

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24240098

研究課題名(和文) DNA修復分子群のエピジェネティック解析と食健康

研究課題名(英文) Interaction of DNA repair epigenetics and Nutrition

研究代表者

松田 覚 (MATSUDA, Satoru)

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号：50242110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,500,000円

研究成果の概要(和文)：食物成分が遺伝子のエピジェネティックな変化を介して癌やアレルギーなど各種疾患の病態改善に寄与できる例を示した。食要因でのDNA損傷やエピジェネティックな制御が報告されているが、これら分子群遺伝子に着目し、DNA修復分子群の遺伝子発現の制御や変化がどのようなメカニズムで起こるのかをエピジェネティックな解析を加え、食環境との関わりを明らかにした。メチル化の過剰もしくは過少はいずれも発がんなどに関わることも明らかになっているが、特にがん抑制遺伝子(BRCA1・PTEN・p53など)もしくはそのプロモーターの過剰なメチル化は細胞の悪性化と関連があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Because p53 plays an important role in the transcriptional regulation of genes encoding proteins involved in DNA repair and apoptosis, the modification of p53 may appear to be a pivotal determinant of cells fate. During carcinogenic progression, p53 is mutated or deleted in nearly half of all human cancers and fails to function normally. Both PTEN and BRCA1 also regulate the expression of several genes identified as key roles in affecting breast and ovarian cancer risk. They also participate in DNA repair and recombination processes related to maintenance of genomic integrity and control of cell proliferation. Genetic defects in DNA repair and DNA damage response genes often lead to an increase in cancer incidence. The role of defects is also associated with modulation of signaling pathways. Furthermore, mutations or epigenetic silencing in DNA repair genes have been associated with a phenotype of sensitivity of cancers to the therapy.

研究分野：分子食医化学

キーワード：エピジェネティック解析 細胞内シグナル伝達 DNA損傷 DNA修復遺伝子 癌細胞

1. 研究開始当初の背景

紫外線や放射線あるいは発がん物質などによる DNA 損傷は、遺伝子変化や染色体異常の引き金になる。これらの蓄積は老化や発がんに関係していることが、DNA 修復分子の機能解析によって明らかになっている。通常は損傷した DNA は DNA 修復分子群によって補修されるが、そのメカニズムは複雑でまだ完全には解明されていない。国内外における研究成果から DNA 修復機構には ATM, BRCA1, p53 などのような分子群が関与している。また、食要因での DNA 損傷やエピジェネティックな制御が報告されている。本研究ではこれら分子群遺伝子に着目し、DNA 修復分子群の遺伝子発現の制御や変化がどのようなメカニズムで起こるのかをエピジェネティックな解析を加えていくと共に、環境要因とりわけ食環境との関わりを解明して、食健康の増進に資することが目的である。エピジェネティックな変異が DNA 修復分子群 (特に ATM・WRN・BRCA1・Rad51・p53 など) に起こると、ゲノムの正確性維持が損なわれることが多数報告されている。そして DNA メチル化は遺伝子発現制御や DNA 修復系において重要な役割を果たすため、これらの遺伝子を、本エピジェネティック解析のコアに据えて研究を進める。メチル化の過剰もしくは過少はいずれも発がんに関わることも明らかになっているが、特にがん抑制遺伝子もしくはそのプロモーターの過剰なメチル化は予後不良と相関している。既に発がんに関わる 1000 近い遺伝子がエピジェネティックな制御を受けていることが確認されており、エピジェネティックな変異をもたらず機構の制御は新たな発がん抑制法として注目されている。RNA 干渉を用いた DNA 修復分子群のノックダウンも DNA 修復機構の解明の有用な解析手段と考えていた。

2. 研究の目的

DNA 修復分子群の機能解析と遺伝子発現をエピジェネティックな視点からアプローチする。遺伝子発現調節には食成分が細胞内受容体を介して機能していることが判明しているため、本研究では、各種標的細胞からどのような遺伝子発現誘導を引き起こすのか、DNA 修復分子群の mRNA の発現を重点的に調べる。また DNA 修復分子群の遺伝子が関与するエピジェネティックな変化の引き金となる要因を解明する。さらに、サイトカインやマイクロ RNA の誘導を解析し

て、細胞の健康増進 (発がん抑制やアンチエイジング) にどのように働くのかを分子生物学的に探究する。研究期間内に達成させる具体的方向性として、

- リンパ球などの免疫培養細胞および肝培養細胞や皮膚上皮培養細胞において cDNA ライブラリーを構築し、環境要因による発現調節が起こりうる遺伝子を DNA チップやリアルタイム PCR 法によりスクリーニングする。DNA 修復分子群の遺伝子の転写調節機構を明らかにする。
- DNA 修復分子群が発現する細胞において、それらを RNA 干渉誘導によりノックダウンし、その際に生じる細胞機能の変化を明らかにし、細胞内情報伝達系から DNA 修復機構に至る作用メカニズムを明らかにする。
- DNA 修復分子群の遺伝子が関与する DNA メチル化やマイクロ RNA 発現そしてヒストン修飾などのエピジェネティック制御機構を明らかにする。
- 老化や発がんに関連する遺伝子産物の DNA 修復系において果たす役割と意義を解明する。
- 細胞老化のメカニズム解明のため、細胞間相互作用に関わるタンパク質の役割と DNA 修復分子群とがどのように関連して細胞老化を制御するのかを明らかにする。

エピジェネティックな変化は遺伝子変化と異なり可逆的であるため、エピジェネティックな変化がもたらした病的な状態は回復できる可能性がある。このため、DNA 修復分子群の変化がもたらす老化や発がんのリスクを低減するための有効かつ効果的な方法が浮上してくる。既に脱メチル化剤は抗がん剤として成功している。転写因子受容体が刺激されると細胞核内の遺伝子発現調節系が活動し、種々の遺伝子発現が調節される。特定の食品成分刺激がもたらす遺伝子発現解析することにより、新たな食品の機能が明らかになる。しかし、この研究と応用を扱う上でネックになるのは、遺伝子発現のタイムコースの複雑さと RNA・タンパク質の脆弱性である。そこで本研究では研究期間を 5 年に設定しながらも、これまでに明らかになった DNA 修復機構に関連する遺伝子に標的を定め、それぞれの遺伝子一つひとつについて綿密なスクリーニングを行う。これらによって標的細胞での作用点の明確化が期待できることが、一般的な生化学研究と比し独創的な点である。老化や発がんは、高齢化社会を迎えた現代日本人すべての重大な関心事である。これ

らは互いに類似した病態機構を示しており、免疫システムの関与も大きい。本研究の実りある成果が、タンパク質機能の新たな理解と疾病への対策を生み出す。

自然界には紫外線や放射線など DNA 損傷の原因が存在しており、生物は進化によってそれらから遺伝子を防御するために DNA 修復機構も進化させてきた。世界中で経験的に薬味や調味料として用いられてきたハーブ・香辛料・漢方薬などの大部分は安全な食品であるが、健康増進効果の科学的なアプローチは不十分であった。本研究ではこうした健康食品の作用メカニズムを DNA 修復機構の点から分子生物学的に解析し、食生活レベルでの新しい健康増進効果を切り開く実用的な試みでもある。食成分がサイトカインやがん抑制遺伝子そして DNA 修復分子群などの遺伝子発現を介して、免疫系やがん抑制そして老化防止を機能的に調節していることが明らかになってきている。この目的で、ハーブ・香辛料・漢方薬によって起こるエピジェネティック修飾や遺伝子発現解析そしてマイクロ RNA の解析は斬新であり、細胞生物学的にも未知の知見をもたらす可能性が高い。本研究によって食品によるヒト健康に有意義な作用を論理的かつ客観的に発見できると考えられる。日本は現在、原発事故による広範囲での放射線障害の危惧が為されているが、放射線による身体的影響軽減の具体策は除染以外にほとんど見出されていない。本研究成果は、DNA 修復機構を明らかにして、放射線・紫外線など DNA 損傷による身体的影響を軽減させる具体策に結びつく可能性も持つと考えた。

3. 研究の方法

DNA 修復分子群の発現調節に関する基礎研究として DNA 修復分子群の遺伝子を準備する。ヒト培養細胞の cDNA ライブラリーから ATM・WRN・Rad51 の遺伝子全長をクローニングした後、GST や His タグなどとの融合蛋白質を作製・精製する。また、これら分子の細胞内シグナル伝達系にかかわると考えられるアダプター蛋白質を同定して、上皮細胞やリンパ球においてその機能を探求する。これまでのマイクロ RNA や RNA 干渉の研究成果を踏まえ、紫外線や活性酸素刺激におけるマイクロ RNA の単離と塩基配列決定のための予備実験を行う。次に ATM・WRN・BRCA1・p53 などの遺伝子発現がどのように変化するかを、培養細胞系お

よびラットもしくはマウス組織において検討する。構造化顕微鏡で、特異抗体による蛍光細胞染色によって DNA 修復分子のミトコンドリア内局在を確認すると共に、成長因子やインスリンそしてカルシウム負荷における挙動変化を、GFP 融合蛋白質を導入したライブセルで調べる。誘導されるマイクロ RNA を解析して、DNA 修復分子発現との関わりを追及する。解析手法としてウエスタンブロットティングや蛍光組織染色そして *in situ* ハイブリダイズを用い、細胞内分子のリン酸化・メチル化・アセチル化動態を解析する。さらに遺伝子産物量の解析や DNA 損傷時のアポトーシス状態の推移を詳しく解析する。用いる細胞としては Jurkat 細胞や HEK293 細胞の他、U937 や MKN7 など各種サイトカインや DNA 修復分子群の遺伝子発現が検出可能な細胞で予備実験を行い、ラットもしくはマウスを用いて *in vivo* での組織発現についても検討を加える。

DNA 修復分子群のエピジェネティック解析として、DNA 修復分子群の遺伝子特異的なメチル化を解析するために、メチル化特異的 PCR (MSP) や亜硫酸ゲノムシーケンス PCR などの方法で、ATM・WRN・BRCA1・p53・Rad51 などの遺伝子変化を解析する。また、未知のメチル化ホットスポットやメチル化 CpG アイランドを同定するために、制限酵素ランドマークゲノムスキャン (RLGS) や CpG アイランドマイクロアレイによる解析も行う。また、クロマチン修飾を解析するために、クロマチン免疫沈降 (ChIP) によって、生細胞の刺激からクロマチン修飾に関与する遺伝子として、ATM・WRN・BRCA1・p53 などの遺伝子を標的として ChIP - PCR もしくはマイクロアレイで解析を進める。生細胞の刺激には、紫外線・活性酸素の他、種々の食成分による影響も検討する。この場合、種々の細胞刺激によってゲノム全体のメチル化状態(網羅的メチル化解析)も、メチル基受容体アッセイやメチル化 DNA の ELISA 法を用いて測定する。さらに、メチル化以外の修飾(アセチル化やリン酸化)の状態についても、特定の分子や遺伝子については解析する。修飾が確認された DNA 修復分子遺伝子はその塩基部位を決定して、生理作用を明らかにする。ATM や Rad51 の遺伝子発現が食成分刺激によって変化しうることを示す。ATM や Rad51 は DNA 修復に関与するほか、発がんや転移などにも関係している。この ATM のリン酸化や蛋白質発

現に脂溶性ビタミンやイソフラボンなど食成分刺激によって変化しうることを示す。分子間相互作用測定装置で関連する分子の結合状況を調べる。この転写調節系がどのようなメカニズムによるものなのかを解析する。特に PPAR の関与について、阻害剤などを用い、食物に含まれるポリフェノールからアプローチする。WRN・BRCA1・p53 などの遺伝子発現においても同様に解析を進めた。

4. 研究成果

これまでに紫外線や活性酸素刺激のほか特定の食物成分によって、特に発がんに関連する mRNA がどのように変化するかを網羅的に検討した。さらにリアルタイム PCR を用いて検討し、誘導される RNA を解析して DNA 修復機構との関わりを検証した。その結果、これまでに検討してきた Rad51 などに加え、NOS1 や NOS2、NANOS や Asporin が食成分刺激によって遺伝子発現が変化しうることを示した。例えば、K562 細胞、Daudi 細胞において、D-セリン刺激によるタンパク質レベルでの Asporin 発現量の変動を確認した。K562 細胞においては 48 時間後に、Daudi 細胞においては刺激後 47 時間後に最も Asporin 発現量が上昇していた。一方、Asporin の mRNA 発現量は刺激後 24 時間においては、K562 細胞、Daudi 細胞ともに減少が認められた。また、K562 細胞においてはカルシウムイオン添加時に Asporin の発現量の増加が顕著であった。このほか PAI-1、t-PA、Smad2、Smad3 も D-セリン刺激のカルシウム添加によるエピジェネティックな機序により発現が変動していた。これらの結果より、D-セリンおよびカルシウムはがん抑制に関与するシグナル伝達系分子の増減を介してがん細胞の増殖に影響を与える可能性が示唆された。一方タンパク質レベルでの Tob1 発現量は、K562 細胞においてはカルシウムイオン非添加時に上昇した。反対に Daudi 細胞においてはカルシウムイオン添加時に上昇した。Tob1 の mRNA 発現量は K562 細胞、Daudi 細胞ともにカルシウムイオン添加時に大幅に上昇した。その他にも、L 型アミノ酸やハーブなどの食物成分がエピジェネティックな変化を介して発がんなど各種疾患の病態に寄与することについてマイクロアレイを用いて検討し、種々の分子リン酸化や蛋白質発現が、アミノ酸のほか脂溶性ビタミンやイソフラボンなど食成分刺激によって変化し

うることを明らかにした。特に DNA 修復系分子の mRNA がどのように変化するかを網羅的に検討した。さらにリアルタイム PCR を用いて検討し、誘導される RNA を解析して DNA 修復機構との関わりを検証した。その結果、これまでに検討してきた ATM や Rad51 の遺伝子発現に加え、NOS1 や NOS2 が食成分刺激によって変化しうることを示した。食物に含まれる L 型アミノ酸やポリフェノールからもアプローチして、Tob や p38MAPK などの遺伝子発現においても同様に解析を進めた。L 型アミノ酸やハーブなどの食物成分が遺伝子のエピジェネティックな変化を介して癌やアレルギーなど各種疾患の病態改善に寄与できることについてマイクロアレイを用いて検討し、種々の分子リン酸化や蛋白質発現が L 型アミノ酸や脂溶性ビタミンやイソフラボンなど食成分刺激によって変化しうることを明らかにした。これらのシグナル伝達における PPAR の関与についても検討した。また、これら分子の細胞内シグナル伝達系にかかわると考えられるアダプター蛋白質 NESH や Nesca に着目して、上皮細胞やリンパ球においてその機能を探求した。これまでのマイクロ RNA や RNA 干渉の研究成果を踏まえ、紫外線や活性酸素刺激におけるマイクロ RNA の単離を行った。次に ATM・WRN・BRCA1・p53 などの遺伝子発現がどのように変化するかを、培養細胞系およびラットもしくはマウス組織においてマイクロアレイを用いて検討した。成長因子やインスリンそしてカルシウム負荷におけるアダプター分子の挙動変化を、GFP 融合蛋白質を導入したライプセルで調べた。ハーブなどの食物成分が遺伝子のエピジェネティックな変化を介して癌やアレルギーなど各種疾患の病態改善に寄与できる可能性をまとめた。

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 27 件)

1. Matsuda S, Ichimura M, Ogino M, Nakano N, Minami A, Murai T, Kitagishi Y. Effective PI3K modulators for improved therapy against malignant tumors and for neuroprotection of brain damage after tumor therapy. *Int J Oncol*. 49:1785-1790, 2016 doi: 10.3892/ijo.2016.3710.
2. Ogino M, Ichimura M, Nakano N, Minami A,

- Kitagishi Y, **Matsuda S**. Roles of PTEN with DNA Repair in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 17:954, 2016 doi: 10.3390/ijms17060954.
3. Ichimura M, Minami A, Nakano N, Kitagishi Y, Murai T, **Matsuda S**. Cigarette smoke may be an exacerbation factor in nonalcoholic fatty liver disease via the modulation for PI3K/AKT pathway. *AIMS Mol Sci*, 2: 427-439, 2015
4. Minami A, Murai T, Nakanishi A, Kitagishi Y, Ichimura M, **Matsuda S**. Cell cycle regulation via the p53, PTEN, and BRCA1 tumor suppressors. *InTech Carcinogenesis in Human*, 2 : 53-66, 2015
5. Minami A, Murai T, Nakanishi A, Kitagishi Y, **Matsuda S**. Roles of PTEN/PI3K/AKT/GSK3 β Pathway in Neuron Signaling involved in Autism. *Brain Disorders & Therapy*, 4:165, 2015
6. Kitagishi Y, Minami A, Nakanishi A, Ogura Y, **Matsuda S**. Neuron membrane trafficking and protein kinases involved in autism and ADHD. *Int J Mol Sci*. 16:3095-3115, 2015 doi: 10.3390/ijms16023095.
7. Nakanishi A, Minami A, Kitagishi Y, Ogura Y, **Matsuda S**. BRCA1 and p53 tumor suppressor molecules in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 16:2879-2892, 2015. doi: 10.3390/ijms16022879.
8. **Matsuda S**, Nakanishi A, Minami A, Wada Y, Kitagishi Y. Functions and characteristics of PINK1 and Parkin in cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 20:491-501, 2015.
9. Kitagishi Y, Nakanishi A, Minami A, Asai Y, Yasui M, Iwaizako A, Suzuki M, Ono Y, Ogura Y, **Matsuda S**. Certain diet and lifestyle may contribute to islet β -cells protection in type-2 diabetes via the modulation of cellular PI3K/AKT pathway. *Open Biochem*. 8:74-82, 2014. doi: 10.2174/1874091X01408010074.
10. Suzuki M, Minami A, Nakanishi A, Kobayashi K, **Matsuda S**, Ogura Y, Kitagishi Y. Atherosclerosis and tumor suppressor molecules. *Int J Mol Med*. 34(4):934-940, 2014. doi: 10.3892/ijmm.2014.1866.
11. Kitagishi Y, Nakanishi A, Ogura Y, **Matsuda S**. Dietary regulation of PI3K/AKT/GSK-3 β pathway in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 6(3):35, 2014. doi: 10.1186/alzrt265.
12. Nakanishi A, Wada Y, Kitagishi Y, **Matsuda S**. Link between PI3K/AKT/PTEN Pathway and NOX Proteinin Diseases. *Aging Dis*. 5(3):203-211, 2014. doi: 10.14336/AD.2014.0500203.
13. Nakanishi A, Kitagishi Y, Ogura Y, **Matsuda S**. The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer. *Int J Oncol*. 44(6):1813-1819, 2014. doi: 10.3892/ijo.2014.2377.
14. Tokuhira N, Kitagishi Y, Suzuki M, Minami A, Nakanishi A, Ono Y, Kobayashi K, **Matsuda S**, Ogura Y. PI3K/AKT/PTEN pathway as a target for Crohn's disease therapy. *IJMM*, 35(1):10-16, 2014. doi: 10.3892/ijmm.2014.1981.
15. Minami A, Nakanishi A, **Matsuda S**, Kitagishi Y, Ogura Y. Function of alpha-Synuclein and PINK1 in Lewy Body Dementia. *IJMM*, 35(1):3-9, 2014. doi: 10.3892/ijmm.2014.1980.
16. Minami A, Nakanishi A, Ogura Y, Kitagishi Y, **Matsuda S**. Connection between tumor suppressor BRCA1 and PTEN in damaged DNA repair. *Frontiers Oncol*. 4:318. 2014. doi: 10.3389/fonc.2014.00318.
17. **Matsuda S**, Nakanishi A, Wada Y, Kitagishi Y. Roles of PI3K/AKT/PTEN Pathway as a Target for Pharmaceutical Therapy. *Open Med Chem J*. 2013 7:23-9.
18. Kitagishi Y, **Matsuda S**. Diets involved in PPAR and PI3K/AKT/PTEN pathway may contribute to neuroprotection in a traumatic brain injury. *Alzheimers Res Ther*. 2013 5(5):42. doi: 10.1186/alzrt208.
19. Kitagishi Y, **Matsuda S**. RUFY, Rab and Rap Family Proteins Involved in a Regulation of Cell Polarity and Membrane Trafficking. *Int J Mol Sci*. 14(3):6487-6498, 2013. doi: 10.3390/ijms14036487.
20. Kitagishi Y, Kobayashi M, **Matsuda S**. Defective DNA repair systems and the development of breast and prostate cancer. *Int J Oncol*. 42(1):29-34, 2013. doi: 10.3892/ijo.2012.1696.
21. Kitagishi Y, **Matsuda S**. Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cancer and aging. *Int J Mol Med*. 31(3):511-5, 2013. doi: 10.3892/ijmm.2013.1235.
22. **Matsuda S**, Kitagishi Y, Kobayashi M. Function and characteristics of PINK1 in mitochondria. *Oxid Med Cell Longev*. 2013:601587, 2013.

23. **Matsuda S**, Kobayashi M, Kitagishi Y.
Expression and Function of PPARs in Placenta.
PPAR Res. 2013:256508, 2013. doi:
10.1155/2013/256508.

24. **Matsuda S**, Kobayashi M, Kitagishi Y.
Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell
Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.
ISRN Endocrinol. 2013:472432, 2013. doi:
10.1155/2013/472432.

25. Kitagishi Y, Kobayashi M, Kikuta K,
Matsuda S. Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR
Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses.
Depress Res Treat. 2012:752563, 2012. doi:
10.1155/2012/752563.

26. Kitagishi Y, Kobayashi M, **Matsuda S**.
Protection against Cancer with Medicinal
Herbs via Activation of Tumor Suppressor. J
Oncol. 2012:236530, 2012. doi:
10.1155/2012/236530.

27. Kitagishi Y, Kobayashi M, Yamashina Y,
Matsuda S. Elucidating the regulation of T
cell subsets. Int J Mol Med. 30(6):1255-60,
2012. doi: 10.3892/ijmm.2012.1152.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 中西温子、**松田覚** 「酸化ストレスによる破骨細胞形成の亢進」第 70 回 日本栄養食糧学会大会、神戸、2016 年 5 月 14 日

2. 南明里、中野紀子、市村真祐子、**松田覚**
「食品成分の破骨細胞分化への影響」第 70
回 日本栄養食糧学会大会、神戸、2016 年
5 月 15 日

3. 南明里、中野紀子、**松田覚** 「ブルーベ
リー成分およびその代謝産物が破骨細胞形
成に与える影響」第 88 回日本生化学会大会、
神戸、2015 年 12 月 1 日

4. 北岸靖子、**松田覚** 「食品成分刺激による
細胞内リン酸化蛋白質の変化」日本家政学
会第 65 回大会、東京、2013 年 5 月 18 日

5. 菊田香苗、通山由美、松川聡子、**松田覚**、
赤桐里美、植野洋志 「ヒト白血球とその培
養細胞におけるグルタミン酸デカルボキシ
ラーゼに関する研究」日本生化学会大会
第 85 回、福岡、2012 年 12 月 16 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 覚 (MATSUDA SATORU)

奈良女子大学・研究院生活環境科学系・教授
研究者番号：50242110