

平成 21年 5月 26日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19890165  
 研究課題名（和文） 癌における MBD1 および hPc2 による転写抑制機構を標的とした新規治療法の開発  
 研究課題名（英文） Development of the new therapy targeting a transcriptional suppression mechanism by MBD1 and hPc2 in cancer  
 研究代表者  
 坂本 快郎（SAKAMOTO YASUO）  
 熊本大学・医学部附属病院・医員  
 研究者番号：00452897

研究成果の概要：本研究ではメチル化 DNA 結合タンパク質およびポリコームタンパク質群による転写抑制機構を標的とした癌抑制遺伝子の再活性化による癌治療の可能性を、分子生物学的手法にて解明することを目的とした。現在までの研究にて MBD1 あるいは hPc2 をノックダウンすることで、再活性化する遺伝子の存在、膀胱癌細胞株における MBD1 および hPc2 の発現状況の確認を終えている。今後はこれらが細胞増殖へ与える影響を検討していく。

## 交付額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,330,000 | 0       | 1,330,000 |
| 2008年度 | 1,350,000 | 405,000 | 1,755,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,680,000 | 405,000 | 3,085,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般・実験外科学

キーワード：分子標的治療、DNA メチル化、ポリコーム、MBD1、hPc2

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでの研究にて、DNA のメチル化およびメチル化 DNA 結合タンパク質の一つである MBD1（図 1）と、ポリコームタンパク質群に属する hPc2 および Ring1b（図 2）による協同的転写調節機構の存在を世界で初めて明らかにした（図 3）。この研究は、これまで別個に論じられてきた DNA のメチル化に関連した転写抑制システムとポリコームタンパク質群による転写抑制システムが共同して転写を調節していることを証明しており、分子生物学において重要な研究成果である。

図 1

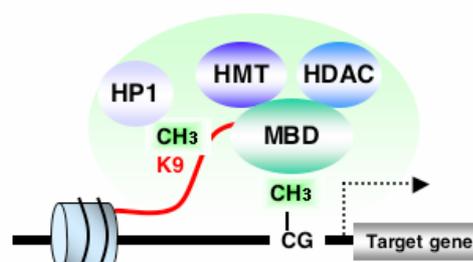


図 2

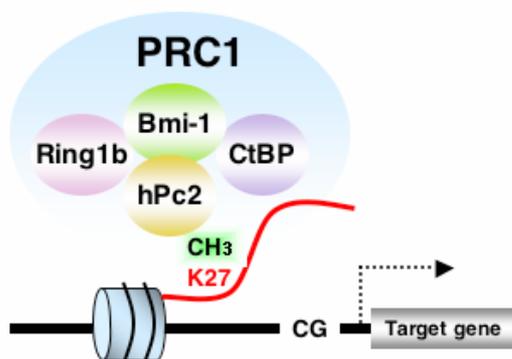
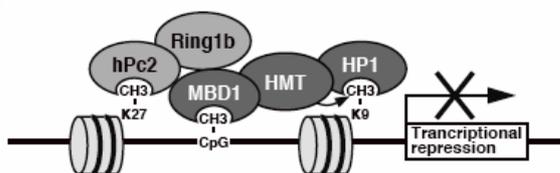


図 3



この協同的転写調節機構は、正常細胞におけるものと考えられるが、癌細胞においても同様に機能している可能性がある。そこで、これらの転写抑制システムの異常により、発現すべき遺伝子が抑制することで癌化・細胞増殖・浸潤能獲得に関連している可能性が仮説として考えられた。本研究ではこの研究成果を癌治療に応用し、メチル化 DNA 結合タンパク質およびポリコームタンパク質群による転写抑制機構を標的とした癌抑制遺伝子の再活性化による癌治療の可能性を、分子生物学的手法にて解明することを目的としている。本研究により消化器領域固形癌における効果が確認されることによって、新たな分子標的治療の開発並びにその combination therapy の可能性が広がり、癌治療戦略において多大なる貢献ができると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究ではメチル化 DNA 結合タンパク質およびポリコームタンパク質群による協同的転写抑制機構によって異常に抑制された遺伝子を再活性化することにより、細胞環境を正常化することによる癌治療の可能性を、分子生物学的手法にて解明することを目的とする。本研究により消化器領域固形癌における効果が確認されることによって、新たな分子標的治療の開発並びにその combination therapy の可能性が広がり、癌治療戦略において多大なる貢献ができると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) メチル化 DNA 結合タンパク質のひとつである MBD1 およびポリコームタンパク質 hPc2 の癌への関与の検討

MBD1 および hPc2 の消化器領域固形癌における発現状況の確認

申請者の研究対象であるメチル化 DNA 結合タンパク質のひとつである MBD1 とポリコームタンパク質群に属する hPc2 の発現状況を消化器領域固形癌由来の癌細胞において確認する。

MBD1 および hPc2 の遺伝子導入による癌細胞への影響の検討

MBD1 または hPc2 のいずれか、もしくは両方の発現が著しく低いあるいは認めない cell line を用いて両タンパク質を遺伝子導入の手技を用いて過剰発現させることにより癌細胞の増殖能、浸潤能などの変化を検討する。

MBD1 および hPc2 ノックダウンを用いた転写抑制機能阻害による癌細胞への効果検討

過剰発現を認めた cell line を用いてそれぞれの分子を siRNA の手法を用いることでノックダウンすることで癌細胞の増殖能、浸潤能などの変化を検討する。

### (2) MBD1 および hPc2 の発現状況と予後との相関性に関する検討

申請者が専門としており、一般的に難治癌とされる膵癌症例において免疫染色で発現を確認する。当科におけるこれまでの臨床実績から臨床検体標本と予後調査結果が存在するため、発現と予後の相関性を調べることができる。

- (3) MBD1およびhPc2ノックダウンによる治療への応用の検討  
両タンパク質によるノックダウンによって増殖能が低下する細胞が認められた場合は、ヌードマウスへ移植後ノックダウンによる腫瘍増殖への影響を検討したい。

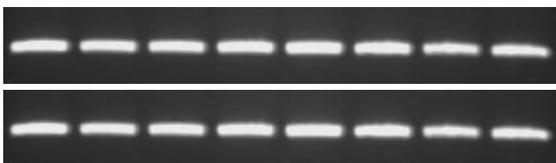
#### 4. 研究成果

申請者はこれまでの研究にてメチル化DNA結合タンパク質のひとつであるMBD1とポリコームタンパク質群に属するhPc2およびRingibによる転写調節機構の存在を世界で初めて明らかにした。

本研究は、この成果を臨床医学・癌治療に応用することを最終目標とする研究である。本年度の研究実施計画にて1.「メチル化DNA結合タンパク質MBD1およびポリコームタンパク質hPc2の癌への関与の検討」として(1)MBD1およびhPc2の消化器領域固形癌における発現状況の確認、(2)MBD1およびhPc2の遺伝子導入による癌細胞への影響の検討、(3)MBD1およびhPc2ノックダウンを用いた転写抑制機能阻害による癌細胞への効果検討、を挙げた。

- (1) メチル化DNA結合タンパク質のひとつであるMBD1およびポリコームタンパク質hPc2の癌への関与の検討に関しては、まず膀胱癌細胞株に置いてPCRにてmRNAの存在を確認した。各種細胞株におけるMBD1とhPc2の発現を提示する(図4)。

図4



さらにウエスタンブロットの手法を用いてcell lineにおいて高発現細胞および低発現細胞を探索した。これらの細胞を用いて以後の実験を行う計画である。

MBD1およびhPc2の遺伝子導入による癌細胞への影響の検討に関しては、タンパク発現用遺伝子導入ベクターは作成済みであるのでこれらの至適導入効率を得られる条件を検討中である。

MBD1およびhPc2ノックダウンを用いた転写抑制機能阻害による癌細胞への効果の検討に関しては、ノックダウン用ベクターを作成済みであるのでノックダウン効率を検討したのち実験に入る予定である。

- (2) MBD1およびhPc2ノックダウンによって影響を受ける癌抑制遺伝子の探索に関しては現在進行中である(1)メチル化DNA結合タンパク質MBD1およびポリコームタンパク質hPc2の癌への関与の検討の実験において、ある程度の結果を得たのちに平行して行えるよう開始する予定である。
- (3) MBD1およびhPc2ノックダウンによる治療への応用の検討に関しては、ノックダウン実験の条件検討を行った後に、本実験へはいる予定であり、現在は準備中である。

#### 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)

[雑誌論文](計2件)

Aoto T, Saitoh N, Sakamoto Y, Watanabe S, Nakao M.

Polycomb group protein-associated chromatin is reproduced in post-mitotic G1 phase and is required for S phase progression.

J Biol Chem 283:18905-15, 2008.

Sakamoto Y, Watanabe S, Ichimura T, Kawasuji M, Koseki H, Baba H, Nakao M. Overlapping roles of the methylated DNA-binding protein MBD1 and polycomb group proteins in transcriptional repression of HOXA genes and heterochromatin foci formation.

J Biol Chem 282:16391-400, 2007.

〔学会発表〕(計1件)

坂本快郎、癌細胞の HOXA 遺伝子群の抑制とヘテロクロマチン形成における MBD1 とポリコームタンパク質群の協調的な役割、第66回日本癌学会総会、2007年10月4日、パシフィコ横浜

〔図書〕(計1件)

丁秀鎮, 坂本快郎, 赤星慎一, 三代剛, 渡邊すぎ子, 斉藤典子, 中尾光善.  
老化および発癌のエピジェネティクス.  
日高齢消医会誌.8:28-37. 2007.

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 快郎 (SAKAMOTO YASUO)  
熊本大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 00452897

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし