

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 11 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590450

研究課題名(和文) ヒストンリジン残基修飾による新たなエピジェネティクスの研究

研究課題名(英文) Novel epigenetic change by histone lysine carboxymethylation

研究代表者

藤井 澄 (Fujii, Kiyomu)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60284189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病環境で形成されるヒストン・リジン・カルボキシメチル化(HL-CM)を検出し、ヒストン・アセチル化、プロモーターDNAメチル化および遺伝子発現を比較検討することで、HL-CMの遺伝子発現エピジェネティクスへの影響を検討した。その結果、糖尿病に伴う高糖濃度・酸化亢進状態では、HL-CMが生じ、ヒストン・アセチル化に影響を与えることが考えられた。また、メトホルミンは、HL-CMによる遺伝子発現抑制を予防する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The influence of histone lysine carboxymethylation (HL-CM), which is occurred in diabetic condition, was examined by detection of HL-CM to be compared with histone acetylation, the promoter DNA methylation and p16 gene expression. The hyperglycemic-oxidative conditions associated with diabetes mellitus induced HL-CM, which was considered to affect histone acetylation. Metformin showed the possibility of preventing gene silencing by HL-the CM.

研究分野：人体病理

キーワード：糖尿病 リジン・カルボキシメチル化 ヒストン・アセチル化 DNAメチル化 糖化

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病において、終末糖化産物とその合併症の原因として注目を受けている。その機序は主に異常な糖化修飾を受けたタンパクの蓄積による酵素機能異常・代謝異常および終末糖化産物から発生する酸化ストレスにあるとされている。本研究では、糖化修飾によるエピジェネティック変化による遺伝子発現異常が糖尿病の発生進展に何らかの役割を果たしているとの仮定から検討を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、糖尿病における高糖濃度・酸化ストレスにより H4 ヒストンのリジン残基に生じるカルボキシメチル化が、H4 ヒストン・リジン残基のアセチル化を阻害し、遺伝子発現を抑制する新規なエピジェネティック変化であると考え、H4 ヒストン・リジン残基のカルボキシメチル化の疾病病因としての意義を解明するとともに、リジン残基・カルボキシメチル化を解除し遺伝子異常を回復する治療方法につながる知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

ヒト膀胱癌細胞株を用いて、膀胱癌で高率にプロモーターDNA メチル化による遺伝子発現のサイレンシングが見られる p16 遺伝子を標的として、H4 ヒストン K9 リジン残基カルボキシメチル化抗体によりヒストン・リジン・カルボキシリジン化を検出、ヒストン・リジン・アセチル化、プロモーターDNA メチル化および遺伝子発現を比較検討し、ヒストン・リジン・カルボキシリジン化の遺伝子発現のエピジェネティクスへの影響を検討した。

### 4. 研究成果

膀胱癌では、p16 は高度の DNA メチル化によりサイレンシングされている。まず、ヒト膀胱癌細胞株 T24 を用いて糖化中間産物であり強力な酸化作用を有するグリオキサールの H4 ヒストンの DNA メチル化への影響を検討した。グリオキサール処理により、p16 遺伝子に結合する H4 ヒストンの K9 リジン残基のカルボキシメチル化をクロマチン免疫沈降法により検討した。その結果、グリオキサール処理により H4 ヒストン K9 リジン残基のカルボキシメチル化は増加していたのに対し、K9 リジン残基のアセチル化は減少していた。このときの p16 mRNA 発現を検討したが発現変化は認められなかった。さらに、p16 遺伝子の promoter 領域の CpG island のメチル化を検討すると、メチル化レベルに変化は認められなかった。

一方、p16 遺伝子の promoter メチル化レベルが T24 よりも低い UMUC を用い同様の検討を行うと、グリオキサール処理により H4 ヒストン K9 リジン残基のカルボキシメチル化は増加し K9 リジン残基のアセチル化は減

少していたが、p16 遺伝子 promoter メチル化レベルは低下し、p16 mRNA 発現は増加していた。

メトホルミンは、糖化抑制作用を有することが知られるため、H4 ヒストン K9 リジン残基のカルボキシメチル化に対して抑制的に作用することが考えられた。このため、UMUC 細胞を用いて、高糖濃度環境とメトホルミンを処理する系を用いて検討を行った。

まず、UMUC 細胞を高糖濃度環境で持続培養し、グローバルな H4 ヒストン K9 カルボキシメチル化を誘導した。その後、高糖濃度環境にメトホルミン同時処理を行ったが、H4 ヒストン K9 カルボキシメチル化レベルは低下せず、p16 mRNA 発現は低下した。これに対し、グローバルな H4 ヒストン K9 カルボキシメチル化誘導後に、通常糖濃度培養に移した上でメトホルミン処理を行うと、H4 ヒストン K9 カルボキシメチル化レベルは低下し、p16 mRNA 発現は回復した。また、高糖濃度培養開始時からメトホルミン処理を行うと、H4 ヒストン K9 カルボキシメチル化レベルの上昇は抑制され、p16 mRNA 発現低下は誘導されなかった。

このように、糖尿病に伴う高糖濃度・酸化亢進状態では、ヒストン・リジン残基にカルボキシメチル化が生じ、ヒストン・アセチル化に影響を与えることが考えられた。しかし、DNA メチル化への影響はメチル化環境の差異により反応は異なり、遺伝子発現への影響もヒストン・リジン残基にカルボキシメチル化以外の因子による影響が関与すると考えられた。メトホルミンは、H4 ヒストンの K9 リジン残基のカルボキシメチル化による遺伝子発現抑制を予防する可能性が示唆されたが、いったんカルボキシメチル化が形成された後では糖環境をコントロールすることがメトホルミンの遺伝子発現への作用に必要であると考えられた。

ヒストン・リジン残基のカルボキシメチル化による遺伝子発現変化をさらに検討するため、H3 ヒストン K27 リジン残基のカルボキシメチル化に対する抗体を作成し検索を行った。H3 ヒストン K27 リジン残基は、メチル化修飾を受けることにより、遺伝子発現を制御することが知られている。

T24 および UMUC 細胞を用い、グリオキサール処理を行い、グローバルな H3 ヒストン K27 カルボキシメチル化を誘導した。このときの p16 遺伝子 promoter 結合 H3 ヒストンの K27 のメチル化状態を検討すると、T24 ではトリメチル化・ジメチル化・モノメチル化の割合に変化は認められなかったが、アセチル化が増加していた。UMUC 細胞ではトリメチル化の減少とジメチル化の増加が見られた。このときの p16 発現は先に述べたとおり、T24 細胞ではサイレントのままであり、UMUC では発現増加が軽度認められた。さらに、この系で 5AZA 処理を同時に行うと、両細胞でトリメチル化の減少とジメチル化・アセチル化

の増加が見られた。

これらのことは、カルボキシメチル化が K27 による発現制御に何らかの影響を与えることを示唆すると考えられるが、H3 ヒストンの K27 のメチル化とカルボキシメチル化のみでは、とくに T24 細胞における p16 発現不応性の説明は依然困難であり、すべてのリジン残基の修飾状態や DNA メチル化関連因子の状態を総合的に判断することが糖尿病における発現変化の詳細な機序解明に必要と考えられた。

最後に、これまで高メチル化状態を伴って発現低下を生じている遺伝子である p16 を標的として解析を行ってきたが、反対に低メチル化を伴って過剰発現をしめす claudin-4 遺伝子について解析を行った。

T24 細胞で claudin-4 promoter メチル化レベルを検討すると低メチル化状態であった。さらに、高糖濃度培養あるいはグリオキサール処理を行うと H4 ヒストン K9 カルボキシメチル化は増加したが、claudin-4 promoter メチル化レベルは低メチル化状態のままであった。しかし、claudin-4 発現は低下していた。このとき、細胞形態は polygonal から spindle に変化し、E-cadherin 発現低下と Snail・Vimentin 発現誘導が認められ、EMT 形質が誘導されたと見なされた。

このように、claudin-4 遺伝子では promoter メチル化の変化を介さずに、H4 ヒストン K9 カルボキシメチル化により発現変化がもたらされたと考えられた。

以上のように、糖尿病によって惹起されるヒストン・リジン残基のカルボキシメチル化はエピジェネティックな発現異常をもたらす因子として、今後、より詳細な検討が必要と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

(1) Ohmori H, Luo Y, Fujii K, Sasaki T, Kuniyasu H. High motility group box 1 induces cancer aggressiveness and drug resistance. **Ann Clin Pathol** 3(1): 1042, 2015. (open access)

(2) Luo Y, Yoneda J, Sasaki T, Kawahara I, Goto K, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Alteration of the plasma free amino acids profiles in cancer patients is associated with dysregulated metabolism in skeletal muscle. **Arch Cancer Res** 3(1):5, 2015. (open access)

(3) Luo Y, Tanabe E, Kitayoshi M, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Matsushima S, Sasaki T, Sasahira T, Chihara Y, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Expression of MAS1 in breast cancer. **Cancer Sci** 106(9):1240-1248, 2015.

(4) Fujiwara R, Luo Y, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Cancer therapeutic effects of titanium dioxide nanoparticles are associated

with oxidative stress and cytokine induction **Pathobiology** 82:243-251, 2015.

(5) Kuwada M, Chihara Y, Luo Y, Li X, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Fujimoto K, Kondoh M, Kuniyasu H. Pro-chemotherapeutic effects of antibody against extracellular domain of claudin-4 in bladder cancer. **Cancer Lett** 369(1):212-21, 2015.

(6) Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Kitayoshi M, Tanabe E, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y. AKT activation and telomerase reverse transcriptase expression are concurrently associated with prognosis of gastric cancer. **Pathobiology** 81(1):36-41, 2014.

(7) Luo Y, Yoneda J, Ohmori H, Sasaki T, Shimbo K, Eto S, Kato Y, Miyano H, Kobayashi T, Sasahira T, Chihara Y, Kuniyasu H. Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository. **Cancer Res** 74:330-340, 2014.

(8) Zhou L, Luo Y, Sato S, Tanabe E, Kitayoshi M, Fujiwara R, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. Role of two types of angiotensin II receptors in colorectal carcinoma progression. **Pathobiology** 81(4):169-175, 2014.

(9) Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Fujiwara R, Kitayoshi M, Tanabe E, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y. Serum CD10 is associated with liver metastasis in colorectal cancer. **J Surg Res** 192: 390-394, 2014.

(10) Luo Y, Chihara Y, Fujimoto K, Sasahira T, Kuwada M, Fujiwara R, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. **Eur J Cancer** 49(3):741-751, 2013.

(11) Chihara Y, Kanai Y, Fujimoto H, Sugano K, Kawashima K, Liang G, Jones PA, Fujimoto K, Kuniyasu H, Hirao Y. Diagnostic markers of urothelial cancer based on DNA methylation analysis. **BMC Cancer** 13(1):275, 2013.

(12) Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Kitayoshi M, Tanabe E, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y. Increased phosphorylation of AKT in high-risk gastric mucosa. **Anticancer Res** 33(8):3295-300, 2013.

(13) Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y. Significance of epithelial growth factor in the epithelial-mesenchymal transition of human gallbladder cancer cells. **Cancer Sci**

103(6):1165-71, 2012.

(14) Luo Y, Ohmori H, Fujii K, Chihara Y, Maruyama S, Kuniyasu H. High matrix metalloproteinase-to-E-cadherin ratio measured by bicolor fluorescent in situ hybridization is associated with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in prostate cancer. **Urol Oncol-Semin Ori** 30;306-313, 2012.

(15) Shimomoto T, Luo Y, Ohmori H, Chihara Y, Sasahira T, Fujii K, Kuniyasu H. Advanced glycation end products (AGE) induce the receptor for AGE in the colonic mucosa of azoxymethane-injected Fischer 344 rats fed with a high-linoleic acid and high-glucose diet. **J Gastroenterol** 47(10):1073-83, 2012.

(16) Shimomoto T, Ohmori H, Luo Y, Chihara Y, Denda A, Sasahira T, Tatsumoto N, Fujii K, Kuniyasu H. Diabetes-associated angiotensin activation enhances liver metastasis of colon cancer. **Clin Exp Metasta** 29(8):915-925, 2012.

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) Ohmori H, Kuwai T, Kitadai Y, Fujii K, Fujiwara R, Nishiguchi Y, Sasahira T, Kuniyasu H. Protumoral role of trans fatty acid. **Annual Meeting of American Association for Cancer Research** 2016, New Orleans, 2016.4.16-20.

(2) Shimomoto T, Luo Y, Ohmori H, Chihara Y, Sasaki T, Fujii K, Kuniyasu H. Association between advanced glycation end products (AGE) and the receptor for AGE in colon carcinogenesis of azoxymethane-injected Fischer 344 rats fed with a high-linoleic acid and high-glucose diet. **Society of Toxicology's 53rd Annual Meeting and ToxExpo**, Phoenix, AZ, 2014.3.23-27

(3) 藤井 澄、羅 奕、北吉美沙穂、田邊絵里子、藤原里奈、佐々木隆光、國安弘基. 大腸癌粘液腫状間質の骨髄間葉系幹細胞への影響. **第 103 回日本病理学会**、広島市、2014.4.24-26.

(4) Luo Y, Chihara Y, Kuwata M, Tanabe E, Kitayoshi M, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. HMGB1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. **Merinoff World Congress 2013:HMGB1**, New York, NJ, USA, 2013.10.9-13

(5) Luo Y, Chihara Y, Kuwata M, Tanabe E, Kitayoshi M, Fujii K, Sasaki T, Ohmori H, Kuniyasu H. HMGB1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. **The 18th Japan-Korea Cancer Research Workshop**,

Gifu, 2013.11.29-12.1.

(6) Luo Y, Sasaki T, Kato D, Shinya S, Tanabe E, Kitayoshi M, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y, Kuniyasu H. AKT activation and telomerase reverse transcriptase expression are concurrently associated with prognosis of gastric cancer. **4th JCA-AACR Special Joint Conference - The Latest Advances in Gastric Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics -**, Urayasu, 2013.12.16-18

(7) Luo Y, Chihara Y, Ohmori H, Fujii K, Yoshikawa M, Kuwata M, Fujimoto K, Hirao Y, Kitadai Y, Kuniyasu H. Angiotensin in colorectal cancer metastasis. **103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research**, Chicago, 2012.3.31-4.4

(8) 藤井 澄、羅 奕、桑田真臣、森若優希子、千原良友、藤本清秀、國安弘基. トランス脂肪酸による EGFR のトランス活性化. **第 21 回日本がん転移学会**、広島市、2012.7.12-13

〔図書〕(計 3 件)

(1) Kuniyasu H, Ohmori H, Fujii K, Iwata N, Katsuragawa H, Fujiwara R, Sasaki T. Significance of trans fatty acids in colorectal cancer. In: **Current Research in Cancer** 9, 2015, eds. Sunitha M, pp21-29, Research Media, Kerala, India, 2015.

(2) Kuniyasu H, Luo Y, Yoneda J, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H. Significance and the cause of alteration of the plasma free amino acids profiles in cancer. In: **Current Research in Cancer** 8, 2014, eds. Sunitha M. pp19-27, Research Media, Kerala, India, 2014.

(3) Kuniyasu H, Luo Y, Fujii K, Ohmori H. HMGB1 alters the immunity and metabolism of cancer-burden patients. In: **Current Research in Cancer** 7, 2013, eds. Sunitha M. pp56-72, Research Media, Kerala, India, 2013.

〔その他〕

HP : <http://www.naramed-u.ac.jp/~molepath/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

藤井 澄 (Fujii, Kiyomu)

奈良県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号 : 60284189

### (2)研究分担者

國安弘基 (KUNIYASU, Hiroki)

奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 00253055

### (3)研究分担者

千原良友 (CHIHARA, Yoshitomo)  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40405395