

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月24日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591986

研究課題名(和文) ベックウィズウィードマン症候群および腎芽腫の刷り込み現象：その化学調節研究

研究課題名(英文) Investigation of Imprinting mechanism between Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms tumor

研究代表者

越永 従道 (KOSHINAGA TSUGUMICHI)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：70205376

研究成果の概要(和文)：腎芽腫を高率に合併するベックウィズウィードマン症候群の原因遺伝子座である11p15.5ではKvDMRドメインにおけるDNA脱メチル化(Loss of Imprinting)が生じている。すなわち*KCNQ1OT1*遺伝子の絶対的、相対的発現増加により周辺遺伝子の発現減少が生じ腎芽腫発生に関わっている。我々は*KCNQ1OT1*遺伝子の発現を抑制するPIポリアミドを新規に開発・合成した。このPIポリアミドを腎芽腫細胞株G401に投与し、*KCNQ1OT1*遺伝子の発現抑制および細胞増殖抑制効果を確認した。このPIポリアミドはLoss of Imprintingを生じている腎芽腫およびその他の腫瘍に対して新規抗腫瘍薬となり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In Beckwith Wiedeman syndrome (BWS), which occur in conjunction with Wilms tumor at high rates, DNA demethylation of KvDMR domain on chromosome 11p15.5 has been frequently observed. In fact, absolute or relative overexpression of *KCNQ1OT1* gene inhibits circumjacent genes on same allele. To suppress *KCNQ1OT1* gene expression, two PI polyamides were designed to recognize CCAAT box of promoter region. After the treatment with those PI polyamides, significant down-regulation of *KCNQ1OT1* gene and growth inhibition were observed in G401 (Wilms tumor cell lines). The results indicate that these PI polyamides could be new therapeutic agents for Wilms tumor and other tumors which has Loss of Imprinting in KvDMR domain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：Imprinting異常、PIポリアミド、小児外科

1. 研究開始当初の背景

(1) Imprintingは遺伝子発現の調整機構のひとつであり、母方もしくは父方のいずれかの対立遺伝子が選択的に不活化されることにより母型、父型で異なる遺伝子群の発現をする現象である。Beckwith-Wiedeman syndrome (BWS)では11p15.5領域に存在するKvDMR、H19DMRという2つのドメインにおけるImprinting異常(メチル化異常、欠失、父型対立遺伝子の獲得など)による母型片親発現調整遺伝子群の絶対的、相対的な発現低下が疾患の発現に関与している。KvDMRでは主にDNA脱メチル化が生じて*KCNQ1OT1*遺伝子の過剰発現しており、*KCNQ1OT1*遺伝子が*p57^{KIP2}*を含めた周辺遺伝子の発現をcisに抑制している。*p57^{KIP2}*(*KIP2*)遺伝子は、cyclin-dependent kinase inhibitorのひとつであり、G1チェックポイントの負の調節因子である。また成人の大腸癌や肺癌などでも発現低下が報告されている腫瘍抑制遺伝子である。BWSの約10%に胎児性腫瘍、特に腎芽腫の合併が確認されており、このImprinting異常が腫瘍発生メカニズムと関連があることが考えられる。

(2)PI ポリアミドはピロール基(Py)ならびにイミダゾール基(Im)の組み合わせからなる化学合成物質で、2001年にPeter B DervanによりPyとImの任意の組み合わせが特定のDNA塩基配列を認識できることが報告されたものである。そのDNAへの結合力は強く、Py/ImペアがCG、Py/PyペアがATまたはTA、Im/PyペアがGCを認識し、minor grooveへと結合する。この性質を応用して特定の塩基配列に対応する様に合成したPIポリアミドは、その配列特異的にDNAと結合する。そのため、ある標的遺伝子の転写調整領域に対して配列特異的に合成・結合させると、本来の転写因子の同領域への結合を競合的に阻害する。その結果、標的遺伝子の転写、および発現の調節が可能となると考えられる。PIポリアミドは生体内で安定性が高く、特殊なdrug delivery systemを必要としないことから臨床応用を念頭において様々な研究を行ってきた。

(3)我々は*KCNQ1OT1*遺伝子のプロモーター領域において転写因子結合領域であるCCAAT配列の一部とその隣接配列に特異的に結合するPIポリアミドを作製し、これを用いてKvDMRの脱メチル化状態を改善することで腎芽腫に対する抗腫瘍効果を誘導する研究をin vitroの系で企画した。

2. 研究の目的

本研究では以下の項目を検討し、内容を明らかにすることを目的とした。

(1) *KCNQ1OT1* 遺伝子のプロモーター領域を標的とするPIポリアミドを合成する。

(2)ヒトBWS線維芽細胞株で*KCNQ1OT1* 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を確認し、低メチル化状態である株を選定する。また、その株を対象としてPIポリアミド投与濃度の至適条件を決定し、PIポリアミド投与による*KCNQ1OT1* 遺伝子の発現状態の変化を確認する。

(3)ヒト腎芽腫細胞株(G401)の*KCNQ1OT1* 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を確認する。PIポリアミドを投与し、*KCNQ1OT1* 遺伝子の発現状態の変化および細胞増殖抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) *KCNQ1OT1* 遺伝子に対するPIポリアミドの設計・合成

KCNQ1OT1 遺伝子プロモーター領域はCpG island 165であり、その配列中にはCCAAT配列は4つ確認できた。そのうち2つに対してPIポリアミドを設計・合成した。CCAAT配列に対して隣接配列を含んで塩基配列を決定することで特異度が高くなるように設計した。合成はFmoc法による固相自動合成とHPLCによる精製を行った。また、薬物動態実験に用いるため、それぞれにFITCで蛍光ラベリングしたPIポリアミドも作製した。

作製したPIポリアミドが特異的に配列認識・結合することをelectrophoretic mobility shift assay (EMSA)により確認する。

(2)ヒトBWS線維芽細胞株における*KCNQ1OT1* 遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化状態の確認

BWSの線維芽細胞株であるBWS6, 7, 8, 9を我々は保管しており、これを用いた。

培養後、抽出したDNAをbisulfite法で亜硫酸水素ナトリウム処理によって非メチル化シトシンをウラシルへ塩基置換し、polymerase chain reactionで増幅し、in vitro転写をした。使用したプライマーはin vitro転写のためにforward側にT7-promoter taq

(5' -cagtaatacagactcactatagggagaaggct-3')とreverse側にアニーリング温度のバランスのため10bp (5' aggaagagag-3')の負荷を付けて作製した。この際にシトシンもしくはチミンの塩基をデオキシリボ核酸とした。その後、リボ核酸のウラシルとシトシンを切断するRNaseA処理とチミン塩基配列特異的切断であるT cleavageを行う。これによりシトシンはデオキシリボ核酸となるためウラシルを特異的に切断でき、このフラグメントはメチル基修飾の有無で異なる。このフラグメントの質量差を飛行時間型質量分析装置で検出し、DNAメチル化状態を定量的に確認した。

(3)PIポリアミドによるBWS線維芽細胞株における*KCNQ1OT1* 遺伝子発現変化の検討

BWS 線維芽細胞株と PI ポリアミド 2 種類を共培養後、RNA を抽出し、それを cDNA にした後、real time RT-PCR で発現を確認した。

(4) 腎芽腫細胞株 G401 における *KCNQ10T1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化状態の確認

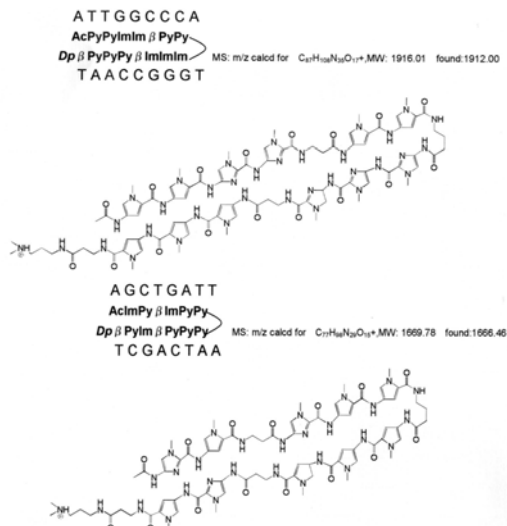
G401 を用いて (2) と同様の方法で *KCNQ10T1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化状態の程度を確認した。

(5) 腎芽腫細胞株 G401 に対する PI ポリアミドの影響の検討

G401 に対して 2 種類の PI ポリアミドを投与したのち、24 時間毎に WST-8 法を用いて細胞増殖抑制効果を検討した。また、(3) と同様に real time RT-PCR で *KCNQ10T1* 遺伝子の発現の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) FITC でラベリングした oligo をもちいて設計・合成した PI ポリアミドとの特異的結合性を EMSA で確認できた。



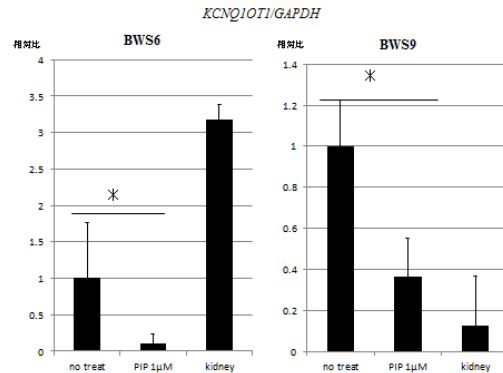
また、FITC でラベリングした PI ポリアミドを生細胞に投与し、ホルムアルデヒドで固定後プレパラートを作製し、蛍光顕微鏡で観察し、生細胞の核内移行性を確認できた。

(2) 飛行時間型質量分析装置 MassARRAY EpiTYPER を用いてヒト BWS 線維芽細胞株 (BWS6, 7, 8, 9) とヒト腎芽腫細胞株 (G401) の *KCNQ10T1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化状態を確認した。正常組織としてヒト正常腎臓組織を用いた。その結果、BWS6, 9 ではほぼ 0%、BWS7, 8, G401 は 35~40%であった。正常組織では約 50%であった。これは正常では父型アレルが脱メチル化、母型アレルがメチル化されていることと矛盾しない結果であった。

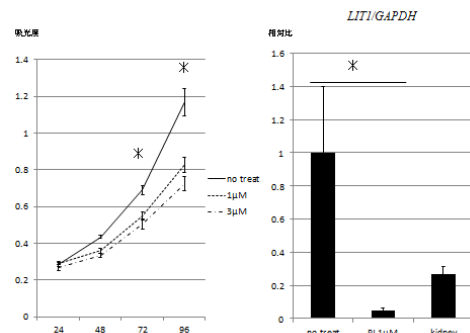
(3) KvDMR が低メチル化状態であった BWS6, 9 を 2×10^5 個/5ml に調整し播種した。PI ポリアミドを終濃度 $1 \mu\text{M}$ になるように投与し、72 時間共培養後回収した。Real time

RT-PCR で *KCNQ10T1* 遺伝子の発現を確認したところ BWS6, 9 共に有意に発現抑制が確認できた。(p<0.05) この結果より新規に設計・合成した PI ポリアミドが標的とした配列に結合し、その発現を抑制できることが確認できた。PI ポリアミド投与による細胞の形態変化や細胞数の変化は認めなかったため in vitro の系では *KCNQ10T1* 遺伝子の発現抑制による影響は少ないと考える。

(4) 次に G401 を 2×10^3 個/100 μl 播種し、PI



ポリアミド 2 種類を $1 \mu\text{M}$ ずつ、 $3 \mu\text{M}$ ずつ投与し、24 時間毎に WST-8 法で細胞増殖抑制試験を行ったところ、PI ポリアミド投与群で 72 時間後から有意に細胞数の減少が確認できた。(p<0.05) また、 $1 \mu\text{M}$ 投与し 72 時間培養後に得られた細胞を用いて *KCNQ10T1* 遺伝子の発現を確認したところ有意に発現抑制が確認された。(p<0.05)



(5) PI ポリアミドを $1 \mu\text{M}$ ずつ投与し 72 時間培養後、得られた細胞から蛋白を抽出し、Western Blotting にて KIP2 蛋白の発現を検討した。その結果、非投与群よりバンドの濃染を確認でき、KIP2 蛋白の発現増加を確認できた。また、KIP2 蛋白はミトコンドリア経由アポトーシスを促進するとの報告があり、PI ポリアミド投与により *KCNQ10T1* 遺伝子の抑制が生じ、*KCNQ10T1* 遺伝子に発現抑制されていた周辺遺伝子の発現が増加し、そのうちの KIP2 蛋白がアポトーシスを誘導し、腫瘍細胞増殖抑制効果を生じていることが推測された。

以上より腎芽腫細胞株 G401 に対して *KCNQ10T1* 遺伝子の発現を抑制する PI ポリア

ミドを投与することで KIP2 蛋白の発現を増加させ、腫瘍細胞増殖抑制効果を生じることが確認できた。この PI ポリアミドは KvDMR に脱メチル化を生じている腫瘍に対して新規抗腫瘍薬となり得る可能性が示唆された。Loss of Imprinting の改善を行ったのは現在、世界で初めてであり、非常に意義のあるものだと考えられる。他に成人腫瘍でも同領域の Loss of Imprinting が原因と考えられている腫瘍があり、これらに対しても抗腫瘍効果を生じる可能性が示唆される。今後は他の腫瘍での検討および in vivo の系での検討が必要と考えられる。

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 6 件)

1. *LIT1* 遺伝子を標的とした PYRROLE-IMIDAZOLE POLYAMIDE (PIP) の抗腫瘍効果の検討: 吉澤信輔, 杉藤公信, 星玲奈, 植草省太, 川島弘之, 古屋武史, 金田英秀, 細田利史, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 藤原恭子, 相馬正義, 永瀬浩喜. 第 113 回日本外科学会総会. 福岡, 2013, 5
2. Inhibition of LIT1 Gene Transcription by Pyrrole-Imidazole Polyamide in Beckwith-Wiedemann syndrome fibroblast cell lines: Shinsuke Yoshizawa, Kiminobu Sugito, Shota Uekusa, Hiroyuki Kawashima, Reina Hoshi, Takeshi Furuya, Hide Kaneda, Toshifumi Hosoda, Takayuki Masuko, Taro Ikeda, Tsugumichi Koshinaga, Kyoko Fujiwara, Hiroki Nagase. 44th International Society of Paediatric Oncology. London, England, 2012, 10
3. Inhibition of LIT1 Gene Transcription by PI Polyamide (PIP) in Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) fibroblast cell lines: Shinsuke Yoshizawa, Shota Uekusa, Hiroyuki Kawashima, Kyoko Fujiwara, Hiroki Nagase: 第 71 回日本癌学会総会. 札幌, 2012, 10
4. Beckwith-Wiedemann 症候群細胞株における Pyrrole-Imidazole Polyamide (P-I Polyamide) による p57^{KIP2} 遺伝子の発現調節: 吉澤信輔, 杉藤公信, 星玲奈, 植草省太, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 藤原恭子, 相馬正義: 第 49 回日本小児外科学会総会, 横浜, 2012, 5
5. PI ポリアミドによる腫瘍抑制遺伝子 p57^{KIP2} の再発現の検討: 吉澤信輔, 杉藤公信, 星玲奈, 植草省太, 大橋研介, 井上

幹也, 池田太郎, 越永従道, 相馬正義, 麦島秀雄. 第 112 回日本外科学会総会, 幕張, 2012, 4

6. Beckwith-Wiedemann 症候群細胞株における Pyrrole-Imidazole Polyamide (P-I Polyamide) による p57^{KIP2} 遺伝子の発現調節: 吉澤信輔, 杉藤公信, 星玲奈, 植草省太, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 藤原恭子, 相馬正義. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011, 11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越永 従道 (KOSHINAGA TSUGUMITI)

日本大学・医学部・教授

研究者番号: 70205376

(2) 研究分担者

杉藤 公信 (SUGITO KIMINOBU)

日本大学・医学部・助教

研究者番号: 10328750

大橋 研介 (OOHASHI KENSUKE)

日本大学・医学部・助手

研究者番号: 10526065

古屋 武史 (FURUYA TAKESHI)

日本大学・医学部・その他

研究者番号: 20568539

藤原 恭子 (FUJIWARA KYOUKO)

日本大学・医学部・助教

研究者番号: 40595708

(3) 連携研究者

()

研究者番号: