

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580460

研究課題名(和文) ヒストン修飾酵素異常を基軸としたリンパ腫発生機構の解析と新規治療戦略の検討

研究課題名(英文) Analysis of the epigenetic changes in canine lymphoma cells

研究代表者

奥田 優 (OKUDA, Masaru)

山口大学・獣医学部・教授

研究者番号：10325243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：犬リンパ腫細胞株を用いたHAT活性およびHDAC活性の解析，WBによるアセチル化ヒストンならびにCREBBP/EP300の解析，CREBBP/EP300のmRNA発現解析の結果から，犬リンパ腫ではH3K18Ac/27Acのアセチル化をWestern Blot法を用いて解析し，アセチル化の低下が確認された場合にCREBBP/EP300の遺伝子ならびに蛋白解析を行うことが有用である可能性が示唆された。また，犬リンパ腫においても，MGMTがニトロソウレア系抗癌剤Iomustineの耐性に関与している可能性が強く示唆されたが，本研究ではその発現を調節するメチル化領域を明らかにすることは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：To improve the treatment of the canine lymphoma patients, we focused on the epigenetic changes of the canine lymphoma cells. Our first study suggests that the detection of H3K18Ac/27Ac by the western blotting may be an appropriate method for the detection of the acetylation status in canine lymphoma cells, and if it presents, the mRNA and protein analysis of CREBBP/EP300 should be explored.

In the second study, we showed that MGMT was strongly correlated with the resistance of canine lymphoma cell lines to an anti-cancer agent, lomustine. Moreover, we show that there were two types of lymphoma cells; ones that possess the MGMT activity and show low sensitivity to lomustine, and others that do not possess the MGMT activity and show high sensitivity to lomustine. However, the canine lymphoma cell lines did not show significant correlation between the methylation status and the MGMT suppression levels.

研究分野：獣医内科学

キーワード：リンパ腫 犬 エピジェネティック メチル化 アセチル化 抗癌剤

1. 研究開始当初の背景

リンパ腫は犬において最も発生頻度の高い悪性腫瘍の一つであり、臨床上大きな問題となっている。抗癌剤を用いた多剤併用化学療法によって、比較的治療成績の良い多中心型 B 細胞性リンパ腫であっても平均生存期間は 1 年強と決して満足のいくものではない。その背景として犬リンパ腫発生の分子機構に関してほとんど明らかになっていないこと、抗癌剤耐性が生じることが主な要因であると考えられる。

ヒトにおいても、犬の B 細胞性リンパ腫に組織学的に非常に類似するびまん性大細胞性 B 細胞性リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) が大きな問題となっている。2011 年 3 月と 8 月に *Nature* 誌にヒトの DLBCL に Histone acetyltransferase (HAT) ならびに Histone methyltransferase (HMT) をコードする遺伝子 (CREBBP, EP300, MLL2) の異常が相次いで報告された。HAT ならびに HMT はヒストンをそれぞれアセチル化ならびにメチル化することで遺伝子の転写を制御する。

一方、ニトロソウレア系抗癌剤である lomustine は多剤耐性を示すリンパ腫に対するレスキュー療法として使用される有用な薬剤である。しかし、lomustine も複数回の投与により腫瘍細胞の lomustine に対する反応性の低下が経験される。近年、人医領域ではニトロソウレア系抗癌剤の薬剤耐性機構の原因の一つとして Methylguanine - DNA Methyltransferase (MGMT) の働きが明らかとなった。MGMT は抗癌剤によってアルキル化されたグアニンを修復する DNA 修復酵素であり、ヒトでは MGMT Exon1 近傍の CpG アイランド (プロモーター領域) のメチル化により MGMT 蛋白の発現が抑制されていると報告されている。

以上のように、リンパ腫の発生や抗癌剤耐性のいずれにもゲノム DNA のエピジェネティックな変化が重要である可能性があり、本研究はこれらの点に着目して企画された。

2. 研究の目的

本研究は、ヒストン修飾酵素の異常またはプロモーター領域のメチル化というエピジェネティック的観点から犬リンパ腫の腫瘍発生の分子機構を明らかとすること、犬リンパ腫治療における抗癌剤耐性機構を解析することを目的とする。

3. 研究の方法と結果

(1) 犬リンパ腫培養細胞を用いたヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) 異常解析系の検討

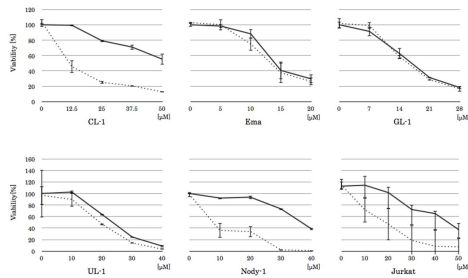
犬リンパ腫細胞株 (GL-1, CL-1, UL-1, Ema, Nody-1, CLGL-90, CLBL-1, 17-71) の核蛋白抽出物を用いて HAT 活性測定キットによる解析を行った。その結果、Ema において HAT 活性の顕著な低下が認められたため、

CREBBP/EP300 の異常が起こっている可能性を疑い、CREBBP/EP300 が特異的にアセチル化しているとされるヒストン H3K18Ac/K27Ac について Western Blot 解析を行った。しかしながら、Ema を含む全ての細胞株で両リジン残基のアセチル化が認められ、CREBBP/EP300 に特異的な HAT 活性には細胞株間で大きな差がないことが示唆された。次に、各細胞株の CREBBP/EP300 の蛋白発現量を Western Blot 法で、mRNA 発現量を Real-time PCR 法を用いて解析したが、細胞株間で大きな差異は認められなかった。さらに CREBBP 遺伝子変異の有無についても cDNA Sequence 解析を行い検討したが、アミノ酸変異を伴う遺伝子異常は認められなかった。一方、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の活性増加は、ヒストンおよび非ヒストン蛋白を低アセチル化状態にし、腫瘍形成に関わっていると考えられている。そこで、犬リンパ腫における HDAC 活性の影響を検討するため、各細胞株の核蛋白抽出物を用いて HDAC 活性測定キットによる解析も合わせて行ったが、低アセチル化を起こすほどの顕著な活性増加は認められなかった。また、HDAC 活性を有する蛋白をコードする EID1 遺伝子、EID2B 遺伝子、SIRT7 遺伝子の mRNA 発現量についても顕著な増加は認められなかった。以上の結果から、HAT 活性測定キットによる活性の低下が認められた Ema については、CREBBP/EP300 以外の HAT 活性を有する蛋白 (例えば pCAF/GCN5 など) の活性異常の存在が疑われ、*in vitro* における HAT 活性測定キットによる解析では、CREBBP/EP300 が有する HAT 活性の影響が反映されていない可能性が示唆された。

	全体の HAT 活性	H3K18Ac/27Ac	蛋白発現	遺伝子発現	遺伝子配列	HDAC 活性
GL-1	None	None	None	None	None	None
CL-1	None	None	None	None	None	None
UL-1	None	None	None	None	None	None
Nody-1	None	None	None	None	None	None
Ema	低下	None	None	None	None	None
CLGL-90	None	None	None	None	None	None
CLBL-1	None	None	None	None	None	None
17-71	None	None	None	None	None	None

(2) 犬リンパ腫におけるニトロソウレア系抗癌剤耐性に及ぼす Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) の影響

はじめに各濃度の lomustine の細胞毒性効果とその効果がメチル化阻害薬であるベンジルグアニン (BG) 添加の有無によって影響を受けるか検討したところ、CL-1 および Nody-1 では、Ema, GL-1, UL-1 に比較して BG 無添加における lomustine による細胞毒性効果が低い傾向を示した。一方、BG を添加した場合は 5 細胞株間の lomustine 50% 阻害濃度 (IC₅₀) にこのような傾向は認められなかった。



次に蛍光オリゴヌクレオチド法を用いて MGMT 活性を調べたところ、CL-1 および Nody-1 は MGMT 活性を有することが明らかとなったが、Ema, GL-1, UL-1 では MGMT 活性を検出することができなかった。さらに、Real-time PCR 法を用いて MGMT の mRNA 発現量を測定したところ、CL-1, Nody-1, UL-1 の順に mRNA を発現しており、Ema, GL-1 においては全く MGMT の mRNA を発現していないことが明らかとなった。また、Ema, GL-1 についてはメチル化阻害薬添加により MGMT 遺伝子発現が認められるようになった。

最後に MGMT 遺伝子 Exon 1 の上流約 10,000bp ~ 下流約 7,000bp を対象とした CpG アイランドの検索を行い、Exon 1 の上流約 10,000bp の領域に 4 つの CpG アイランドが存在することを明らかとした。さらに、前述の犬リンパ系腫瘍細胞株と健常犬の PBMC を用い、これらの CpG アイランドについて Bisulfite シークエンス法による CpG のメチル化解析を行った。しかしながら、いずれの領域においても CpG のメチル化による MGMT 遺伝子の発現抑制という本研究の仮説との一致は認められず、今回の解析では犬 MGMT 遺伝子の発現に重要な CpG アイランドメチル化部位の特定は出来なかった。

4. 研究成果

(1) 犬リンパ腫培養細胞を用いたヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) 異常解析系の検討

本研究の結果から、臨床サンプルを用いた CREBBP/EP300 異常の解析を行う際には、CREBBP/EP300 が有する HAT 活性を反映する H3K18Ac/27Ac のアセチル化を Western Blot 法を用いて解析し、アセチル化の低下が確認された場合に CREBBP/EP300 の遺伝子ならびに蛋白解析を行うことを提案する。今後、この HAT 異常解析系を用いた更なる研究、HDAC 阻害剤を用いた研究により、CREBBP および EP300 の異常と犬リンパ腫の発症メカニズムの関わりを解明し、犬リンパ腫症例に対する HDAC 阻害剤の有効性を検討することが期待される。

(2) 犬リンパ腫におけるニトロソウレア系抗癌剤耐性に及ぼす Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) の影響

犬リンパ腫細胞株においても、MGMT がニトロソウレア系抗癌剤 lomustine の耐性に関与している可能性が強く示唆された。さらに、犬リンパ腫細胞には MGMT 活性を有し、lomustine に対する感受性が低い細胞と、MGMT 活性を有さず、lomustine に対する感受性が高い細胞が存在する可能性が示唆された。しかしながら、今回解析した犬 MGMT 遺伝子の Exon1 の上流約 10,000bp ~ 下流約 7,000bp の領域には犬 MGMT 遺伝子の発現調節に関わるメチル化領域が存在する可能性は低いものと考えられた。今後、犬 MGMT 遺伝子発現調節に関わるメチル化領域の特定がなされれば、事前のメチル化の解析によりニトロソウレア系抗癌剤の効果予測につながると思われる。その臨床的有用性は非常に高いことから更なる解析が期待される。

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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kambayashi S, Minami K, Ogawa Y, Hamaji T, Hwang CC, Igase M, Hiraoka H, Shimokawa Miyama T, Noguchi S, Baba K, Mizuno T, Okuda M. O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase expression causes lomustine resistance in canine lymphoma cells. Canadian Journal of Veterinary Research, 査読有, 79, 2015, 印刷中.

Okawa T, Hiraoka H, Wada Y, Baba K, Itamoto K, Mizuno T, Okuda M. Development of high-grade B-cell lymphoma concurrent with T-cell chronic lymphocytic leukemia in a dog. Journal of Veterinary Medical Science, 査読有, 74 (5), 2012, 677-680.

〔学会発表〕(計 2 件)

Kambayashi S, Hamaji T, Igase M, Mizuno T, Okuda M. Role of Hypoxia Inducible Factor (HIF) -1a in a canine lymphoma. The 3rd Asian Meeting of Animal Medicine Specialties, Dec. 14th, 2013, Bogor, (Indonesia).

上林 聡之, 浜地 雄大, 伊賀 瀬雅也, 馬場 健司, 水野 拓也, 奥田 優. 犬リンパ腫における低酸素誘導因子 1a (HIF-1a) の解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 9 月 21 日, 2013, 岐阜大学 (岐阜市).

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 優 (OKUDA, Masaru)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：10325243