

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460413

研究課題名(和文) 発がん過程におけるインスレーターおよびメチル化機構の相互関係の解明と診断への展開

研究課題名(英文) The elucidation of mutual relations between insulator and methylation in the carcinogenesis and the development to diagnosis.

研究代表者

井村 穰二 (Imura, Johji)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：80316554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：発がん過程で遺伝子が不活化される機構にはプロモーター領域のメチル化とインスレーター機構がある。本研究では両者の関連性を探るために後者の因子の一つであるCTCFとメチル化について研究した。乳腺では、がん化する際にCTCFが核から細胞質内へと発現部位が変化し、同様の傾向が胆道あるいは子宮体部内膜病変でも認められた。一方、メチル化酵素であるDnmtは悪性腫瘍ほど高発現しており、腫瘍化に伴いメチル化が亢進していることを認めた。さらにCTCFの細胞質内発現とDnmtの発現は相関しており、腫瘍の進展に従って後者が主体を成すことで、前者が役割を終了し細胞質内へと移行する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The methylation of promoter regions and insulator are thought to play a role as the mechanism to relate gene inactivation in the cancer progression of each organ. To investigate the association of both factors, this study was carried out about CCCTC binding factor (CTCF) as one of the later factors and the methylation. The expression of CTCF changed into the cytoplasm from the nucleus of original expression site. The similar tendencies were also recognized in the biliary tract or the endometrial lesion. On the other hand, DNA methyltransferase showed highly expression in the malignancies and it was admitted that the methylation was related with malignant transformation. Furthermore, the expression of Dnmt related to the cytoplasmic expression of CTCF. Because the latter play the leading role according to the tumor development, it was suggested that the former was translocated into the cytoplasm with finishing its role.

研究分野：病理学

キーワード：インスレーター メチル化 発がん CTCF メチル化

1. 研究開始当初の背景

各種臓器に発生する腫瘍細胞では、多種多様の遺伝子異常が生じていることこれまで判ってきている。特に、腫瘍細胞内ではその多様な生物学的機能を発揮するために、自己増殖や代謝亢進のためのエネルギーと材料が必要とされ、それらを生み出すために様々な転写が制御されているものと考えられている。この様に、各種腫瘍細胞における転写機能の異常の原因は様々存在するが、エピゲノム異常も重要とされ、特にプロモーター領域の CpG island におけるメチル化機構の異常は重要であり、特定の遺伝子のメチル化が集簇する CpG methylation phenotype (CIMP)が特定の臓器悪性腫瘍において生じていることがこれまでの研究において明らかになってきている。

この様に腫瘍細胞における転写制御機構の一方には抑制機構として、遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化が存在している。さらに一方では、いわゆる絶縁体的な働きをするインスレーター機構も存在しており、定常状態における転写の抑制を行っている。このメチル化とインスレーターの果たす役割は転写抑制という点では類似しているものの、独立した機能と思われ、一方が働く際には、他方はその機能が失っている可能性がある。この両機構は様々な腫瘍において密接に関連しているものと考えられるが、メチル化機構は多くの腫瘍において研究が進んでおり、多くの腫瘍抑制遺伝子の発現に関係性を示していることが判ってきた。しかし、腫瘍組織における、一方のインスレーター機構との関わりに関して検討している研究は少なく、両機構との関連性に関しても不明な点が多い。

2. 研究の目的

インスレーター機構の代表的な因子として CCCTC binding factor: CTCF が同定され、一部に腫瘍において発現が報告されている。

しかし、メチル化との関連性について検討した報告はない。これら背景から、今回、種々の腫瘍においてインスレーター機構の代表でもある CTCF の発現について検討を行った。さらに、メチル化の有無と共に、メチル化を制御する変換酵素である DNA methyltransferase: Dnmt-1 と 3b に関して、その発現を観察すると共に、CTCF との相関性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1)材料:

対象とした腫瘍組織は乳腺、胆道系及び子宮体部内膜における非腫瘍性、良・悪性腫瘍症例から生検あるいは手術材料から得られた新鮮凍結材料ならびにホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用いた。乳腺疾患に関しては、乳腺症(10例)、線維腺腫(31例)、乳管内乳頭腫(21例)、そして浸潤性乳管癌(硬癌(14例)、充実性腺管癌(8例)、乳頭腺管癌(4例)、粘液癌(1例)、微小浸潤癌(1例)の計30例)を用いた。胆道系疾患に関しては癌症例(23例)と対照として非癌部(12例)を用いた。子宮内膜病変に関しては内膜掻爬材料として採取された各々の疾患、正常増殖期内膜(11例)、内膜増殖症(15例)、異型内膜増殖症(13例)および類内膜腺癌(20例)を用いた。

2)方法:

a)免疫組織化学

用いた抗体は、抗 CTCF 抗体 (SANTA CRUZ、x500)、Dnmt-1 (Clone 60B1220.1、Acris、X500)、Dnmt-3b (Clone 52A1018、IMGEX、X25)で、各々の希釈倍率で使用した。得られたパラフィン切片を、BenchMarkGX および Ventana iVIEW DAB universal Kit (Roche Diagnostics)を用い免疫組織化学を行った。

b)DNA および RNA 抽出

腫瘍部の 10 μm の厚さのパラフィン包埋切片を脱パラフィン後、DNA Micro Kit(QIAGEN)を

用い DNA を抽出した。また、腫瘍部ならびに非腫瘍部の新鮮凍結材料をホモジナイズし、55

c)Methylation specific PCR(MSP)

プロモーター領域におけるメチル化状態をみるために、抽出した DNA を Methylamp™ DNA Modification Kit (EPIGENETEK)を用い Bisulphate 処理し、引き続き MSP を行い、電気泳動にて増幅産物の有無を確認し、メチル化の頻度 CpG island methylation phenotype: CIMP を算出した。

d)Dnmt-1 および 3b mRNA 発現

新鮮材料から得られた RNA より SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) により cDNA を合成し、リアルタイム PCR (Applied 7700)にて Dnmt-1 の相対発現量を算出した。

4. 研究成果

乳腺疾患における CTCF と Dnmt の発現

乳腺疾患における CTCF の発現は、乳腺症をはじめとして線維腺腫や乳管内乳頭腫など良性腫瘍では主に核内にその発現の局在を認める一方、浸潤性乳管癌の多くは核内発現が減弱し、細胞

質内に発現が認められた。さらに、乳腺症、線維腺腫、乳管内乳頭腫そして浸潤性乳管癌の順に、これら核内発現の減弱と細胞質内発現の増強が有意差をもって漸次、観察される傾向を示した。また、種々の臨床病理学的に因子との相関を単変量解析でみると、T 因子と年齢に有意な相関を、またリンパ管侵襲とリ

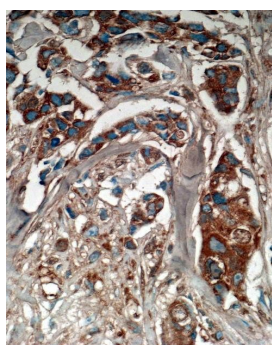


図 1.浸潤性乳管癌における CTCF の細胞質内発現

ンパ節転移とに相関傾向を示した。

Dnmt-1 と 3b は主に核内に発現を認めるが、良性腫瘍に比し、浸潤性乳管癌の多くで発現する細胞が多く認められた。これら Dnmt-1、3b の核内発現と CTCF

との関連性は特に Dnmt-3b で有意に認められ、また Methylation の頻度 (CIMP) に関しても核内発現の減弱ならびに細胞質内発現の亢進の両者に有意な相関性を認めた。

胆道癌における CTCF と Dnmt の発現

CTCF は非腫瘍部では核内発現を主体としており、細胞質内に発現する例は極めて少なかった。一方、癌部では多くの症例で腫瘍細胞の核に

発現する症例が少なく、細胞質内に顆粒状の発現する傾向を認めた。一方、Dnmt-1 は非癌部でも、癌部でも核内で発現していたが、腫瘍細胞の多くにおいて多数の細胞に発現する傾向を示した。さらに、CTCF と Dnmt-1 と両者の発現を比較すると、癌部において両因子が核内に共発現する傾向が伺えた。

子宮内膜病変における CTCF と Dnmt の発現

CTCF は正常の増殖期内膜では内膜腺の殆どの核に発現しているが、内膜増殖症では発現している細胞が減少し、さらに異型内膜増殖症では更に減少する一方、細胞質内発現する細胞が観察され、類内膜腺癌ではなお一層そ

れらの傾向を示した。Dnmt-1 は良悪性に関わらず、核内に発現していたが、類内膜癌でより

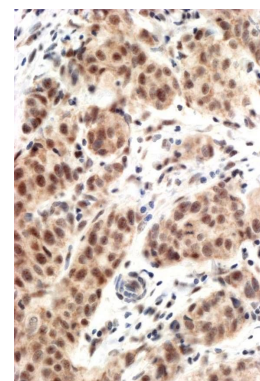


図 2.浸潤性乳管癌における Dnmt-1 の核内発現

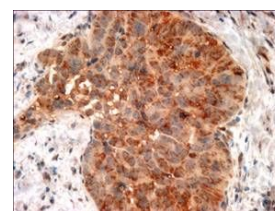


図 3.胆道癌における CTCF の細胞質内発現

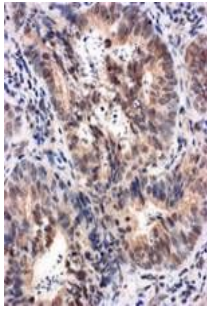


図4.類内膜腺癌における CTCF の細胞質内発現

多くの細胞で発現していた。さらに、CTCF と Dnmt-1 と両者の発現を比較すると、癌部において両因子が共発現する傾向が伺えた。

これまでの各種臓器の悪性腫瘍において、特にがん抑制遺伝子の不活化機構として様々な機序に関する研究が進んできた。その中で重要な役割を演じているものにプロモーター領域におけるメチル化機構が上げられる。メチル化は化学的な修飾により不活化され、転写が抑制され、それらに關与する酵素として Dnmt が重要となっている。Dnmt には幾つかのサブタイプが存在し、各種臓器の悪性腫瘍の違いによって關与する各 Dnmt サブタイプが異なっている。この様に Dnmt は各種遺伝子のプロモーター領域のメチル化をもたらしている。各種臓器の腫瘍では、その発育に従い、メチル化の頻度 (CIMP) も高まることも判ってきている。もう一方の転写抑制機序としてのインスレーター機構が上げられる。インスレーターは本来、エンハンサーとプロモーターの間に存在するとされており、エンハンサーからのシグナルを制御する一種の絶縁体の役割を演じている。インスレーター機構を司っている因子として近年 CTCF が同定された。但し、これまで、発がん過程における CTCF を含めたインスレーター機構が多段階発現過程においてどの様に關与するか、研究が進んでこなかったため不明な点が多い。本研究ではこの両者に関し注目し、様々な臓器における発現の有無を免疫組織学的ならびに分子生物学的に検討することで、両者の關連性に関して探ってみた。

本研究において各種臓器における発がん過程において CTCF の発現様式が異なることが示された。乳腺では、正常では主に核内に局在していた。では、各種臓器における発がん過程において腫瘍細胞が様々な転写制御を受けているものと考え、その中でメチル化とインスレーター機構に注目し検討した。このことは当然のことながら転写部位である核内であること指示するものであり、核内にその局在が認められたことは本来の機能部位を支持するものでもある。さらに良性腫瘍である線維腺腫や乳管内乳頭腫瘍でも正常と同様核内に CTCF が局在していることは、正常に転写抑制が行われていると思われる。しかし、浸潤性乳管癌では核内発現が減弱し、細胞質内へとその発現の局在が移行していた。これは単純に転写機構の一部が細胞質内で起こっているのではないと考える。さらに、非腫瘍性疾患である乳腺症、良性腫瘍である線維腺腫と乳管内乳頭腫、そして悪性腫瘍である浸潤性乳管癌と段階を経るに従い、CTCF の細胞質内発現の頻度も高くなっている。また、浸潤癌症例における様々な臨床病理学的諸因子と相關を探ったところ子、T 因子とリンパ管侵襲等に有意差を認めた。このことは、より侵襲性を獲得するに従い、核内発現の減弱と細胞質内発現の亢進が生じていることを意味しているものと思われる。同様に CTCF の核内発現はこれらの傾向は他臓器の疾患でも類似しており、胆道系疾患及び子宮体部病変でも同様な傾向が認められた。特に体部病変では病変が進行するに従って、CTCF の核内発現が減弱し、細胞質内発現が増強する傾向に類似性が認められた。このことは何を意味するのか、即ち、転写機構の中でも何らかの制御機構に変貌を来している結果を反映しているものと推察される。すなわち、本来の機能を発現する核内でその役割が何らかの影響によって失ってしまい、細胞質内への移動してしまうのかもしれない。細胞質内が CTCF

の貯留場であるか否かは不明ながら、本来のインスレーター機能は細胞質内では発揮できないものと思われる。何故に核内から細胞質内へと移動するのか、それは核内で別な機構が働く結果、インスレーター機構の役割を終了することで、細胞質内に移動するのではないかと推論される。では別な機構とは何なのか、我々はメチル化が関与しているのではないかと考察し、本研究でメチル化とインスレーターの関わりを研究した。

発がん過程におけるメチル化は重要な機構の一つである。今回の研究でも乳腺のみならず、胆道系そして内膜病変でも、様々なメチル化が生じていることを Dnmt の発現から推測された。すなわち、非腫瘍、良性腫瘍ではメチル化の頻度は低いものの、悪性腫瘍になるに従いメチル化の頻度を増していることを MSP から確認すると共に、免疫組織学的な Dnmt の陽性細胞の数とに相関を有することを再確認した。この免疫組織学的手法がメチル化の頻度をある程度半定量性に、また客観的に指標化するもの有用であるとするものである。

インスレーターとメチル化機構の関わりに関しては、CTCF に核内発現減弱、細胞質内発現亢進と Dnmt の発現亢進とに相関を示した。このことから、メチル化とインスレーター機構は両者とも転写抑制を司っている重要な機能であるが、互いに補填するものではなく一方が、機能を発揮している場合、他方がその機能を失い、局在を移動していく可能性が考えられる。即ち、発がん過程が進むに従って、本来はインスレーターが主役を演じていたものが、メチル化機構にその主体が変わっていった結果、細胞質内へと CTCF が移動したのではないかと考えられる。この様に、様々な遺伝子のメチル化の蓄積が生じている一方で、インスレーター機能の消失が発がん化に向けて生じているものと考えられる。

今後は、CTCF の細胞質内移動を明らかに

するためには、細胞内分画中の CTCF ならびに Dnmt の蛋白レベルの量的解析を行う必要があると思われる。また、インスレーターとメチル化機構の関連性をより明らかにするためには、脱メチル化処理によって CTCF がどのような挙動を示すも明らかにしなければならない。それによって、両機構が相互に関連したものであり、独立した発現機序を持っているものではないことの証明にも繋がる。さらに CTCF の核内から細胞質への移動を動的に捉える研究を進めていくことで、これらの因子が核内と細胞質内を容易に移動して、その機能を発揮することの証明にもなるかと思われる。一方、siRNA などの CTCF の抑制によってメチル化状態が変貌するかを検討する必要があるかと思われる。

まとめると、インスレーター機構とメチル化機構は互いに独立した機構ではなく、相互に関連性を持っており、がん化に向けて本来のインスレーター機構が果たしてきた役割がメチル化機構に取って代わることで、その局在を核内から細胞質内への移動することが明らかになった。これらの相互作用は発がん過程において重要な役割を担っているものと推察でき、今後のがん研究における一端を担う結果ともいえる重要な知見を提供したものである。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

1. Ikeda S, Imura J, Suzuki K. Protein expression, mRNA expression and gene amplification of DNA methyltransferase 1 in endometrial tumor tissues. *Mol Clin Oncol.* 2013; 1: 423-9.

[学会発表](計1件)

1. 阿部香織、井村穰二、他. 乳腺疾患における CTCF の発現およびメチル化異常との関連に関する検討. 第 74 回癌学会総会、

2015.10.10、名古屋国際会議場、名古屋市.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井村 穰二 (IMURA Johji)

富山大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号 : 80316554