

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840015

研究課題名(和文) PARP阻害剤によるDNAメチル化異常の解析：PARP阻害 = メチル化亢進なのか？

研究課題名(英文) PARP inhibition induced DNA demethylation through downregulation of Dnmt3.

## 研究代表者

藤森 浩彰 (Hiroaki, Fujimori)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：00590043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞においてPARP活性は、DNAメチル化酵素DNMT1の活性を抑制し、ゲノムDNAの脱メチル化状態を保持するため、PARP阻害剤処理はDNAの脱メチル化を誘導すると報告されてきた。マウスES細胞を用いた本研究では、我々はPARP活性は同時にDNMT3の発現誘導に必要であること、Dnmt3がDnmt1と比較して優位であるES細胞では、PARP阻害剤処理によりゲノムDNAの脱メチル化が誘導されることを示した。PARP阻害剤は現在、悪性乳がんに対する新規抗癌剤として注目され臨床試験が進められている。PARP阻害剤の新しい作用点を明らかにすることで、新しい作用機序の開発等へと繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic factors are recently noticed as significant targets for anti-cancer therapy, in which the utility of DNMT 3 inhibition has been demonstrated. It is because DNMT3 overexpressing in several tumors inactivated multiple tumor suppressor genes in methylation-dependent manner and DNMT3 dysfunction in these cancer cells induced cancer cell death through recovering expression of tumor suppressor genes. However, specific DNMT3 inhibitor is now under development. In this study, we demonstrated that Parp-1 is required for Dnmt3 expression in vitro and in vivo and that PARP inhibition suppressed A549 proliferation through reduction of the DNMT3B expression. Since PARP inhibitor demonstrated the significant anti-tumor effect to BRCA-/- cancers with few side effect, enlarged application of the inhibitor with other clinical protocols is hoped. Our current study shows the possibility that PARP inhibitor works as an epigenetic anti-cancer drug for DNMT3 overexpressing tumor.

研究分野：分子生物学

キーワード：PARP阻害剤

1. 研究開始当初の背景

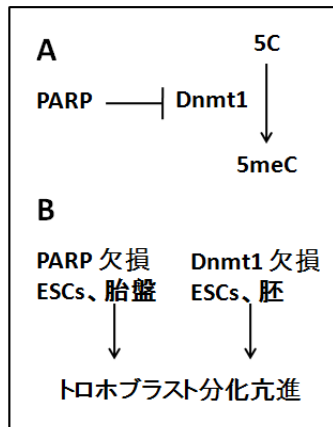
近年、有効な治療法の無い転移・再発乳癌 (triple negative-type) に対する治療標的として注目され臨床試験が進んでいるポリ(ADP リボシル基)合成酵素(PARP)は、DNA 損傷下で DNA 修復酵素に ADP-リボースを付加し、修復応答を活性化させるが、同時に DNA メチル化やヒストンアセチル化の co-factor として、遺伝子発現調節に関与することが知られている。しかし、PARP 阻害剤によるメチル化制御機構に関しては未だ不明な点が多い。

DNA メチル化制御への PARP の関与としては、下記の 2 点がよく知られている。

Parp-1 と転写関連因子の複合体は、ヘミメチル化 DNA をメチル化する酵素である Dnmt1 と結合しその活性を阻害する。

特定の遺伝子座を標的とした研究において、PARP 阻害により DNA メチル化が亢進し、遺伝子発現が低下することが報告されている。

これらの報告から、Parp-1 は Dnmt1 の活性を阻害することで DNA 脱メチル化状態・転写活性を保つというモデルが提唱されている(下図)。



**A: 現在までの提唱モデル。**  
PARPはDnmt1を阻害して脱メチル化を保つ。

**B: PARP欠損、Dnmt1欠損が共にトロホプラスト分化を誘導する。**このことは既存のモデルでは説明できない。

一方、2010年に、「Dnmt1 欠損 ES 細胞及びマウス胚は、ES 細胞が本来分化しないトロホプラストへ分化できる」という興味深い報告が発生の分野でなされた(B)(上図)。このことは、Dnmt1 欠損(脱メチル化を誘導)による表現系と Parp-1 欠損による表現系の類似を意味し、上記提唱モデルと大きく矛盾する。

2. 研究の目的

よって、「PARP 阻害剤のエピゲノム制御メカニズムには、Dnmt1 活性亢進と同時に別のシグナル経路により Dnmt1 欠損下のような DNA 脱メチル化を誘導することが含まれるのではないか」と着想し、この証明とメカニズム解析を本研究課題の目的とする。

3. 研究の方法

Parp-1 のノックアウトによりトロホプラスト分化が誘導されるマウス ES 細胞を PARP 阻害剤処理し、ゲノム DNA の脱メチル化が誘導されるか検討する。

PARP 阻害剤処理を行ったマウス ES 細胞で、DNA メチル化に関する遺伝子の発現変動を調べる。

PARP 阻害剤処理を行ったマウス ES 細胞においてトロホプラストへの分化が亢進するか調べる。

PARP 阻害が、どのようにトロホプラストへの分化を誘導しているか検討する。

PARP-1 がどのように、メチル化因子の遺伝子発現を調節しているか検討する。

4. 研究成果

PARP 阻害剤処理したマウス ES 細胞では、DNA メチル化酵素(Dnmt3a2, Dnmt3b)の発現が低下することを、RNA 及びタンパク質レベルで見出した。Parp-1 ノックアウト ES 細胞でも同様の傾向が認められたことから、PARP 阻害剤は主に Parp-1 活性を阻害することで本形質を誘導していることが示唆された。ゲノム DNA 上の Dnmt3a2, 3b の発現調節領域では、Parp-1 の結合と poly(ADP-ribose)の就職が認められたことから、Parp-1 活性は Dnmt3a2, 3b の発現を直接調節している可能性がある。

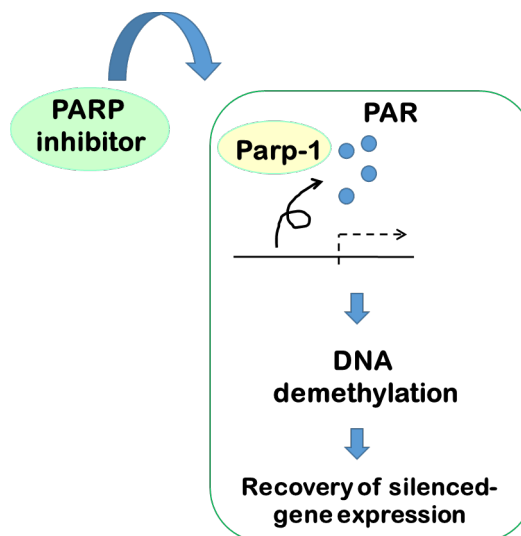
Dnmt3の活性はES細胞ゲノムのメチル化修飾を維持する上で極めて重要であるため、PARP 阻害剤処理によって脱メチル化が生じるか検討した。メチル化依存的免疫沈降法(MeDIP)と CpG マイクロアレイを用いて、PARP 阻害剤処理によりゲノム DNA のメチル化修飾がどのように変化するか調べたところ、メチル化が亢進した領域と減少した領域が共に検出され、全体としては脱メチル化方向に移行していた。脱メチル化が検出された遺伝子の発現レベルは、PARP 阻害剤処理によって増加することが RT-PCR によって確認された。よって、PARP 阻害剤処理は ES 細胞ゲノムの脱メチル化を誘導し、遺伝子発現を上昇させることが示された。

Parp-1 ノックアウト ES 細胞は、トロホプラストへの分化が亢進している。PARP 阻害剤処理により、この表現系が再現するか、その機構は脱メチル化によるものなのかを調べるため、トロホプラストへの分化誘導因子であり Parp-1 ノックアウト ES 細胞で発現が上昇している遺伝子 H19 に着目して検討した。マウス ES 細胞を PARP 阻害剤処理し、胚様体形成法にて分化誘導すると、トロホプラストマーカーの発現上昇とともに、多核の細胞が観察され、遺伝子発現的にも形態的にもトロホプラストが誘導されたと考えられた。PARP 阻害剤処理を行った ES 細胞の H19 領域のゲノム DNA を調べると、DNA の脱メチル化と共にヒストン修飾も転写活性化型に変化していた。過去の報告では、H19 の転写調節領域は Dnmt3 の標的領域であることが報告されており、これらの結果から PARP 阻害剤処理により Dnmt3 発現低下が H19 の発現を上昇させトロホプラストへの分化を亢進させたことが示唆された。

PARP 阻害剤処理による Dnmt3 の抑制効果を in vivo でも検討するため、PARP 阻害剤を一週間連続でマウスに腹腔内投与し、Dnmt3 活性が必須である精子幹細胞への影響を調べた。精巣から RNA を回収して精子形成マーカーの発現レベルを調べると、PARP 阻害剤処理により複数の精子形成マーカーの発現が統計上有意に低下していた。加えて精巣切片を作成して形態学的に検索すると、PARP 阻害剤処理により精子形成が抑制されている領域が一部認められた。よって PARP 阻害剤処理は、in vivo でも Dnmt3 の発現抑制を誘導できることが示された。

PARP 阻害剤は、近年 新規抗癌剤として注目されていると同時に、DNMT3 は制癌剤の標的となりうるということが報告されている。そこで PARP 阻害剤処理がヒト癌細胞でも DNMT3 発現を抑制して癌細胞の増殖を抑制できるか検討した。DNMT3B を高発現する A549 肺癌細胞株を用いた検討では、PARP 阻害剤処理は濃度依存的に DNMT3B の発現を低下させ、逆相関的にサイレンシングされていた癌抑制遺伝子 FHIT の発現を回復させた。加えて PARP 阻害剤処理は、DNMT3B の発現抑制依存的に A549 の増殖を阻害した。よって PARP 阻害剤はヒト癌細胞においても DNMT3B の発現を抑制できることが示された。

以上の結果より、PARP 阻害剤処理は Parp-1 の活性を阻害して Dnmt3a2, Dnmt3b のプロモーター活性を低下させて、DNA の脱メチル化及び関連する表現系を誘導することが示された（右上図）。



< 成果概要 > PARP-1 は PARP-1/PAR 修飾依存的に DNMT3 の発現を維持し、ゲノム DNA のメチル化レベルを維持するが、PARP 阻害剤処理により、DNMT3 の発現が抑制されるとゲノム DNA のメチル化レベルが低下し、エピジェネティックに抑制されていた遺伝子発現が回復する。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 藤森浩彰, 向井大晃, 益谷美都子  
PARP-1はDNMT3の発現を維持する新規調節因子である。  
発がん病理研究会  
2013年8月9日-12日  
沖縄県南城市

2) Hiroaki Fujimori, Hideki Ogino, Hiroaki Mukai, Yasufumi Murakami, Mitsuko Masutani  
Parp-1 has a novel role as Dnmt3 regulator and PARP inhibitor acts as an epigenetic drug recovering silenced expression of tumor-suppressor genes.  
PARP2013  
2013年9月6日-9日  
Quebec city, Canada

3) Hiroaki Fujimori, Hiroaki Mukai, Yasufumi Murakami, Mitsuko Masutani  
Poly(ADP-ribose) polymerase-1 maintains gene silencing through regulation of DNA methyltransferases.  
日本分子生物学会  
2013年12月11-14日  
兵庫県神戸市

4) Hiroaki Fujimori, Hiroaki Mukai, Hiromi Harad, Yasufumi Murakami, Mitsuko Masutani  
PARP-1 positively regulates DNMT3 gene expression  
The PARP Family & Friends:Gene Regulation & Beyond  
2014年4月9日-12日  
Cold Spring Harbor, USA

〔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

藤森浩彰(FUJIMORI Hiroaki)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：00590043

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：