

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860318

研究課題名(和文)慢性炎症によるエピジェネティクス異常と発癌機構への分子生物学的アプローチ

研究課題名(英文)Molecular biological approach to epigenetic abnormalities in inflammation-associated cancers.

## 研究代表者

磯部 智康 (Isobe, Tomoyasu)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・科学研究費研究員

研究者番号：40402341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞においては、ゲノム全域に渡るDNAメチル化レベルの低下が起こることが知られており、ゲノムの不安定性や遺伝子発現異常の原因となると考えられている。我々は最近、慢性炎症を伴う種々の癌でAIDの異所的な発現がみられることなどに着目し、AIDがGADD45と協調的に遺伝子のメチル化されたプロモーターに作用して遺伝子発現制御を攪乱することを明らかにした。しかしながら、AIDによるDNAメチル化レベル低下のメカニズムには未だ不明な点が多い。本研究で、我々はshRNAライブラリーを用いたスクリーニングで、AIDによるDNA低メチル化のメカニズムやその選択性の解明にアプローチした。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation is known to be an important risk factor in cancer. Both global hypomethylation and site-specific hypermethylation in genomic DNA are observed in cancer, and it is believed that these abnormal DNA modifications disturb normal gene expression and affect genomic stability. Recently, we found that activation-induced cytidine deaminase (AID), which ectopically express in various inflammation-associated cancers including *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer, activates methylated promoters and perturbs tumor-related gene expression (Isobe et al, 2013 FEBS Lett.), though the mechanisms which influence these modifications are yet to be defined. In this study, we performed shRNA library screening to reveal the mechanism by which AID induced DNA hypomethylation.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

炎症は、内外のストレスに対する生体防御反応であり、この制御メカニズムの破綻は、様々な病態、疾患の原因となる。慢性炎症は、生活習慣病など各種疾患に共通する基盤病態として重要視されており、癌の重要なリスクファクターの一つとしても知られているが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い (Grivennikov et al, 2010 Cell)。

遺伝子の発現制御は生命現象において最も重要なイベントの一つである。転写は、遺伝子発現を制御する中心的な過程の一つとして、古くから精力的に研究が進められており、この制御機構の異常が種々の疾患の原因となることが広く知られている。慢性炎症の場においても、過剰に産生された炎症性サイトカインが、種々の細胞の転写制御機構を攪乱し、これが慢性炎症の病態形成の一因を担うと考えられている。

近年の研究により、転写制御には古典的な転写開始前複合体の形成過程のほか、エピジェネティクス制御や、転写開始後伸長過程の制御が重要な役割を担うことが明らかになっており、これらの生理的意義や、病態との関わりにフォーカスした研究が注目を集めている。

原癌遺伝子および癌抑制遺伝子の発見以来、遺伝子の変異が発癌の原因となることが広く受け入れられてきた。その一方、近年の研究で、DNA のメチル化修飾をはじめとしたエピジェネティクス異常が、遺伝子発現の異常や染色体の不安定性を引き起こし、同様に発癌の原因となり得ることが明らかになっている。一般に癌細胞では部位特異的な DNA の高メチル化とグローバルな低メチル化が同時に起こるが、特に DNA の低メチル化を引き起こすメカニズムは長い間不明であった (Cedar & Bergman, 2012 *Annu Rev Biochem*; Feinberg & Tycko, 2004 *Nat Rev Cancer*)。

申請者は最近、過剰産生された炎症性サイトカインによって activation-induced cytidine deaminase (AID) の異所的な発現が誘導されることや、ピロリ菌感染に伴う胃癌や大腸炎関連大腸癌など慢性炎症を伴う種々の癌で AID の異所的な発現がみられる (Marusawa et al, 2011 *Adv Immunol*) ことなどに着目し、異所的に発現した AID が GADD45 と協調的に、メチル化されたプロモーターに作用して低メチル化を引き起こし、正常な遺伝子発現制御を攪乱することを明らかにした (Isobe et al, 2013 *FEBS Lett*; 図1)。しかしながら、この研究成果には、下に記すような課題が残されている。

第一に、AID による DNA 低メチル化の選択性、特異性がほとんど不明であることが挙げられる。上記のように、癌細胞においては DNA のメチル化レベルがグローバルに低下すると同時に、癌抑制遺伝子のプロモーター

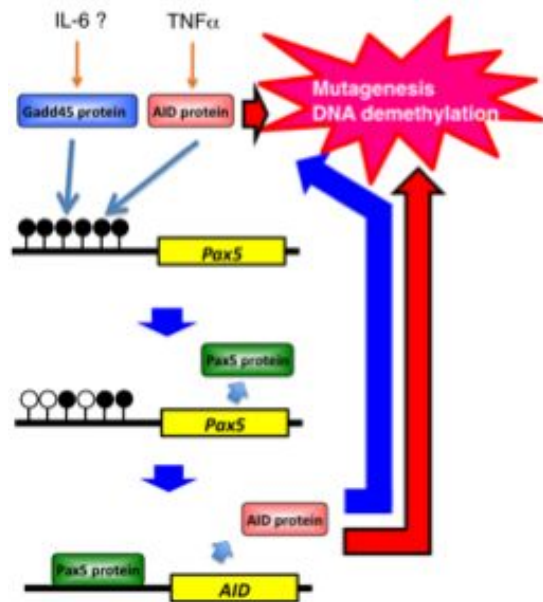


図1 AIDの自己活性化回路の形成モデル

Pax5はリンパ球で特異的に発現し、AIDの発現を正に制御する転写因子である。リンパ球以外の細胞では、Pax5のプロモーター領域は高度にメチル化され、その発現が抑制されている。炎症性サイトカインの作用等で異所的に発現が誘導されたAIDは、Pax5プロモーターに作用し、そのメチル化レベルを下げる。これによりPax5の異所的な発現が誘導され、AIDプロモーターに作用してAIDの発現を増強する。こうして発現が増強されたAIDにより、点変異の導入や癌関連遺伝子プロモーターの低メチル化が、より効率的に行われる。

領域など、部位特異的なメチル化レベルの上昇が見られることが分かっている。このため、癌における遺伝子発現異常のメカニズムの解明にはAIDの作用の特異性・選択性を明らかにすることは重要な課題と言える。さらに、癌細胞におけるグローバルな低メチル化は、遺伝子プロモーター領域に留まらず、非コード領域やスパーサー領域にも及び、これが癌の染色体不安定性に寄与すると考えられている。したがって、染色体全体を視野に入れた特異性の検証が求められる。

第二に、AIDによるDNA低メチル化誘導のメカニズムに不明な部分が多いことが挙げられる。DNAの脱メチル化機構は大きく受動的(DNA複製依存的)脱メチル化と、能動的(複製非依存的)脱メチル化の2つに分類される。研究が先行していた前者については、DNAメチル化酵素阻害剤Vidazaが骨髄異形成症候群の治療薬として実用化されるなど、すでに医療応用までがなされている。一方、後者については、(1)加水分解により、メチル基を直接除去するモデル、(2)AIDによるT/Gミスマッチの形成と塩基除去修復による脱メチル化モデル、(3)Tetタンパク質による5-ヒドロキシメチルシトシンの合成と連続的酸化反応による脱メチル化モデル (Franchini et al, 2012 *Annu Rev Genet*)

が提唱されているが、個々のプロセスに関わる分子の特定はほとんど成されておらず、そのメカニズムは未だ「仮説」の域を出ない。AID による低メチル化誘導に関わる遺伝子を特定することは、能動的脱メチル化機構の解明につながり、新規創薬標的候補分子の同定にも直結する。

## 2. 研究の目的

本研究では、「1. 研究開始当初の背景」に記した、AID を介した DNA 低メチル化の研究をさらに発展させ、残された課題にアプローチしていく。

癌細胞におけるグローバルな低メチル化は、遺伝子のプロモーター領域に留まらず、非コード領域やスペーサー領域にも及ぶため、既存の MCAM (Methylated CpG island amplification-microarray) 解析等では、選択性、特異性の十分な検証ができない危険がある。

また、AID を介した DNA 低メチル化のメカニズムは明らかになっていない部分も多く、これに関与する分子も既知のものはごく僅かである。上記の選択性、特異性が生じる原因として、AID を DNA 上の作用点にガイドする分子の存在、あるいは、AID が非作用点にアクセスするのをブロックする分子の存在などを仮定することができる。このため、AID による DNA の低メチル化に寄与する遺伝子の全容を明らかにすることは、選択性、特異性が生じる原因の究明とも密接に関与する。

これらのアプローチに十分な「網羅性」を与えるため、次世代シーケンサー (NGS) を用いた解析を行う。NGS による解析は、データ量の豊富さ、高い網羅性と、ユニークな情報を得られることなどから、過去 10 年で急速に普及が進んでおり、また近年ベンチトップ型の NGS 装置が各社から開発、販売されたことがこれに拍車をかけ、生物学研究者にとって、身近なものとなっている。しかしながら、NGS によって得られる膨大なデータの解析処理技術については、典型的な遺伝子変異の解析やトランスクリプトーム解析などの、ごくごく限られた場合を除き、グローバルスタンダードと言えるような方法が確立されていないことも多く、個々の研究者が独自に定義したパラメーターを指標として評価されることも珍しくない。本研究においては、ライブラリースクリーニング等における NGS データ解析技術の検討、至適化を行い、その成果を発信していくことも 1 つの目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、我々が近年報告した、培養細胞を用いた AID / GADD45 の協調作用による DNA のメチル化レベル低下モデルを利用し、

DNA 低メチル化のメカニズムやその選択性、特異性にアプローチする。既に報告したレポーターシステムを改変、至適化し、shRNA ライブラリースクリーニングを行う。

これにあたって、九州工業大学生命情報工学講座との共同研究により、NGS 解析の定量性、網羅性を最大限に生かすためのデータ処理方法を検討、最適化を行う。

## 4. 研究成果

レポータープラスミドを予め *in vitro* でメチル化しておき、これを培養細胞に導入すると、レポーター活性の抑制が観察される (図 2)。また、このとき AID および GADD45 を共発現させておくと、メチル化されたレポーターにおいて、レポーター活性の一部が回復する (図 3)。

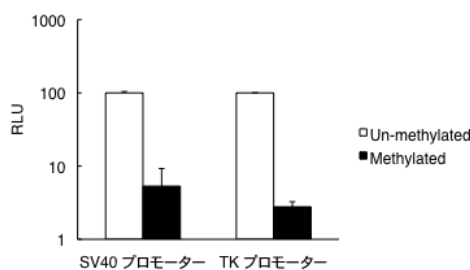


図2. メチル化によるレポーター活性の低下

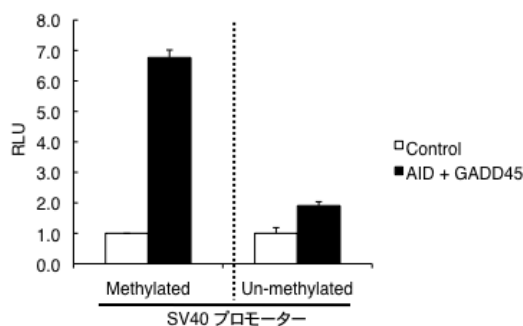


図3. メチル化レポーターに特異的なAID/GADD45の協調作用

このレポーターシステムを利用し、shRNA ライブラリーをスクリーニングすることで、AID、GADD45 と協調的に DNA の低メチル化を誘導する遺伝子を特定することが期待できる。

当初、レポーター遺伝子に GFP を用いた実験系で、蛍光強度を指標にライブラリーを導入した細胞をスクリーニングし、目的の遺伝子を同定することを目指して実験系の至適化を行った。しかしながら、この系ではスクリーニングに耐え得る十分な感度が得られず、バックグラウンドとの区別が非常に困難であった。このため、当初の計画を改変し、レポーター遺伝子およびスクリーニング法

の再検討を行った。この結果、薬剤耐性遺伝子をレポーターに用いることで、スクリーニングが可能であるという結論を得た。この系では、バーコード配列を付与したプール型 shRNA ライブラリー (Collecta 社) を用い、薬剤濃度を調整して薬剤感受性が低下した細胞を濃縮し、さらに NGS を利用してバーコード配列を定量的に読み取ることで、偽陽性および偽陰性クローンを排除するように工夫した (後記)。このスクリーニングによって得られた候補遺伝子は、新規の慢性炎症疾患治療分指標的となる可能性がある。

前記のように、近年の NGS 解析を始めとした新技術の普及により、転写におけるエピジェネティクス制御や、転写開始後伸長過程の制御の重要性があきらかになりつつある。NGS による大規模情報の解析は非常に強力な研究ツールである一方、得られた膨大なデータの解析処理技術、評価の方法などは未だ議論が絶えない。「2. 研究の目的」にも記したように、この解析法、評価法の整備は本研究の遂行にも必須の課題である。我々は九州工業大学生命情報工学講座との共同研究により、この問題に当たった。その成果のとして、前記 NGS によるプール型 shRNA スクリーニングの評価法として、それぞれの shRNA の倍率変化から算出された統計量 (Rank product) を用いることで、従来法より高い精度で評価できる明らかにされた。この知見は「冬の合同若手ワークショップ 2015」で発表され (飯田ら, 2015 年 2 月) 若手研究者らの大きな反響を得た。また、この評価方法を利用した薬剤の作用機序に関する研究について、今夏の国際学術誌での成果発表を目標に準備を進めている (Tateno *et al*, 投稿準備中)。

また、我々は同時に、転写伸長因子 DSIF に着目し、この分子と協調的に転写の伸長および転写に共役した RNA の品質管理に寄与すると考えられる分子 p50 を同定している。CRISPR-Cas9 システムを用いて p50 をノックアウトした細胞株を樹立し、新規に合成された RNA および、Steady state レベルの RNA の NGS 解析を行い、これらのデータから、RNA の新規合成と、品質管理への p50 の寄与を検証法の開発を行った (磯部ら 2015 年 8 月 転写サイクル合同班会議; 飯田ら, 2016 年 2 月 冬の合同若手ワークショップ 2016)。この成果は本年度を目処に国際学術誌においても発表する見込みである。

#### 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 2 件)

1. Cao, Q., Yamamoto, J., Isobe, T., Tateno, S., Murase, Y., Chen, Y., Handa, H. and

Yamaguchi, Y. Characterization of human transcription elongation factor Rtf1: Evidence for non-overlapping functions of Rtf1 and the Paf1 complex. *Mol. Cell Biol.* **35**, 3459-3570, 2015. (査読あり)

2. Yamamoto, J., Hagiwara, Y., Chiba, K., Isobe, T., Narita, T., Handa, H., and Yamaguchi, Y. DSIF and NELF interact with Integrator to specify the correct post-transcriptional fate of snRNA genes. *Nat. Commun.* **5**, 4263, 2014. doi: 10.1038/ncomms5263. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

1. 磯部智康, 山口雄輝: 転写伸長因子 DSIF の CTR を介した転写制御機構の解析. 転写サイクル合同班会議 2015 年 8 月 (静岡県伊東市)
2. 磯部智康, 千葉国俊, 山口雄輝: 転写伸長因子 DSIF のリン酸化の転写伸長反応への寄与の解析. 冬の合同若手ワークショップ 2015 2015 年 2 月 (群馬県渋川市)
3. 磯部智康, 千葉国俊, 山口雄輝: 転写伸長因子 DSIF にリン酸化依存的に相互作用する因子の機能解析. 転写サイクル合同班会議 2014 年 8 月 (山梨県苗吹市)
4. 磯部智康, 吉崎和幸, 山口雄輝: Activation-induced cytidine deaminase auto-activates and triggers aberrant gene expression. 冬の合同若手ワークショップ 2014 2014 年 1 月 (群馬県安中市)

[その他]

ホームページ等

<http://yamaguchi.bio.titech.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 智康 (ISOBE TOMOYASU)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・

科学研究費研究員

研究者番号：40402341