

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700954

研究課題名(和文) 癌細胞におけるゲノム不安定性とセントロメアDNA低メチル化状態との関連について

研究課題名(英文) Analysis of genome instability and centric DNA hypomethylation in cancer cells.

## 研究代表者

山崎 大賀 (YAMAZAKI, TAIGA)

北里大学・北里大学メディカルセンター・上級研究員

研究者番号：90524231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞の特徴としてセントロメアDNAの低メチル化が知られているが、その意義は完全には理解されていない。本研究は、細胞の癌化とセントロメアDNAメチル化動態との相関性の解明を目的とした。培養細胞への癌遺伝子の強制発現では癌化誘導に伴ったセントロメアDNAの脱メチル化は認められなかったが、由来組織別の細胞スクリーニングにより悪性黒色腫でペリセントロメアの脱メチル化を見出した。一方でこの脱メチル化によるペリセントロメア由来のRNAは確認できず、逆に高メチル化状態であったセントロメア由来のRNAを確認したことから、これら領域からの転写にDNAメチル化以外の制御メカニズムが関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypomethylation of non-coding DNAs, such as centromere, is a unique character of cancer cells, but little is known about biological function of DNA hypomethylation in centromere. The purpose of this study is to understand the relationship between malignant transformation of cells and dynamics of DNA methylation in centromere. Forced expression of oncogenic genes was sufficient for malignant transformation of cultured cells, but was not correlated with centromere hypomethylation. We screened various cancer cells, and revealed that human melanoma cell lines show pericentric hypomethylation. We detected satellite transcripts derived from hypermethylated centric satellites in melanoma, whereas transcripts derived from hypomethylated pericentric satellites were not detected. These results suggests DNA methylation may not be involved in transcriptional regulation of centric/pericentric satellites in melanoma celllines.

研究分野：発がん

キーワード：癌 DNAメチル化 セントロメア

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムプロジェクトが終了し、様々な疾患とジェネティックな異常の相互関係が明らかとなっていく中、近年ではエピジェネティックな異常と疾患との関係にもスポットライトが当たり始めている。遺伝子領域におけるエピジェネティックな異常は、その遺伝子発現に直接影響する可能性が高いことから研究も良く進んでおり、癌細胞においては p16 遺伝子や RB 遺伝子等癌抑制遺伝子の DNA メチル化異常はその代表とも言える。

一方で、非遺伝子領域(非コード DNA)におけるエピジェネティックな異常は生命現象に直接リンクさせることが難しいため、疾患との関連についての研究はそれほど進んでいなかった。

セントロメアは染色体分配に必須なゲノム領域であり、代表的な非コード DNA である。ヒト正常細胞におけるセントロメア DNA は高メチル化状態であるのに対し、ヒト癌細胞におけるセントロメア DNA は概して低メチル化状態であることが報告されている。癌細胞ではセントロメア以外の非コード DNA を含むゲノムワイドな低メチル化状態の報告が数多くあり、染色体の分配異常や遺伝子の欠失、異数性ゲノムなどに代表されるゲノム不安定性など癌細胞において共通して認められる現象との関連性が指摘されてきた。しかしながら、細胞の悪性形質獲得に至る過程におけるセントロメア DNA の低メチル化状態の生物学的意義は十分に明らかにされてこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、正常細胞・癌細胞におけるセントロメア領域の DNA メチル化状態を調べることで、細胞の悪性形質獲得とセントロメア DNA メチル化状態変化との関連性の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)癌化誘導細胞の DNA メチル化動態

Dox によって癌遺伝子( E6E7,MYC, RAS )が発現し、*in vitro*、*in vivo*で癌化誘導が可能なヒト子宮頸部角化細胞を国立がん研究センター発がん機構研究グループ清野透博士より分与いただき実験に使用した。*In vitro*、*in vivo*それぞれで発癌誘導後、継時的にサンプルを回収し、セントロメア領域である  $\alpha$ -satellite、ペリセントロメア領域である Satellite2 の DNA メチル化状態を Bisulfite sequence 法により検出した。

### (2)セントロメア DNA が低メチル化状態を示す細胞株のスクリーニング

胎児肺細胞、咽頭癌、結腸上皮細胞癌、肺扁平上皮癌、グリア芽腫、気道上皮癌、胃癌、乳癌、子宮頸癌、悪性黒色腫に由来する 17 ラインの細胞を解析対象として、 $\alpha$ -satellite

および Satellite2 の DNA メチル化状態を Bisulfite sequence 法で検出した。

### (3)セントロメア DNA のメチル化状態とセントロメア由来転写産物の発現解析

セントロメア DNA が低メチル化状態を示した培養細胞を対象に、 $\alpha$ -satellite、Satellite2 由来の転写産物の有無を Realtime-PCR により検討した。

### (4)セントロメア特異的な DNA メチル化導入手法の開発

セントロメア部位を認識する DNA 結合タンパクと DNA メチル化酵素との融合遺伝子を設計し、細胞内に導入することでセントロメア特異的な DNA メチル化導入を試みた。ヒト  $\alpha$ -satellite およびマウス Minor satellite に共通して存在する配列である CENPB-box を認識する CENPB の DNA 結合ドメインをセントロメア認識 DNA 結合タンパク質として用いた。DNA メチル化酵素として原核生物由来の CpG methylase である SssI を用いた。解析対象の細胞として、セントロメア ( Minor satellite )、ペリセントロメア ( Major satellite ) が低メチル化状態を示すマウス初期胚を用いた。

## 4. 研究成果

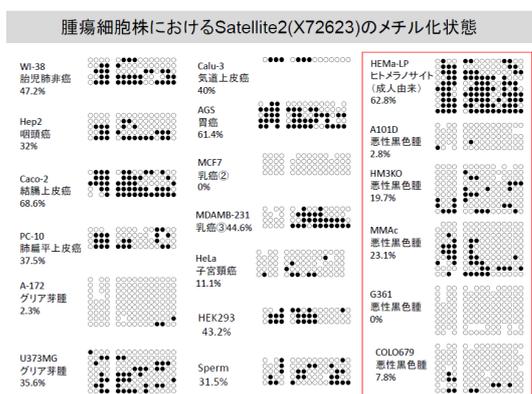
### (1)癌化モデル細胞を用いたセントロメア DNA メチル化のダイナミクス解析

癌化誘導により *in vitro*での細胞増殖速度の上昇、ヌードマウス皮下での造腫瘍を確認した。*in vitro*での癌化誘導前で  $\alpha$ -satellite は約 66%の CpG サイトがメチル化されていた。癌化誘導 10 日後、20 日後、30 日後、40 日後および 50 日後で癌化誘導有りの細胞と無しの細胞との DNA メチル化状態を比較した結果、両者の間に顕著な差は認められなかった。このような傾向は Satellite2 の解析結果、*in vivo*で造腫瘍させた組織を用いた解析結果でも同様であった。また、腫瘍塊の大きさと DNA メチル化状態に相関性は認められなかった。文献で報告されているような癌細胞と正常細胞でのセントロメア DNA のメチル化状態の差は、本実験では再現することはできなかったが、この原因として、細胞が由来する組織の違いや、実験に供した試料が臨床検体であるかライン化された細胞かなどの違いが反映されている可能性が考えられた。

### (2)セントロメア DNA が低メチル化状態を示す癌細胞のスクリーニング

癌の由来組織によってセントロメア DNA のメチル化状態が異なるかどうかを検討するため、様々な組織に由来する培養細胞株を用いた検討を行った。その結果、 $\alpha$ -satellite ではいずれの腫瘍細胞株もばらつきはあるものの、低メチル化を示す精子ゲノムと比べて高メチル化状態を示した。一方、Satellite2

については精子ゲノム(31.5%)と比べて腫瘍細胞株では概ね高メチル化状態を示したが、グリア芽腫と悪性黒色腫では低メチル化状態を示した。特に悪性黒色腫では調べた5ラインの細胞中全ての種類で低メチル化状態を示した(0%~23.1%)。そこで、悪性黒色腫が癌化する前の由来細胞であるメラノサイト(HEMa-LP)を用いて同様の解析を行った結果、メラノサイトにおけるSatellite2のDNAメチル化状態は62.8%と高メチル化状態であった。このことから、メラノサイトの癌化とSatellite2のDNAメチル化状態に何らかの関連性がある可能性が考えられた。



### (3)セントロメアDNAのメチル化状態とセントロメア由来転写産物の発現解析

Satellite2 においてメラノサイトと悪性黒色腫間でDNAメチル化状態に差が認められたことから、Satellite2におけるDNAメチル化がセントロメア領域の転写活性と相関するかどうかを検討するために、メラノサイトと悪性黒色腫における $\alpha$ -satelliteとSatellite2の転写活性をRealtime PCRにより検討した。その結果、Satellite2においてはメラノサイトと悪性黒色腫間での発現量に差は認められなかったが、 $\alpha$ -satelliteにおいてはメラノサイトと比較して4ライン中3ラインの悪性黒色腫細胞株で発現量の亢進が認められた。以上から、セントロメア由来のRNAの発現にはDNAメチル化の影響は低く、他の制御メカニズムが関わっている可能性が示唆された。

### (4)セントロメア特異的なDNAメチル化導入手法の開発

セントロメアDNAの低メチル化状態の機能解析を見据えて、セントロメア特異的にDNAメチル化を導入する実験系を開発することとした。セントロメアが低メチル化状態を示すマウス卵子をモデル細胞として用い、CENPB-SssIをコードするmRNAを細胞内に導入した。mCherry-MBD-NLSによる核内メチル化DNAのイメージング結果と

Bisulfite sequenceの結果からMinor satelliteへのDNAメチル化導入を示唆する結果を得た。しかしながら、ペリセントロメアのリピート配列であるMajor satelliteについてもDNAメチル化導入が認められたことから、今後はオフターゲットの少ないDNAメチル化導入の手法開発が必要であると考えられた。

### 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3件)

Itoh K, Izumi Y, Inoue T, Inoue H, Nakayama Y, Uematsu T, Fukuyama T, Yamazaki T, Yasuoka Y, Makino T, Nagaba Y, Tomita K, Kobayashi N, Kawahara K, Mukoyama M, Nonoguchi H. Expression of three isoforms of Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) in the kidney and regulation by dehydration. *Biochem Biophys Res Commun.* Vol.453, 356-361 (2014)(査読有) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.089.

Nagai T, Yasuoka Y, Izumi Y, Horikawa K, Kimura M, Nakayama Y, Uematsu T, Fukuyama T, Yamazaki T, Kohda Y, Hasuike Y, Nanami M, Kuragano T, Kobayashi N, Obinata M, Tomita K, Tanoue A, Nakanishi T, Kawahara K, Nonoguchi H. Reevaluation of erythropoietin production by the nephron. *Biochem Biophys Res Commun.* Vol.449, 222-228 (2014)(査読有) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.014.

Fukuyama T, Yamazaki T, Fujita T, Uematsu T, Ichiki Y, Kaneko H, Suzuki T, Kobayashi N. Helicobacter pylori, a carcinogen, induces the expression of melanoma antigen-encoding gene (Mage)-A3, a cancer/testis antigen. *Tumour Biol.* Vol.33, 1881-1887 (2012)(査読有) doi: 10.1007/s13277-012-0448-6.

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 胃癌細胞の検出方法、及び胃癌細胞検出キット

発明者: 福山 隆、山崎大賀、他

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014 - 234895

出願年月日: 2014年11月19日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山崎 大賀 (YAMAZAKI Taiga)  
北里大学・北里大学メディカルセンター・  
研究部門・上級研究員  
研究者番号：90524231