

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25330347

研究課題名(和文) 遺伝子プロモータ領域のCpGアイランドメチル化プロファイルが転写に与える影響

研究課題名(英文) A study of the relationship between DNA methylation profile of promoter region and gene expression

研究代表者

稲岡 秀検 (Inaoka, Hidenori)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：30282768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の解析対象は、DNAメチル化である。DNAメチル化とは、CpG部位にメチル基が付加される現象を言う。

DNAメチル化が生じると、転写因子の結合が阻害され、遺伝子の転写が抑制されるとされている。ヒト肺動脈内皮細胞にDNAメチル化阻害剤を添加し、遺伝子発現変化について測定した。さらに発現が変化した遺伝子のDNAメチル化解析を行った。発現が大きく変化している遺伝子のDNAメチル化度にはほとんど変化が見られなかった。この結果から、DNAメチル化は単体で遺伝子発現制御をしていないことが考えられる。

研究成果の概要(英文)：The object of analysis in this study is DNA methylation. DNA methylation is a phenomenon in which a methyl group is added to a CpG site. When DNA methylation occurs, binding of transcription factors is inhibited, and transcription of genes is suppressed.

A DNA methylation inhibitor was added to human pulmonary artery endothelial cells and the gene expression change was measured. DNA methylation analysis of genes with altered expression was also performed. There was almost no change in the degree of DNA methylation of the gene whose expression was greatly changed. From this result, it is considered that DNA methylation does not regulate gene expression on its own.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：がん 遺伝子発現 マイクロアレイ DNAメチル化 転写制御

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化とは、染色体上で連続するシトシン(C) とグアニン(G) の 2 塩基(以下これを CpG と記す) の C にメチル基が付加された状態をいう。DNA メチル化はエピジェネティックな遺伝子発現制御に関連していることが知られている。また DNA メチル化は転写制御だけでなく分化や発生といった現象にも深く関与していることが明らかになりつつある。

DNA メチル化が転写制御に影響を与えるメカニズムについては、一般的に以下に述べるプロモータ領域のメチル化が関与しているとされている。プロモータ領域とは、転写制御メカニズムの重要な要素の一つであり、転写開始位置の上流に位置し転写時期や転写産物の生産量を制御するとされている。

プロモータ領域には CpG が多く存在し、CpG アイランドと呼ばれる CpG のクラスターが形成されている。このプロモータ領域の CpG アイランドの CpG の多くがメチル化されている状態(以後高メチル化状態と記す)であると、転写因子がプロモータ領域に結合することができなくなり、結果として転写が抑制されると考えられている。

DNA メチル化は、がんの発生や発達にも深く関係していることが多くの報告から明らかとなりつつある。がん抑制遺伝子の多くがヒトのがんにおいて発現・産生が抑制されていることが確認されており、これらのがん抑制遺伝子のプロモータ領域の CpG アイランドは、正常組織では低メチル化状態であるが、がん組織では高メチル化状態となっていることも報告されている。このように、DNA メチル化異常とがんの関連が明らかになってきたことに加え、SNP 計測技術を応用し、CpG のメチル化状態を 1 塩基単位で高精度かつ、網羅的に計測可能な技術が急速に発達してきたことから、ゲノムワイドでの大規模 DNA メチル化解析が行われるようになってきた。

しかし、同時に計測されている遺伝子発現データを調べたところ、DNA メチル化と遺伝子発現の間には期待されるほどの相関は見られなかった。TCGA のような DNA メチル化と遺伝子発現の大規模データベースが存在するにも関わらず、文献調査においてもゲノムワイドでの DNA メチル化と遺伝子発現の間に強い相関が存在するという報告は現在のところ見つかっていない。

本研究では、特定の遺伝子を対象とした研究において DNA メチル化異常が発現に影響を与えるという数多くの報告と、大規模データベースを利用したゲノムワイドの解析結果から DNA メチル化と遺伝子発現の関係性を示唆する報告がほとんど無いという、この矛盾点に着目した。

TCGA などで DNA メチル化計測に用いられている計測技術は SNP 計測技術を応用したものである。CpG にバイサルファイト処理を施すとメチル化シトシンは変化せず、非メチ

ル化シトシンのみウラシルに変換される。この C と U の 1 塩基の違いを検出することで CpG のメチル化状態を計測している。この計測方法からわかるように、現在はプロモータ領域の 1 つの CpG のメチル化状態のみを計測している。実際のプロモータ領域では CpG は CpG アイランドを形成しており、複数の CpG のメチル化状態が転写因子の結合に関与していると考えられる。そのため DNA メチル化状態と転写の関係を正確に知るためには、1 塩基のメチル化状態ではなく、プロモータ領域の CpG アイランド全体のメチル化状態を知る必要があると考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、正常組織とがん組織で遺伝子発現が異なる遺伝子において、プロモータ領域の CpG アイランド全体のメチル化状態を計測し、CpG アイランドのメチル化プロファイルが転写制御に与える影響について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

正常組織とがん組織で遺伝子発現が異なる遺伝子において、プロモータ領域の CpG アイランド全体のメチル化状態を計測し、CpG アイランドのメチル化プロファイルが転写制御に与える影響について明らかにするために、本研究では以下の順序で研究を行う。

メチル化阻害剤などによりプロモータ領域のメチル化状態を強制的に変化させ、メチル化プロファイルが転写制御に与える影響を解明する。

1) 遺伝子グループの絞込み

人工呼吸時に肺胞から炎症性物質が産生させる機序の解明を行うための研究を行っており、この研究において肺動脈内皮細胞を用いた *in vitro* 実験を行なっている。そのため肺動脈内皮細胞の培養および遺伝子発現解析を行う実験環境が十分に整備されており、新たな投資が必要無い。以上の理由からメチル化計測を行う対象として肺動脈内皮細胞を選択した。

この培養細胞に対して、濃度依存的 DNA メチル化阻害剤を投与し、発現の変化を調べる。発現計測はアフィメトリクス社の DNA マイクロアレイを用いる。

我々が提案する適応閾値法を用いて、有意に発現変化があった遺伝子を選択する。

2) DNA メチル化解析

DNA メチル化解析についてはカスタムチップを作成する予定であったが、DNA メチル化チップの CpG 測定部位が、研究申請時に 27000 個から、研究実施時には 540000 個へと飛躍的に増加した。そのため、遺伝子プロモータ近傍や、遺伝子内の CpG 部位が複数同時に測定できることが可能となった。

カスタムチップの作成には費用と経験が必要であるが、我々の研究ではまだそこまで解析が進んでいなかったため、本研究では新

たな網羅的測定が可能な DNA メチル化チップを採用することとした。

4. 研究成果

H25 年度：

H25 年度は、研究の予備段階として、正常組織とがん組織における遺伝子発現について検討した。公的データベースから複数の臓器における、正常組織およびがん組織からの遺伝子発現データを入手し、正常組織とがん組織で発現量が有意に異なる遺伝子群を同定し、適応閾値法の有効性を確認した。

H26 年度：

H26 年度は、DNA メチル化異常を強制的に発生させた細胞における遺伝子発現について検討した。ヒト肺動脈内皮細胞に濃度依存性の DNA メチル化阻害剤を添加し、DNA メチル化異常を発生させ、このときの遺伝子発現変化について測定した。三段階に濃度を変化させた培養細胞(以後、濃度 1、濃度 2、濃度 3 とする)と対照群として DNA メチル化阻害剤を加えなかった群の計 4 群を用意し、アフィメトリクス社のマイクロアレイを用いて計 8 回網羅的遺伝子発現解析を行った。適応閾値法を用いて、有意に発現変化のあった遺伝子を抽出した後、濃度 1、濃度 2、濃度 3 の遺伝子発現量と対照群の遺伝子の発現量の比を測定した、発現比が濃度依存的に増加する、すなわち DNA メチル化阻害によって発現が増加したと考えられる遺伝子を 193 個同定することができた。

H27 年度：

H27 年度は、前述した DNA メチル化チップの仕様変更に伴い、調査対象となる遺伝子の周囲の CpG 部位の構造を精査した。

NCBI のデータベースより、最新の染色体上における遺伝子の位置情報、および染色体上の CpG 部位の位置情報を入手し、それぞれを統合する作業を行った。

CpG 部位は既に述べたように DNA メチル化が生じるために C が U に変化し、最終的に T となってしまうため、染色体上に存在する割合は低い。そこで CpG が存在する部位は遺伝子との関係性が深いと考えられる。NCBI から入手した CpG の位置情報を用いて、遺伝子を以下の 8 つのタイプに分類した。

- ・タイプ 1：遺伝子の上流、内部、下流の全てに CpG をもつ遺伝子
- ・タイプ 2：遺伝子の上流、内部に CpG を持つ遺伝子
- ・タイプ 3：遺伝子の内部、下流に CpG を持つ遺伝子
- ・タイプ 4：遺伝子の上流、下流に CpG を持つ遺伝子
- ・タイプ 5：遺伝子の上流のみに CpG を持つ遺伝子
- ・タイプ 6：遺伝子の内部のみに CpG を持つ遺伝子

- ・タイプ 7：遺伝子の下流のみに CpG を持つ遺伝子
- ・タイプ 8：遺伝子の周辺に CpG を持たない遺伝子

対象遺伝子群は全ての染色体にほぼ均一に存在しており、特定の染色体に偏ることはなかった。また予想に反して、DNA メチル化阻害剤によって、発現が濃度依存的に変化した遺伝子の CpG の位置によるタイプ分類による結果には偏りが無く、全てのタイプがほぼ均等に存在することが示された。この結果から DNA メチル化阻害剤によって発現が濃度依存的に変化する遺伝子は、CpG の数にあまり影響を受けていないことが示された。

ある条件によって選択された遺伝子グループから遺伝子機能の似通った遺伝子を抽出するツールとして DAVID という統計解析ソフトが存在している。この DAVID を用いて 8 タイプに分類された遺伝子の機能を調べてみたところ、アポトーシス関連遺伝子や、ヒストンコア関連遺伝子、細胞骨格関連遺伝子、ケモカインなどの遺伝子グループが抽出されたが、統一的な傾向は見られなかった。

この結果から、DNA メチル化阻害剤によって濃度依存的に発現が変化した遺伝子には、特徴的な機能グループは存在していないことがわかる。

H28 年度：

H28 年度は、網羅的な DNA メチル化解析を行った。対照群、濃度 1、濃度 2、濃度 3 のデータに対し、2 回 DNA メチル化度の測定を行い、解析結果はその平均値を用いた。

DNA メチル化度はその測定原理から値が 0.0(完全に非メチル化)から 1.0(完全にメチル化)の間の値となる。そこで、測定された全 CpG のメチル化度を 0.1 刻みで 10 区間に区分し、それぞれのメチル化度のヒストグラムを作成することでメチル化プロファイルを作成した。このメチル化プロファイルが、メチル化阻害剤によってどの部位が影響を受けるかを検討した。

その結果、予想に反して、全体的なメチル化プロファイルはメチル化阻害剤の投与にほとんど影響を受けていないことがわかった。

メチル化阻害剤投与によって、遺伝子発現は確実に変化しているので、DNA メチル化が遺伝子発現に直接的かつ主体的に関与しているのであれば、メチル化度は濃度異存的に変化すると考えられる。このことからメチル化阻害剤投与は染色体上の CpG のごく一部をのメチル化度を変化させていることが考えられる。

これは、がんと正常細胞の発現と DNA メチル化解析時の予備検討のときにも見られた結果である。

この原因としては以下のことが考えられる。染色体は通常はヒストンに巻き付いた状

態で存在しており、ヒストンはさらにクロマチンという構造をとり、染色体は凝縮した状態で存在している。そのため投与したメチル化阻害剤は全ての CpG に均等に影響していないことが考えられる。

そこで染色体上を、塩基距離に応じて 10 の区間に分類し、染色体局所のメチル化度の変化を調べた。染色体毎に DNA メチル化度が高い部分は異なっていることが判明した。そこで局所で DNA メチル化度が高値となる部位の染色体間での類似性を調べたところ、染色体を大きく 2 分することができた。このことから DNA メチル化は、すべての染色体で均一に生じているのではなく、染色体毎に DNA メチル化プロファイルが異なるという結果が得られた。

しかし、やはり DNA メチル化阻害剤の濃度とは関連が見られなかった。DNA メチル化阻害剤による影響は染色体上のごく狭い領域で生じている可能性が示唆された。

次に、絞り込んだ対象遺伝子の DNA メチル化解析を行う前に、染色体上での位置解析を行った。もし対象遺伝子の発現変化が DNA メチル化度の変化に直接由来するものであれば、対象遺伝子は、前述した染色体上で局所に DNA メチル化度が高値を示す部位の近傍に多く存在することが考えられる。

対象遺伝子の染色体上の位置を確認したところ、染色体上で局所に DNA メチル化度が高値を示す部位との関連性は見られなかった。

最後に対象遺伝子の CpG の DNA メチル化解析を行った。DNA メチル化チップの解析データには CpG の染色体上の位置、関連する DNA の名称、メチル化度のデータがある。このデータから対象遺伝子に関連する CpG 部位のみを抽出した。今回測定した DNA メチル化チップでは、発現が変化した全ての遺伝子に関する DNA メチル化度が存在しているわけではなく、最終的に 115 個の遺伝子に関する DNA メチル化度のデータが得られた。各遺伝子に対して DNA メチル化が測定された CpG の個数は平均して 30 程度であり、十分な数の CpG 部位の DNA メチル化度を測定していることがわかった。

そこで各遺伝子の DNA メチル化の平均値を算出し、この平均 DNA メチル化度が DNA メチル化阻害剤の濃度に対してどのように変化しているかを確認した。対象遺伝子周辺の CpG の DNA メチル化度は、遺伝子毎に異なり、高いメチル化度を示す遺伝子もあれば、低いメチル化度を示す遺伝子もあった。DNA メチル化阻害剤の影響を受ける遺伝子はメチル化度が高値を示すと予測していたが、結果は予測と異なっていた。

また、遺伝子発現は DNA メチル化阻害剤の濃度に異存して変化しているにもかかわらず、対象遺伝子の CpG 部位のメチル化度には、やはりほとんど変化が見られなかった。

DNA メチル化度の解析対象 CpG を対象遺伝

子の周囲 10000 塩基、100000 塩基内の CpG に拡張して、同様の解析を試みた。測定対象の CpG を増やすと DNA メチル化度が変化する領域も確認されたが、やはり DNA メチル化度には、DNA メチル化阻害剤の濃度の影響はほとんど見られなかった。

全体の結果まとめ

以上の結果をまとめると、

- 1) 肺動脈内皮細胞は、DNA メチル化阻害剤の濃度に異存して、発現が変化する遺伝子群が存在する。
- 2) それらの遺伝子は全染色体上にほぼ均一に存在し、特定の染色体に偏らない
- 3) それらの遺伝子の周囲の CpG の位置や数などに特定の傾向は無く、遺伝子周囲の CpG の頻度と発現には関係が無いことが示された。
- 4) 全体的な DNA メチル化プロファイルに DNA メチル化阻害剤の濃度の影響は見られなかった。
- 5) 染色体別の DNA メチル化プロファイルには違いが見られたが、DNA メチル化阻害剤の濃度の影響は見られなかった。
- 6) 染色体局所の DNA メチル化プロファイルには違いが見られたが、DNA メチル化阻害剤の濃度の影響は見られなかった。
- 7) 遺伝子発現に変化があった遺伝子の周辺の DNA メチル化プロファイルには違いが見られたが、DNA メチル化阻害剤の濃度の影響は見られなかった。

DNA メチル化阻害剤の濃度の影響が見られなかった理由を以下に考察する。

理由 1：発現に変化のあった遺伝子の全てについて DNA メチル化度を測定した CpG があつたわけではない。

理由 2：DNA メチル化単体では無く、ヒストンメチル化や、遺伝子のシグナル伝達に影響を与える遺伝子のリン酸化の変化にメチル化阻害剤が影響し、間接的に発現が変化している。

理由 1 については、今回 193 個の遺伝子中 115 個と半数以上の遺伝子について DNA メチル化度の変化を測定しているため、主要な原因としては考えにくい。

理由 2 については、他のエピジェネティックな要素が影響して DNA メチル化阻害剤の影響が間接的に遺伝子発現に影響を与えることは十分に考えられる。

DNA メチル化阻害剤が遺伝子発現に影響を与えているのは事実であるため、どこかの CpG の DNA メチル化度がメチル化阻害剤の濃度依存的に変化しているはずである。そのため今後の検討課題としては、

- 1) 540000 の CpG 測定データから，DNA メチル化度がメチル化阻害剤濃度依存的に変化している CpG 部位を特定する．
- 2) 特定された CpG 部位の染色体上の位置，周囲のクロマチンの構造，CpG の周囲の塩基配列のパターン，周囲の CpG の密度等，CpG 部位の構造的な特徴を調べる．

などを行い，メチル化阻害剤が DNA メチル化度に影響を与えうる CpG の情報について抽出し，その CpG 部位の周囲の遺伝子発現の変化との関係を精査していくことを検討している．

5．主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

稲岡 秀検 (Inaoka Hidenori)
北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号： 30282768