

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07928

研究課題名（和文）自然免疫から獲得免疫へのシフトによる高度で質的に異なるメチル化異常誘発の機序解明

研究課題名（英文）Mechanisms of severe induction of aberrant DNA methylation by the shift from innate to acquired immunity

研究代表者

竹島 秀幸（Takeshima, Hideyuki）

星薬科大学・先端生命科学研究所・特任准教授

研究者番号：40432497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：鳥肌胃炎があるヒト胃粘膜10症例、及び、通常の萎縮性胃炎があるヒト胃粘膜13症例におけるDNAメチル化をゲノム網羅的に解析しクラスター解析をおこなった。その結果、鳥肌胃炎10例のうち6例は萎縮性胃炎とは別のクラスターに分類され、66個の遺伝子で異常メチル化（メチル化レベルの上昇 10%）を示した。CDH1やDAPK1などのがん抑制遺伝子が鳥肌胃炎でより高度にメチル化されていた。また、鳥肌胃炎症例において発現が変化しているDNAメチル化制御因子の探索をおこなった結果、DNA脱メチル化に関与するTET2、及び、IDH1の発現が約半分程度に低下していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により鳥肌胃炎に曝露することでエピゲノム異常誘発が加速すること、その標的遺伝子にはCDH1など未分化がんの発生に重要ながん抑制遺伝子が含まれていることが明らかになった。以上の成果は、未分化がんの発生メカニズムを解明するための基盤情報として極めて有用である。

研究成果の概要（英文）：DNA methylation in 10 gastric mucosa samples with nodular gastritis and 13 gastric mucosa samples with atrophic gastritis was analyzed in genome-wide manner, and the cluster analysis was conducted. Six of the 10 samples with nodular gastritis formed a cluster with strong methylation, and 66 genes showed higher methylation levels in samples with nodular gastritis (increased methylation level: 10% or more). Tumor-suppressor genes, such as CDH1 and DAPK1, were more highly methylated in samples with nodular gastritis. In addition, TET2 and IDH1, which are involved in DNA demethylation, had only half the expression in samples with nodular gastritis.

研究分野：がんエピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

細菌やウイルスなどの外部からの攻撃に対する防御である免疫応答の慢性化は、胃がん・大腸がん・肝がんなどの慢性炎症に関連したがんの発生に深く関与する。研究代表者は、そのメカニズムとして、慢性炎症により誘発される DNA メチル化異常の関与を解明してきた。最近、DNA メチル化異常誘発の分子メカニズムとして、自然免疫により産生される IL-1 や TNF による NF- κ B シグナルの活性化を介した DNA 脱メチル化酵素の発現抑制、及び、一酸化窒素による DNA メチル化酵素の酵素活性増強が DNA メチル化異常を相乗的に誘発することを解明した (Takeshima et al., J Clin Invest, 130: 5370-5379, 2020)。

自然免疫から獲得免疫へのシフトにより、胃では、粘膜下のリンパ濾胞過形成を特徴とする鳥肌胃炎が起きる。この鳥肌胃炎は、低分化型胃がんの発生母地となるため、その発生機序解明は臨床的にも重要である。研究代表者は、鳥肌胃炎に曝露した胃粘膜 4 症例を解析し、鳥肌胃炎では、より高度の DNA メチル化異常が存在すること、異常の標的には *DAPK1* や *HOXA5* などのがん抑制遺伝子が含まれており、質的に異なるメチル化異常誘発であることを予備的に見出した。

2. 研究の目的

本研究では、鳥肌胃炎をモデルとして用いて、自然免疫から獲得免疫へのシフトによる高度で質的に異なる DNA メチル化異常誘発の機序解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 鳥肌胃炎における高度で質的に異なる DNA メチル化異常誘発の証明

鳥肌胃炎があるヒト胃粘膜 (10 症例程度) における DNA メチル化をゲノム網羅的に解析、通常の慢性炎症 (非鳥肌胃炎) によるメチル化異常誘発の程度と比較する。これにより、鳥肌胃炎に曝露することで、より高度な DNA メチル化異常が誘発されることを証明する。また、鳥肌胃炎では通常の炎症とは異なる遺伝子群がメチル化されるかどうかを明らかにする。

(2) 高度で質的に異なる DNA メチル化異常誘発に重要なサイトカインの解明

鳥肌胃炎特異的に高発現・分泌亢進しているサイトカインを RNA-seq、及び、サイトカインアレイを用いて絞り込む。絞り込んだサイトカインを用いて、組織幹細胞の反応を生理的条件に近い状態で *in vitro* 解析することができるオルガノイド (ピロリ菌非感染のヒト胃組織から樹立) を処理する。ピロリ菌感染慢性炎症に特徴的な IL-1、TNF、及び、一酸化窒素の組み合わせ処理と比較し、より高度なメチル化異常誘発が起こるかどうか、異なる遺伝子群がメチル化されるかどうかを解明する。

(3) 高度で質的に異なるメチル化誘発のメカニズム解明

高度で質的に異なるメチル化異常誘発の分子メカニズムを、i) DNA メチル化を制御する因子、ii) メチル化されるゲノム領域を規定する因子に着目して解明する。DNA メチル化を制御する因子については、DNA メチル化酵素 (DNMT1、DNMT3A、DNMT3B)、及び、脱メチル化酵素 (TET1、TET2、TET3) のゲノム上での増減と分布変化を ChIP-seq 法により解析する。変化が認められた場合は、DNA メチル化酵素や脱メチル化酵素の特定ゲノム領域へのリクルートに関与する可能性のある転写因子等を探索する。メチル化されるゲノム領域を規定する因子については、メチル化されるゲノム領域のマークとして知られるヒストン H3 の 27 番目のリジンメチル化 (H3K27me3) の増減と分布変化を解析する。

(4) 高度で質的に異なる DNA メチル化異常誘発抑制の解明

研究計画 (2) で同定したサイトカインのノックアウトマウスを入手、ピロリ菌に感染させることで慢性炎症を惹起する。慢性炎症に 10 週間程度曝露した後にメチル化解析を行い、DNA メチル化異常誘発が抑制できるかどうかを明らかにする。また、サイトカインの中和抗体を用いた場合にも、抑制できるかどうかを明らかにする。

これにより、自然免疫から獲得免疫へのシフトによる高度で質的に異なる DNA メチル化異常誘発が抑制できることを証明する。

4. 研究成果

1 年目は、まず、鳥肌胃炎があるヒト胃粘膜 10 症例、及び、通常の慢性炎症 (萎縮性胃炎) があるヒト胃粘膜 10 症例における DNA メチル化をゲノム網羅的に解析した。クラスター解析の結果、鳥肌胃炎 10 例のうち 6 例は萎縮性胃炎とは別のクラスターに分類され、124 個の遺伝子で異常メチル化 (メチル化レベルの上昇 10%) を示した。鳥肌胃炎 10 例と萎縮性胃炎 10 例の比較でも、*CDH1* や *DAPK1* などのがん抑制遺伝子が鳥肌胃炎でより高度にメチル化されていた。次に、鳥肌胃炎特異的に高発現しているサイトカインを明らかにするために RNA-seq 解析をおこなった。その結果、鳥肌胃炎では、IL13、IL16、IL33 などの Th2 サイトカイン遺伝子が優

位に発現していることが明らかになった。

2年目は、鳥肌胃炎症例の前庭部でより高度にメチル化されている CDH1、DAPK1、RASSF10、KLF4、及び、RAP1GAP などのがん抑制遺伝子について、がん近傍領域（体部）におけるメチル化レベルを解析した。その結果、これらのがん抑制遺伝子は、鳥肌胃炎症例のがん近傍領域においても高度にメチル化されていることが明らかになった。また、鳥肌胃炎症例において発現が変化している DNA メチル化制御因子の探索をおこなった。その結果、DNA 脱メチル化に關与する TET2、及び、IDH1 の発現が約半分程度に低下していることが明らかになった。

3年目は、鳥肌胃炎症例における DNA メチル化異常の加速は、発がん前の症例においても認められることを明らかにした。また、胃体部における DNA メチル化解析をおこない、胃体部においても鳥肌胃炎症例は通常の萎縮性胃炎症例に比べて DNA メチル化異常の誘発が加速していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki Akiko, Takeshima Hideyuki, Yamashita Satoshi, Ichita Chikamasa, Kawachi Jun, Naito Wataru, Ohashi Yui, Takeuchi Chihiro, Fukuda Masahide, Furuichi Yumi, Yamamichi Nobutake, Ando Takayuki, Kobara Hideki, Kotera Tohru, Itoi Takao, Sumida Chihiro, Hamada Akinobu, Koizumi Kazuya, Ushijima Toshikazu	4. 巻 59
2. 論文標題 Severe induction of aberrant DNA methylation by nodular gastritis in adults	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 442 ~ 456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-024-02094-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹島秀幸、牛島俊和
2. 発表標題 慢性炎症に曝露した組織のシングルセル遺伝子発現・エピゲノム変化解析を目指したPaired-seq条件の最適化
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideyuki Takeshima and Toshikazu Ushijima
2. 発表標題 Single cell analysis of gene expression and epigenomic changes by optimization of Paired-seq.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹島秀幸、牛島俊和
2. 発表標題 シングルセルレベルでの遺伝子発現・エピゲノム変化同時解析を目指したPaired-seqの最適化.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshima H, Yoda Y and Ushijima T.
2. 発表標題 Low-dose DNA demethylating therapy induces reprogramming of diverse cancer-related pathways at the single-cell level.
3. 学会等名 The 39th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshima H, Nishiyama K and Ushijima T
2. 発表標題 エピジェネティック制御因子は異常メチル化に抵抗性だが、SETD6は胃がんにおいてメチル化サイレンシングされる
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Furuichi Y, Takeshima H, Nishiyama K, Yamashita S, Okano K and Ushijima T
2. 発表標題 遺伝子Cがメチル化された食道扁平上皮癌は遺伝子D阻害と合成致死性を示す
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹島秀幸, 西山和宏 and 牛島俊和
2. 発表標題 エピジェネティック制御因子は異常メチル化に抵抗性だが、SETD6は胃がんにおいてメチル化サイレンシングされる
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------