当細胞におけるメチル化レベルを比較する。同様に、多種の細胞間の差異を浮き彫りにする。

(2.) メチル化ヒストンのマッピング

ヒストンメチル化は、ヘテロクロマチン領域に顕著に検出されることが知られている。恒常的ヘテロクロマチンは遺伝子がOFFになっている領域で生じており、その部位のメチル化の相違は細胞特性を決定付けるために生じているものと

予想される。本研究では、ヘテロクロマチン部位の相違とヒストンメチル化レベルの変化を共焦点顕微鏡を用いて詳細に検討する。サンプルをプレパラート上で展開し、抗メチル化ヒストン抗体で免疫染色し観察する。染色体位置はDAPIやプロビヂウムアイオダイド(PI)染色によって3蛍光によって同一サンプルでの解析が可能となり、概ねの核内部位の把握が可能である。

(3) ChIPアッセイによる特異的ヒストンメチル化領域の解析

メチル化に著変のある特定の領域を見出し、その部位から推測されるターゲット分子のChIPアッセイを行う。最も機能的に重要と思われる10前後の分子のプロモーター領域を選択し、その発現の解析、さらにChIPアッセイによるヒストンメチル化を解析する。これらの操作で、ヒストンメチル化が実際にin vivoで生じており、それが遺伝子発現に影響していることが明らかになる。

(4) ヒストンメチル化酵素の制御

ヒストンメチル化酵素(ヒストンメチルトランスフェラーゼ)は、巨大なファミリーを形成しており、どの酵素が異常を生じているかを証明することは容易ではない。本研究では比較的小さく、解析のし易いヒストンメチル化酵素であるSuv4-20h2をターゲットとするsiRNAを用いて発現抑制を行い、発現低下後の細胞特性への影響をみる。

4. 研究成果

1. ヒストンメチル化レベルの評価

臨床材料のヒストンメチル化レベルを解析した結果、ウエスタンブロット法による血液細胞全体のメチル化は著変なく、有意な差異は認められなかった。フローサイトメトリー法を用いて各細胞群における比較において、リンパ球、単球、B細胞、T細胞などの各細胞種で異なった挙動を示していた。増殖・分化と、どのような関連性があるかを詳細に分析し、報告する予定である。また、細胞株を用いた解析によって、ある種のストレスによって、ヒストンメチル化が変化することを見出した。さまざまなメチル化の中で、ヒストンH3K27とヒストンH4K20のメチル化が特に関連しているものと思われた。ストレスとクロマチン高次構造との関連性を示唆するものであり興味深い。この生物学的意義について、現在解析中であり、まともな次第、この点についても報告する予定である。

2. ヒストンメチル化の染色体マッピング

ヘテロクロマチン領域を含めて、染色体上のヒストンメチル化レベルの違いを検討した。HP1は、メチル化ヒストンに結合する蛋白であり、これに対する抗体を用いたマッピングでは、非特異的シグナルが少なく、HP1の発現レベルの違いを正しく評価できた。しかし、HP1の発現レベルやパターンと関連した明らかな疾患関連領域は特定されていない。

3. ChIPアッセイによる特異的ヒストンメチル化領域の証明

ChIPアッセイを用いて、特定の遺伝子領域のヒストンメチル化を解析した。リボゾームDNAは、複数の染色体上に数百コピー存在していることから、この領域に着目し、ChIPアッセイを行った。放射線照射によって、ある種のヒストンのメチル化が変化することが判った。この点に着目し、放射線感受性との関連性について、検討したが、放射線感受性と明らかな関連性は見いだせなかった。現在、特定の遺伝子のプロモーター領域に着目して解析中である。

4. ヒストンメチル化酵素のノックダウン

ヒストンメチル化酵素（ヒストンメチルトランスフェラーゼ）の中で、SUV4-20H1 及び SUV4-20H2 に着目して解析を進めた。この遺伝子をターゲットする siRNA をトランスフェクトし、その発現を抑制し、ストレス応答への影響をみた。複数の siRNA の中で高率に転写を抑制するものが得られ、現在、詳細にその生物学的意義を解析中であり、その結果を報告する予定である。これまでの結果から、放射線の感受性に何らかの関与しているらしいことが判明した。これも、詳細な情報を加えて報告する予定である。また、現在 shRNA 発現ベクターの構築中であり、これを用いてより長時間の発現抑制しうるシステムを確立しつつある。この情報によって、siRNA を用いた新しい放射線治療を開発したい。

5. 酸化ストレスの調節機構に XBP1 が関与している

申請者が、同時進行して解析を進めてきた酸化ストレスに関する研究成果が、ようやくまとまって報告した。その主旨は、小胞体ストレス応答に関わる XBP1 が酸化ストレス応答にもかわり、一分子が両者のストレスに働き、細胞をストレスから守っているらしいことを突き止めた。酸化ス

レス応答において、XBP1 はカタラーゼ遺伝子発現の転写を亢進させ、酸化ストレスを除去しうるように制御していることが判明した。この転写活性化がヒストンのメチル化と関連している可能性があり、現在解析中である。

6. 酸化ストレス誘導を促す parthenolide が亜ヒ酸との併用ですい臓がんの治療に役立つことを発見

これまで、申請者らが中心となって、継続してきた酸化ストレスを利用した新しいがん治療の開発に関して報告した。主旨は、亜ヒ酸と薬草成分 parthenolide との併用で、単剤にはない著明な抗腫瘍効果を得ることである。この結果は、すい臓がんに対する新たな治療法になるものと期待できる。

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 12 件)

1. Liu Y, Adachi M, Zhao S, Hareyama M, Koong AC, Luo D, Rando TA, Imai K and Shinomura Y. Preventing oxidative stress: A new role for XBP1. Cell Death Diff. 2009 in press. 査読 有

2. Wang W, Adachi M, Zhou J, and Zhu D. A novel combination therapy of arsenic trioxide with parthenolide against pancreatic cancer Cells. Pancreas 2009 in press. 査読 有

3. Okawa Y, Hideshima T, Steed P, Vallet S, Hall S, Huang K, Rice J, Barabasz A, Foley B, Ikeda H, Raje N, Kiziltepe T, Yasui H, Enatsu S, Anderson KC. SNX-2112, a selective Hsp90 inhibitor, potently inhibits tumor cell growth, angiogenesis, and osteoclastogenesis in multiple myeloma and other hematologic tumors by abrogating signaling via Akt and ERK. Blood. 113:846-855, 2009. 査読 有

4. Okawa Y, Hideshima T, Ikeda H, Raje N, Vallet S, Kiziltepe T, Yasui H, Enatsu S, Pozzi S, Bretkreutz I, Cirstea D, Santo L, Richardson P, Anderson KC. Fatty acid synthase is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 141:659-671, 2008. 査読 有
5. Neri P, Tassone P, Shamma M, Yasui H, Schipani E, Batchu RB, Blotta S, Prabhala R, Catley L, Hamasaki M, Hideshima T, Chauhan D, Jacob GS, Picker D, Venuta S, Anderson KC, Munshi NC. Biological pathways and in vivo antitumor activity induced by Atiprimod in myeloma. *Leukemia.* 21:2519-2526, 2007. 査読 有
6. Hideshima T, Catley L, Raje N, Chauhan D, Podar K, Mitsiades C, Tai YT, Vallet S, Kiziltepe T, Ocio E, Ikeda H, Okawa Y, Hideshima H, Munshi NC, Yasui H, Richardson PG, Anderson KC. Inhibition of Akt induces significant downregulation of survivin and cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Br J Haematol.* 138:783-791. 2007. 査読 有
7. Vallet S, Raje N, Ishitsuka K, Hideshima T, Podar K, Chhetri S, Pozzi S, Bretkreutz I, Kiziltepe T, Yasui H, Ocio EM, Shiraishi N, Jin J, Okawa Y, Ikeda H, Mukherjee S, Vaghela N, Cirstea D, Ladetto M, Boccadoro M, Anderson KC. MLN3897, a novel CCR1 inhibitor, impairs osteoclastogenesis and inhibits the interaction of multiple myeloma cells and osteoclasts. *Blood.* 110:3744-3752, 2007. 査読 有
8. Kiziltepe T, Hideshima T, Catley L, Raje N, Yasui H, Shiraishi N, Okawa Y, Ikeda H, Vallet S, Pozzi S, Ishitsuka K, Ocio EM, Chauhan D, Anderson KC. 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther.* 6:1718-1727, 2007. 査読 有
9. Kiziltepe T, Hideshima T, Ishitsuka K, Ocio EM, Raje N, Catley L, Li CQ, Trudel LJ, Yasui H, Vallet S, Kutok JL, Chauhan D, Mitsiades CS, Saavedra JE, Wogan GN, Keefer LK, Shami PJ, Anderson KC. JS-K, a GST-activated nitric oxide generator, induces DNA double-strand breaks, activates DNA damage response pathways, and induces apoptosis in vitro and in vivo in human multiple myeloma cells. *Blood.* 110:709-718, 2007. 査読 有
10. Sukhdeo K, Mani M, Zhang Y, Dutta J, Yasui H, Rooney MD, Carrasco DE, Zheng M, He H, Tai YT, Mitsiades C, Anderson KC, Carrasco DR. Targeting the beta-catenin/TCF transcriptional complex in the treatment of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:7516-7521, 2007. 査読 有
11. Podar K, Raab MS, Tonon G, Sattler M, Barilà D, Zhang J, Tai YT, Yasui H, Raje N, DePinho RA, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC. Up-regulation of c-Jun inhibits proliferation and induces apoptosis via caspase-triggered c-Abl cleavage in human

multiple myeloma. Cancer Res. 67:1680-1688, 2007. 査読 有

12. Adachi M, Sakamoto H, Kawamura R, Wang W, Imai K, Shinomura Y. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and oxidative stress in cancer cells. Histol Histopathol. 22:437-442, 2007. 査読 有

[学会発表] (計 5 件)

1. 安達正晃、劉 耀華、趙世光、Koong Albert, Rando Thomas, Dan Ruo, 今井浩三、篠村泰久
X B P 1 の新しい機能:酸化ストレス応答への関与 日本分子生物学会年会 2008 年 12 月 11 日 神戸

2. Adachi M, Liu Y, Zhao S, Hareyama M, Koong A, Imai K and Shinomura Y.
Preventing oxidative stress: A new role for XBP1 and its candidate as a molecular target for cancer.
The 6th International Symposium on cancer research and therapy. Tokyo Nov 22, 2008

3. 安達正晃、劉 耀華、Koong Albert, 今井浩三、篠村泰久
第 17 回 日本癌病態治療研究会
2008 年 6 月 26 日 京都

4. 安達正晃、劉 耀華、今井浩三、篠村泰久
IL-2 シグナルと小胞体ストレスシグナル 日本分子生物学会年会 2007 年 12 月 14 日 横浜

5. 安達正晃、今井浩三、晴山雅人、篠村泰久
内在性ホルモンを利用した新たな放射線感受性亢進療法の開発 第 16 回 日本癌病態治療研究会
2007 年 6 月 28 日 東京

[図書] (計 2 件)

1. 安達正晃
基質依存性増殖 / アノイキス (Anoikis)
改訂 培養細胞実験ハンドブック 羊土社 135-138、2008

2. 安達正晃
遺伝子治療
看護のための最新医学講座 第 2 版

24 巻 (腫瘍の臨床) 中山書店 2
15-227、2008

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 正晃 (ADACHI MASA AKI)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 70240926

(2) 研究分担者

安井 寛 (YASUI HIROSHI)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 40448593

今井 浩三 (IMAI KOHZOH)
札幌医科大学・学長
研究者番号: 60117603

(3) 連携研究者

なし