

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650589

研究課題名(和文) DNA異常メチル化 *in vivo* 検出系の開発研究課題名(英文) Development of an *in vivo* assay system for aberrant DNA methylation

研究代表者

高田 江里子 (TAKADA, ERIKO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：50300942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化異常を誘発する因子に関する知見は限られている。本研究は、異常メチル化を *in vivo* で検出する系を開発することを目的とした。プロモーターCpGアイランドの下流にLacI遺伝子を挿入したベクター及びlacOの下流にEGFP遺伝子を挿入したベクターを、ヒト大腸がん細胞株へ安定に導入した。この細胞は、ヌードマウス皮下での移植腫瘍形成過程で、プロモーターの異常メチル化と共に緑色蛍光を誘導した。緑色蛍光を誘導しなかった腫瘍では異常メチル化は起きていなかった。以上より、構築した細胞株は異常メチル化を検出できる可能性があり、今後この原理を用いたトランスジェニックマウスの作製が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Our knowledge of the factors that induce aberrant DNA methylation is limited. The present study aimed to develop an assay system to detect aberrant DNA methylation *in vivo*. The vector, in which LacI was inserted into downstream of the promoter CpG island, and the vector, in which EGFP as the reporter gene was inserted into downstream of lacO, were stably introduced into a human colon cancer cell line. The cells induced aberrant methylation of the promoter with green fluorescence during xenograft tumor formation in nude mice. In the tumor without fluorescence, no methylation was induced. These results indicate that cell lines constructed in this study may have the ability to detect induction of aberrant methylation. In the next step, construction of transgenic mouse using this strategy would be expected.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 培養細胞 LacI 検出系

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化異常は、遺伝子突然変異と並び、がん抑制遺伝子不活性化の主要メカニズムであり、発がんに関与する。最近、神経・精神疾患、自己免疫疾患、代謝疾患等、多くの後天的疾患でメチル化異常が報告されている。しかし、メチル化異常を誘発する因子に関する知見は極めて限られる。加齢、ウイルス感染・ピロリ菌感染などの慢性炎症、喫煙等が知られているが、がんにおける多くのメチル化異常を説明するには、これら既知の因子は圧倒的に少ない。その理由は、異常メチル化を誘発する要因を効率的に同定する系がないことが大きい。

この背景のもと、メチル化異常誘発因子を細胞レベルで検出する試みがごく限定的になされているが、成功していない。近年、我々の研究室を初め、複数の研究室から、メチル化異常誘発には慢性炎症由来の因子が重要であることが報告されている。従って、メチル化異常の誘発には、間質細胞由来の因子と上皮細胞との相互作用が重要である可能性が高い。新規メチル化異常誘発要因の同定には、炎症細胞等を含む間質細胞と上皮細胞の相互作用を加味した *in vivo* 検出系の構築が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、メチル化異常誘発を *in vivo* で検出できる系を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ベクターの構築

メチル化検出に適したプロモーター領域 CpG アイランド(CGI)を選定し、そのゲノム領域をクローニングした。この CGI の下流に LacI 翻訳領域を 2 コピー挿入した LacI 発現ベクター、及び、レポーター遺伝子として *EGFP* 遺伝子を lac オペレーター(lacO)の下流に導入した *EGFP* 発現ベクターを構築した。それぞれ、pCMVLacI (Stratagene)、pOPRSV (Stratagene)、pIRES2-EGFP (Clontech)を改変して作製した。

(2) ベクターの細胞への導入

哺乳動物細胞株は H3-30 を用いた。H3-30 は我々の研究室で作製した細胞株で、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 を脱メチル化剤 (5-aza-2'-deoxycytidine) で処理した後、クローニングした細胞株の一つである。H3-30 へ二種のベクターを Lipofectamine2000 (Invitrogen)にてリポフェクション法によりゲノム中に安定に導入、クローンを数系統分離した。IPTG (5mM, 46h)の添加により、緑色蛍光が明瞭に観察されるクローンを至適ク

ローンとして選定した。蛍光顕微鏡は Olympus DP75 を用いた。

(3) 移植腫瘍の形成及び初代培養

ヌードマウス(BALB/cAJc1-nu/nu, 雌 5 週齢)の皮下に、細胞懸濁液(4x10⁶ 個/200μl)と等量のマトリジェル(BD Biosciences)を混合したものを移植し、腫瘍を一週間に一度計測した。また、形成した腫瘍は IVIS Imaging System(住商ファーマインターナショナル)を用いた *in vivo* 蛍光イメージングにより、緑色蛍光誘導の有無を観察した。細胞の皮下への移植から 11-14 週間後、腫瘍を摘出し、一部を乾式法及びコラゲナーゼ分散法により初代培養した。

(4) DNA メチル化解析

QuickGene-Mini80 (FUJIFILM)を用いて初代培養細胞からゲノム DNA を抽出し、制限酵素 Hpy188I にて断片化した。導入した LacI ベクターの *UCHL1* プロモーター領域 (LacI allele)には多型が存在し、親細胞 H3-30 のゲノム中の *UCHL1* プロモーター領域 (wild-type allele)と区別することができる。Hpy188I の認識配列は、wild-type allele の多型が存在する箇所にも存在し、そこで選択的に切断する。LacI allele では、その箇所に Hpy188I の認識配列は存在しない。従って、Hpy188I による断片化、及び、多型の箇所を挟んだプライマーセットを用いることにより、LacI allele のゲノム DNA だけを対照にメチル化解析を実施できる。

断片化した DNA は bisulfite 処理を行なった。水酸化ナトリウムにより DNA を変性した後、3.6N bisulfite 溶液(pH 5.0)中で、95 30 秒、50 15 分の反応を 15 サイクル行った。水酸化ナトリウムにより脱スルホン化後、Zymo-spin カラム(Zymo Research)により精製し、-20 にて保存した。*UCHL1* プロモーター領域について bisulfite sequencing を行った。Bisulfite 処理を行ったゲノム DNA を鋳型に、メチル化 DNA 及び非メチル化 DNA に共通のプライマーで PCR を行った。PCR 産物をクローニング、サイクルシーケンスにより各 CpG 部位のメチル化状態を決定した。

(倫理面への配慮)

本組換え DNA 実験は国立がん研究センターの機関承認を得て、組換え DNA 実験指針に従って行った。本動物実験は国立がん研究センターの定める動物実験指針に従うとともに、動物倫理委員会の承認を得た上で、動物の苦痛の低減に務め、動物愛護の精神に基づいて実験を行った。

4. 研究成果

本研究の異常メチル化検出のストラテジーは、メチル化が誘発されやすい CpG アイランド(CGI)をもつプロモーターの下流に *LacI* 遺伝子を導入し、さらに、*lacO* の下流にレポーター遺伝子を導入した二種のベクターの相互作用を利用して検出するものである(図1)。通常は *LacI* 遺伝子が発現し、*LacI* タンパクが *lacO* 領域に結合することにより、レポーター遺伝子の発現は抑制されている。しかし、プロモーターCGIがメチル化されると、*LacI* 遺伝子が発現できなくなり、その結果、*LacI* タンパクによる抑制が外れ、レポーター遺伝子が発現する。このストラテジーにより、異常メチル化を期待通りに検出できるか否かの動作確認を、まずは哺乳動物培養細胞の系を用いて行った。

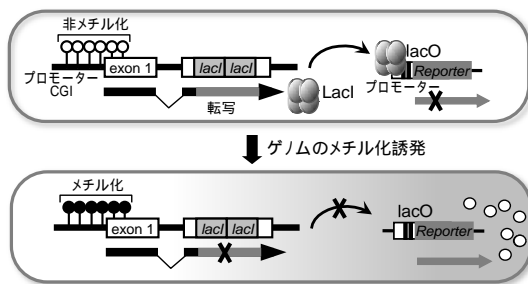


図1 *LacI* 遺伝子を用いたDNAメチル化検出のストラテジー

DNAメチル化されていない遺伝子プロモーターCpGアイランド(CGI)の下流に、*LacI* 遺伝子を挿入する。通常は、*LacI* 遺伝子が発現し、*LacI* タンパクが *lacO* 領域に結合することにより、レポーター遺伝子の発現は抑制されている。ゲノムのメチル化が誘発され、プロモーターCGIがメチル化されると *LacI* 遺伝子が発現できなくなり、その結果、*LacI* タンパクによる抑制が外れ、レポーター遺伝子が発現する。

(1) メチル化検出のマーカーとして用いるプロモーター領域 CGI の選定

当初はマウス大腸粘膜でメチル化されやすいプロモーター領域 CGI を用いる計画だったが、適した CGI を同定することができなかった。マウスはヒトと比べメチル化されている遺伝子数が少なく、またゲノム全体の CGI 密度も低いことが知られている。従って、本研究では、ヒト遺伝子の CGI をメチル化検出のマーカーとして用いることとした。すでに我々は、ヒト大腸上皮細胞で容易にメチル化され、プロモーター領域のメチル化状態と下流遺伝子の発現状態とに良好な相関関係があり、尚かつ、下流遺伝子の転写レベルが高い CGI として *UCHL1* プロモーター領域 CGI を同定している (Okochi-takada, *Int. J. Cancer*, 2006)。本研究では、この *UCHL1* プロモーターCGI をメチル化検出のマーカーに用いることとした。

(2) ベクターの細胞導入とクローン選定

まず、*UCHL1* プロモーター領域 CGI を含むゲノム領域をクローニングした。その CGI の下流に *LacI* 翻訳領域を 2 コピー挿入した *LacI* 発現ベクターを作製した。*LacI* の発現は、プロモーターCGI の DNA メチル化以外に、遺伝子突然変異によっても抑制されうる。突然変異による発現抑制を検出してしまふことを回避するため、本実験では *LacI* 翻訳領域を 2 コピー挿入したベクターを作製した。連続した遺伝子に同時に突然変異が入る確立は極めて低いことがすでに知られているからである。*LacI* 発現ベクターに加え、レポーター遺伝子として緑色蛍光蛋白を産生する *EGFP* 遺伝子を *lacO* の下流に導入した *EGFP* 発現ベクターも構築した。

まず、*EGFP* 発現ベクターをヒト大腸がん細胞株 H3-30 へ導入、緑色蛍光強度が高いクローンを 31 個分離した。この中から *EGFP* 遺伝子の発現レベルの高く、尚かつ、細胞増殖が良好なクローンを 2 個選定した。次に、この 2 個の細胞へ *LacI* 発現ベクターを導入、緑色蛍光を消失したクローンを 17 個分離した。これらのクローンの中で、IPTG の添加により緑色蛍光が明瞭に誘導されるものが 4 クローン存在した。この 4 個のクローンについて分子生物学的解析を行い、*LacI* 発現ベクターが 1 コピーで挿入され、尚かつ、*LacI* 遺伝子の発現が *UCHL1* プロモーターで制御されていることが確認できたクローンとして、1 個を同定した。このクローン細胞を 31UL23 と命名した。

(3) 31UL23 のメチル化検出系としての評価

樹立した細胞株 31UL23 がメチル化検出系として異常メチル化を検出できるか否かを評価した。陽性対照に用いる DNA メチル化を明確に誘発する薬剤が、現在存在しない。そのため本実験では、ヌードマウス皮下に移植腫瘍を形成させ、腫瘍形成過程で異常メチルを起こし、それを検出できるか否かを調べることにした。

ヌードマウスに移植腫瘍を形成させたところ、*in vivo* 蛍光イメージングにおいて、腫瘍の一部で緑色蛍光が検出されるものが認められた(図2A、#4-1)。さらに、それら腫瘍片の初代培養を行ったところ、緑色蛍光を有した細胞が一部存在していることが確認できた(図2B、#4-1)。誘発した 6 個の移植腫瘍中 5 個で、腫瘍の一部に緑色蛍光の誘導が認められた。

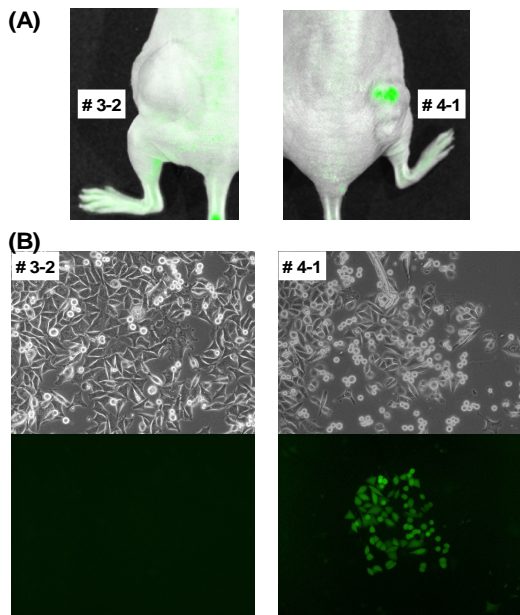


図2 移植腫瘍中に誘導された緑色蛍光を発する細胞 (A) *in vivo* 蛍光イメージング観察 (B) 腫瘍片から作製した初代培養細胞の蛍光顕微鏡観察

代表的に2種類の腫瘍及びその初代培養細胞を示した。腫瘍#3-2は、*in vivo* 蛍光イメージング及び初代培養細胞の蛍光顕微鏡観察のいずれにおいても緑色蛍光の誘導は認められなかったが、腫瘍#4-1では、*in vivo* 蛍光イメージングにおいて一部の腫瘍部分で緑色蛍光の誘導が観察され、また、初代培養細胞では、一部の細胞が緑色蛍光を発していることが観察された。

さらに、それらの細胞では、*UCHL1* プロモーター領域 CGI にメチル化が誘発されていた(図3、#4-1)。一方、*in vivo* 蛍光イメージングでも初代培養でも緑色蛍光が観察されなかった腫瘍が一つ存在したが(図2、#3-2)、この腫瘍ではメチル化は誘発されていなかった(図3、#3-2)。

以上の結果から、本研究で構築した細胞株は異常メチル化の誘発を緑色蛍光として検出できる可能性があると考えられた。今後、このストラテジーを用いたトランスジェニックマウスの作製が期待できる。

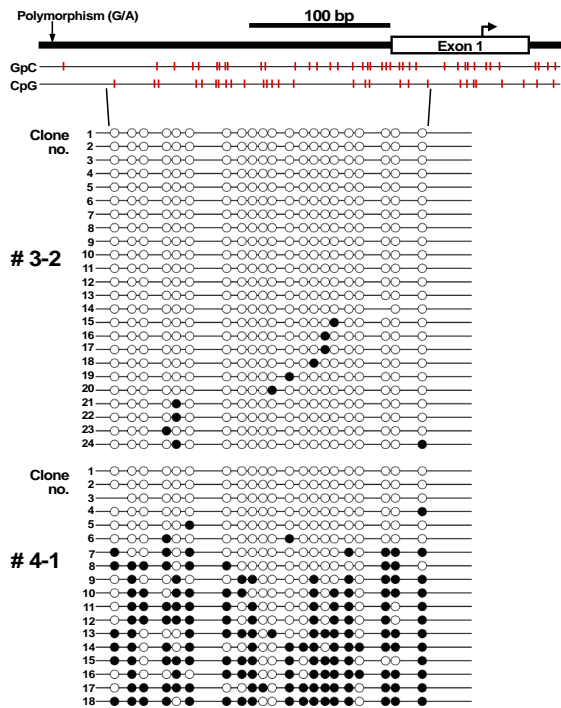


図3 初代培養細胞から抽出したゲノムDNAのメチル化解析の結果

LacZ 遺伝子上流の *UCHL1* プロモーター領域 CGI における 21 個の CpG 部位について、bisulfite sequencing を行った。● はメチル化 CpG 部位を、また、○ は非メチル化 CpG 部位を示す。緑色蛍光の誘導が認められなかった腫瘍 #3-2 では、プロモーター領域 CGI はほとんど非メチル化状態であった。それに対し、緑色蛍光の誘導が観察された腫瘍 #4-1 では、プロモーター領域 CGI におけるメチル化が、明らかに誘発されていた。

5. 主な発表論文等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 江里子 (TAKADA, Eriko)
独立行政法人国立がん研究センター・
研究所・特任研究員
研究者番号：50300942