

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710227

研究課題名(和文) Outlierアプローチによる新規がん抑制遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel tumor-suppressor genes by Outlier approach

研究代表者

竹島 秀幸 (Takeshima, Hideyuki)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：40432497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円、(間接経費) 540,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化異常は、がん抑制遺伝子の主要な不活化機構の1つである。本研究では、「遺伝子が異常メチル化される際の法則」を利用し、多数の異常メチル化された遺伝子の中から、効率よくがん抑制遺伝子を同定する方法を開発することを目的とした。

ヒト乳がんのメチル化解析から、280個のメチル化感受性遺伝子を同定した。このうち14遺伝子が法則に従わないOutlier遺伝子であった。Outlier遺伝子のうち、DZIP1は新規のがん抑制遺伝子、FBN2及びHOXA5は既知のがん抑制遺伝子であった。これらにより、Outlier遺伝子の探索によりがん抑制遺伝子が効率的に同定できることが示された。

研究成果の概要(英文)：Aberrant DNA methylation of promoter CpG islands (CGIs) is deeply involved in human carcinogenesis. Although hundreds to thousands of genes are aberrantly methylated in cancer cells, the majority is methylated as a consequence of carcinogenesis, and it is difficult to identify tumor-suppressor genes (TSGs) from numerous methylated genes. In this study, we developed a novel method to identify TSGs based on our previous findings that genes with RNA polymerase II (Pol II) in normal cells are resistant to aberrant methylation induction and that known TSGs were methylated in cancers against this general rule. First, we identified 280 methylation-sensitive genes in human breast cancers. From these genes, 14 genes methylated against the general rule (outlier genes) were isolated by analyzing Pol II binding in normal cells. Among these genes, DZIP1 was a novel TSG, and FBN2 and HOXA5 were known TSGs. These results show that TSGs can be efficiently identified by this approach.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 がん抑制遺伝子 サイレンシング マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドの DNA メチル化異常は、突然変異や染色体欠失と並び、がん抑制遺伝子不活化の主要なメカニズムである。がん細胞では、多数の遺伝子にメチル化異常がみられるが、これらのほとんどは、発がんの随伴現象であり、がん抑制遺伝子のメチル化はごく一部である。メチル化により不活化されるがん抑制遺伝子を同定する方法として、細胞を脱メチル化剤で処理した後、発現が回復する遺伝子をマイクロアレイにより探索するアプローチが従来おこなわれてきた。しかし、このアプローチでは、メチル化異常により不活化される遺伝子だけでなく、p53 の活性化により発現誘導される遺伝子など、非常に多くの遺伝子が同定される。これらの膨大な候補遺伝子の中から新規がん抑制遺伝子を同定することは極めて困難である。

DNA メチル化異常は、特定の遺伝子に誘発されやすいという性質をもつ。その機構として、RNA polymerase II が結合している遺伝子はメチル化されにくいことが明らかになっている。さらに、*RASSF1A* 及び *MLH1* などのがん抑制遺伝子はこの機構に従わないことも明らかになっている。

2. 研究の目的

本研究では、新規がん抑制遺伝子を効率的に同定するために、RNA polymerase II が結合しているにも関わらずメチル化されてしまう遺伝子 (Outlier 遺伝子) を探索する「Outlier アプローチ」を開発する。

3. 研究の方法

(1) 乳がんにおける DNA メチル化感受性遺伝子の同定

ヒト乳腺の正常細胞 2 種類 (Lot の異なる乳腺上皮細胞 HMEC) 及び乳がん細胞株 5 種類 (BT-474、MCF7、MDA-MB-231、MDA-MB-468 及び ZR-75-1) における DNA メチル化状態を、抗 5-メチルシチジン抗体を用いたメチル化 DNA 免疫沈降法及びヒト CpG アイランドマイクロアレイにより解析した。正常細胞においてメチル化されておらず、がん細胞株でのみ高頻度にメチル化され

ている遺伝子を、メチル化感受性遺伝子として同定した。

(2) Outlier 遺伝子の同定

正常細胞における RNA polymerase II 結合レベル及び H3K27 トリメチル化レベルを、クロマチン免疫沈降法及びヒト CpG アイランドマイクロアレイにて解析した。メチル化感受性遺伝子のうち、正常細胞において RNA polymerase II が結合しており、H3K27 トリメチル化が存在しない遺伝子を Outlier 遺伝子として同定した。

(3) 乳がん細胞株及び乳がん臨床検体における Outlier 遺伝子の DNA メチル化解析

同定した outlier 遺伝子について、乳腺正常上皮細胞 (HMEC)、乳がん細胞株 (BT-20、BT-474、HCC1428、HCC1937、HCC38、Hs278T、MCF7、MDA-MB-231、MDA-MB-436、MDA-MB-468、SK-BR-3、T-47D 及び ZR-75-1)、乳がん臨床検体 (40 検体) における DNA メチル化レベルをメチル化特異的 PCR 法により測定した。

(4) 細胞株の脱メチル化剤処理

乳がん細胞株 T-47D を播き (0 日目)、1 日目及び 3 日目に終濃度 20 μM の 5-アザ-2'-デオキシシチジン (5-aza-dC) を添加した。4 日目に終濃度 0.3 μM のトリコスタチン A (TSA) を添加し、5 日目に細胞を回収、遺伝子発現解析に用いた。

(5) *DZIP1* 遺伝子の機能解析

乳がん細胞株 HCC1937 及び MDA-MB-436 において、2 種類の異なる配列の shRNA を用いて *DZIP1* 遺伝子をノックダウンした。*DZIP1* 遺伝子をノックダウンした細胞株及びコントロールの細胞株 (ルシフェラーゼ遺伝子に対する shRNA を導入) を播き (0 日目)、1、2、3、4、5 及び 8 日目の細胞数を測定した。

4. 研究成果

(1) 乳がんにおける Outlier 遺伝子の同定

ヒト乳腺の正常細胞 2 種類及び乳がん細胞

株 5 種類について DNA メチル化状態をゲノム網羅的に解析した結果、がん細胞株でのみ高頻度にメチル化されている遺伝子を 280 個同定した。さらに、正常細胞における RNA polymerase II の結合状態及び H3K27 トリメチル化状態をゲノム網羅的に解析することで、正常細胞において RNA polymerase II が高レベルに結合しているにも関わらず、がん細胞株でメチル化されている Outlier 遺伝子を 14 個同定した (表 1)。

(2) Outlier 遺伝子の乳がん臨床検体における DNA メチル化

14 個の Outlier 遺伝子のうち、ヒストン遺伝子 (*HIST3H2A-HIST3H2BB*) 以外の 13 遺伝子について、正常細胞及びがん細胞株における DNA メチル化レベルを測定した。その結果、*DZIP1*、*FBN2*、*HOXA5*、*HOXC9* 及び *OSBPL3* 遺伝子において異常メチル化が認められた。次に、これら 5 個の遺伝子の乳がん臨床検体における DNA メチル化レベルを測定した結果、*DZIP1*、*FBN2*、*HOXA5* 及び *HOXC9* において異常メチル化が認められた。これらの遺伝子のうち *FBN2* 及び *HOXA5* は既にかん抑制遺伝子であることが報告されていた。したがって、Outlier 遺伝子の探索によりがん抑制遺伝子が効率的に同定できることが示された。

表1. 乳がんにおける Outlier 遺伝子

Gene symbol	Gene name
<i>DZIP1</i>	DAZ interacting protein 1
<i>FBN2</i> *	fiblin 2
<i>HAS3</i>	hyaluronan synthase 3
<i>HIST3H2A-HIST3H2BB</i>	histone cluster 3, H2a/histone cluster 3, H2bb
<i>HKR1</i>	GLI-Kruppel zinc family member
<i>HOXA5</i> *	homeobox A5
<i>HOXC9</i>	homeobox C9
<i>IRX4</i>	iroquois homeobox 4
<i>OSBPL3</i>	oxysterol binding protein-like 3
<i>PCDHGC3</i>	protocadherin gamma subfamily C, 3
<i>RNF152</i>	ring finger protein 152
<i>TNFSF9</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
<i>ZNF214-NLRP14</i>	zinc finger protein 214/NLR family, pyrin domain containing 14
<i>ZNF513</i>	zinc finger protein 513

*がん抑制遺伝子としての報告がある遺伝子。

(3) *DZIP1* 遺伝子の異常 DNA メチル化によるサイレンシング

乳がん臨床検体においても異常メチル化

されていた 4 個の遺伝子のうち *DZIP1* 遺伝子について、異常 DNA メチル化によりサイレンシングされているかどうかを調べた。乳がん細胞株 T-47D を脱メチル化剤 5-aza-dC により処理したところ、*DZIP1* 遺伝子のプロモーター CpG アイランドにおいて、DNA 脱メチル化が認められた。また、TSA を併用することにより、*DZIP1* 遺伝子の発現上昇が認められた (図 1)。このことから、*DZIP1* 遺伝子は乳がん細胞において DNA メチル化によりサイレンシングされていることが示された。

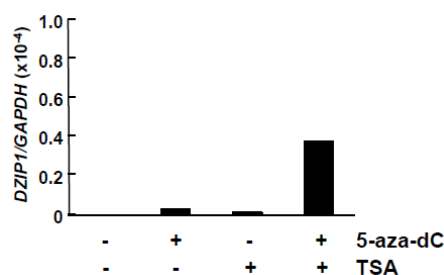


図 1. 5-aza-dC 処理による *DZIP1* 遺伝子発現回復

(4) *DZIP1* の細胞増殖能に与える影響

DZIP1 遺伝子をノックダウンした細胞株とコントロールの shRNA を導入した細胞株の増殖を比較した。その結果、コントロールの細胞株と比較して、*DZIP1* 遺伝子をノックダウンした HCC1937 細胞株では約 2 倍、MDA-MB-436 細胞株では 1.5-2 倍程度の細胞増殖の亢進が認められた (図 2)。このことから、*DZIP1* 遺伝子は乳がんにおける新規がん抑制遺伝子であることが示された。

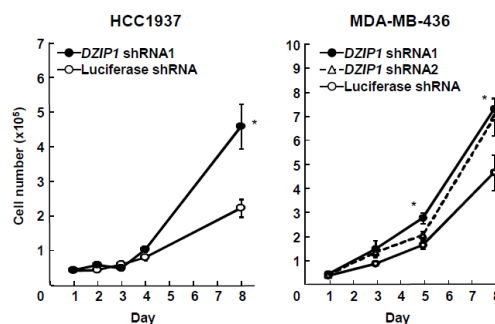


図 2. *DZIP1* ノックダウンによる細胞増殖能の亢進

本研究により、Outlier 遺伝子の探索によりがん抑制遺伝子が効率的に同定できること

が示された。また、**Outlier** アプローチを用いた新規がん抑制遺伝子の効率的な同定は、創薬・診断開発の基盤としても非常に重要である。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kikuyama, M, Takeshima, H, Kinoshita, T, Okochi-Takada, E, Wakabayashi, M, Akashi-Tanaka, S, Ogawa, T, Seto, Y and Ushijima, T. Development of a novel approach, the epigenome-based outlier approach, to identify tumor-suppressor genes silenced by aberrant DNA methylation. *Cancer Lett.*, 322, 204-212, 2012 (査読有).
- ② Takeshima, H, Yamashita, S, Shimazu, T and Ushijima, T. Effects of genome architecture and epigenetic factors on susceptibility of promoter CpG islands to aberrant DNA methylation induction. *Genomics*, 98, 182-188, 2011 (査読有).

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kikuyama, M, Takeshima, H, Kinoshita, T, Okochi-Takada, E, Wakabayashi, M, Akashi-Tanaka, S, Ogawa, T, Seto, Y and Ushijima, T. The outlier approach discriminates drivers from passengers among genes methylated in cancer. AACR annual meeting 2012, 2012 年 4 月 3 日, シカゴ (米国)
- ② 竹島秀幸, 山下聡, 島津太一 and 牛島俊和. ゲノム構造及びエピジェネティック因子は独立してメチル化異常誘発に対する感受性に影響する. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋
- ③ 菊山みずほ, 竹島秀幸, 大河内(高田)江里子, 明石(田中)定子, 木下貴之, 小川利久, 瀬戸泰之 and 牛島俊和. エピジェネティックに不活化された遺伝子の中からがん抑制遺伝子を選別する方法の開発. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日, 名古屋.
- ④ 竹島秀幸, 山下聡, 島津太一 and 牛島俊和. 繰り返し配列LINE及びSINEはDNAメチル化異常誘発に対する感受性を与える. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011年5月20日, 熊本
- ⑤ 菊山みずほ, 竹島秀幸, 大河内(高田)江里子, 小川利久, 瀬戸泰之 and 牛島俊和. エピジ

エネティックに不活化された遺伝子の中からがん抑制遺伝子を選別する方法の開発. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011年5月20日, 熊本

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹島 秀幸 (TAKESHIMA hideyuki)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号 : 40432497

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし