

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19790953
 研究課題名(和文) 大腸癌における de novo メチル化形成と c-Myc の転写抑制との関連
 研究課題名(英文) Analysis of the relevance of c-Myc function to de novo methylation in colorectal cancer
 研究代表者 伊関 大敬(ISEKI HIROYOSHI)
 埼玉医科大学・医学部・研究員
 研究者番号：50433652

研究成果の概要：大腸癌において DNA メチル化がどのように特定ゲノム領域に形成されるかを解明するため、癌遺伝子 c-MYC の標的遺伝子と DNA メチル化形成との関連を検討した。ヒト大腸由来正常上皮細胞に c-MYC を過剰発現させると標的遺伝子の発現抑制をするものの DNA メチル化は誘発せず、当初の仮説を支持する結果は得られなかった。一方、新規に同定した c-MYC 標的遺伝子 ALEX1 の大腸癌における DNA メチル化による不活化が観察された。大腸癌は多段階的異常の蓄積により進行すると考えられており、c-MYC の過剰発現に加え、その他遺伝子変異やシグナル伝達経路の異常活性化が DNA メチル化形成に必要であるのかも知れない。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	270,000	2,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：小腸大腸肛門外科学

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化はエピジェネティックな遺

伝子発現制御機構の一つであり、プロモーター領域における DNA メチル化は遺伝子発現を

抑制する。CpG 配列を多く含む CpG 島は DNA メチル化の標的領域であり、全遺伝子の約半数に含まれるが、正常細胞では多くは非メチル化状態にある。しかし、癌においては特定の CpG 島に de novo メチル化の形成が検出され、その下流や近傍の遺伝子が不活化されている。de novo メチル化は p21 や p16 等癌抑制遺伝子のプロモーター上に見られ、DNA メチル化による癌抑制遺伝子の不活化が癌化を促進すると考えられているが、いかにして特定の遺伝子のプロモーター上に de novo メチル化が引き起こされるのかほとんど分かっていない。

DNA 結合性転写因子は特定の塩基配列を認識し、特定遺伝子のプロモーター活性を調節する。従って個々の細胞における遺伝子発現プロファイルは転写因子の発現や活性化状態に依存している。近年、急性前骨髄球性白血病の原因因子である PML-RAR が DNA メチル基転移酵素 (DNMT3) を標的遺伝子プロモーター上にリクルートし、DNA メチル化を介して転写を抑制する事が示唆された。同様に癌遺伝子 c-MYC も標的遺伝子 p21 のプロモーター上に DNMT3 と共局在し、CpG 島のメチル化亢進と発現抑制に関与すると考えられてい

る。これらは転写因子と DNA メチル化との関連性を示唆するものであり、転写因子の配列特異性と遺伝子特異的 de novo メチル化との関連が疑われる。一方、80-90%の大腸癌において APC に変異が見られ、異常な Wnt シグナル活性化を介して c-MYC や cyclin D1 等の発現を亢進し発癌や進行を促進する。したがって c-Myc の発現増強とそれに伴う DNA メチル化変化が大腸癌の発癌、進行に関わる可能性が考えられる

2 . 研究の目的

本研究課題では、転写因子が DNMT3 をリクルートし DNA メチル化を介してその標的遺伝子の発現を抑制し得ることから、転写因子が DNA メチル化の特異性かつ誘発を決める一因であるという仮説を立てた。そこで大腸癌における遺伝子特異的 de novo メチル化形成機構の解明を目的とし、c-MYC の発現亢進による標的遺伝子の発現抑制と de novo メチル化との関連を検討した。

3 . 研究の方法

ヒト大腸由来正常上皮細胞 NCM460 を用いて、c-MYC 過剰発現により発現抑制される標

的遺伝子の同定及び de novo メチル化形成の有無をそれぞれ qRT-PCR 法及び Bisulfite sequencing 法、MeDIP 法、MSP 法を用いて解析した。

4 . 研究成果

(1)c-MYC 過剰発現による既知標的遺伝子の発現抑制及び DNA メチル化形成の検討。まず NCM460 細胞に c-Myc 発現レトロウイルスを 5MOI で感染させ、24 時間、48 時間、72 時間、6 日、12 日、30 日後に total RNA を回収し、c-MYC 標的遺伝子 p21 の発現を qRT-PCR 法を用いて検討した。感染後 72 時間後より p21 の発現低下が見られ 30 日後まで抑制が維持されており、NCM460 細胞への c-MYC 過剰発現により p21 が発現抑制される事が確認された。次に、同条件下で処理した NCM460 細胞よりゲノムを回収し、p21 プロモーターの DNA メチル化を Bisulfite sequencing 法、MeDIP 法その他、高感度な MSP 法を用いて検討した。感染後 30 日後まで DNA メチル化の亢進は見られず低メチル化を維持していた。また他の c-MYC 標的遺伝子 Von Hippel-Lindau (VHL) でも同様な結果であった。これらの結果は、少なくとも 30 日間の c-MYC 過剰発現ではヒ

ト大腸由来正常上皮細胞において標的遺伝子プロモーター上に de novo メチル化を誘発するのに不十分である事を示唆している。

(2)DNMT3 の共発現による c-MYC 標的遺伝子の発現抑制及び DNA メチル化形成の検討。NCM460 細胞では大腸癌細胞株 HCT116、SW480 等に比べ DNMT3 の発現が非常に低く、DNMT3 の発現量が de novo メチル化形成に影響している可能性がある。そこで c-MYC 及び DNMT3B 発現レトロウイルスを共感染させ(1)と同様の検討を行った。c-MYC 単独の過剰発現と同様 72 時間後より p21 の発現は抑制されたが、30 日後においても p21 プロモーター上の DNA メチル化形成は無かった。

(3)新規 c-MYC 標的遺伝子の同定と大腸癌における DNA メチル化の検討。c-MYC 標的遺伝子候補として ALEX1 が検出されたため、ALEX1 の c-MYC による発現制御と DNA メチル化形成を検討した。ルシフェラーゼ解析により、c-MYC の過剰発現が ALEX1 プロモーター活性を抑制する事が明らかとなった。また大腸癌細胞株 HCT116 及び SW480 で DNA メチル化により silencing されていた。さらに、大腸癌症例の約 70%で発現抑制が見られ、そのうち約 20%で DNA メチル化の亢進が検出された。

本研究課題では、ヒト大腸由来正常上皮細胞を用いて、当初の仮説を支持する結果は得られなかった。近年、癌における DNA メチル化形質と癌遺伝子 BRAF や KRAS の活性化との関連が示唆されている。c-MYC 及び DNMT3 の過剰発現に加え、癌化に特徴的な BRAF や KRAS の活性化を伴うシグナル伝達経路の活性化が必要なのかも知れない。正常細胞と癌細胞の細胞種による相違等も含め今後の検討が必要である。

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)

[学会発表] (計 1 件)

伊関 大敬

Promoter methylation inhibits

Wnt/ · -catenin-mediated

transcriptional

activation of ALEX1 in human colorectal

cancer

第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月

28 日、名古屋国際会議場 (名古屋)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊関 大敬 (ISEKI HIROYOSHI)

埼玉医科大学・医学部・研究員

研究者番号 : 50433652

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし