

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860494

研究課題名(和文) 消化器がんにおけるDNA脱メチル化酵素TET1の役割の検討～がんの発生と進展～

研究課題名(英文) Contribution of TET1 to a malignant phenotype in digestive cancer cells.

研究代表者

工藤 洋太郎 (Kudo, Yotaro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90608358

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)：TETファミリータンパクによりDNAの脱メチル化反応が始まる。我々の以前の研究結果はDNA脱メチル化反応ががんの生物学的特性に関与する可能性を示唆していた(Kudo Y. Cancer Sci. 2012)。

我々は次にTET1に注目し、そのがん細胞における機能解析に着手した。ノックダウンがん細胞株をもちいた表現形解析、遺伝子メチル化解析、トランスクリプトーム解析、およびクロマチン免疫沈降法による検討の結果、TET1ノックダウンにより有糸分裂関連遺伝子群とのTET1結合が減少し、そのメチル化レベル増加に伴い転写が減少することで有糸分裂異常が惹起され、がんの増殖抑制をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：TET family proteins initiate the DNA demethylation process (Tahiliani M. Science 2009, Ito S. Nature 2010, Ito S. Science 2011, He YF. Science 2011). Our previous study indicated that DNA demethylation was involved in biological properties of cancer cells.

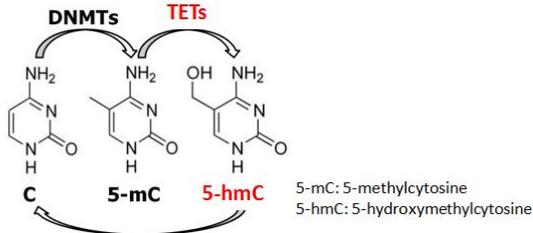
In this study, we tried to shed light on the roles of TET1 in cancer cells. TET1-knocked down cancer cells were subjected to genomic methylation analysis, expression analysis, and chromatin immunoprecipitation analysis. TET1 depletion reduced the binding of TET1 protein to the mitotic genes following to the enhanced methylation of these genes, finally resulting in impaired mitosis and impaired proliferation of cancer cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：DNA脱メチル化 有糸分裂異常 消化器がん

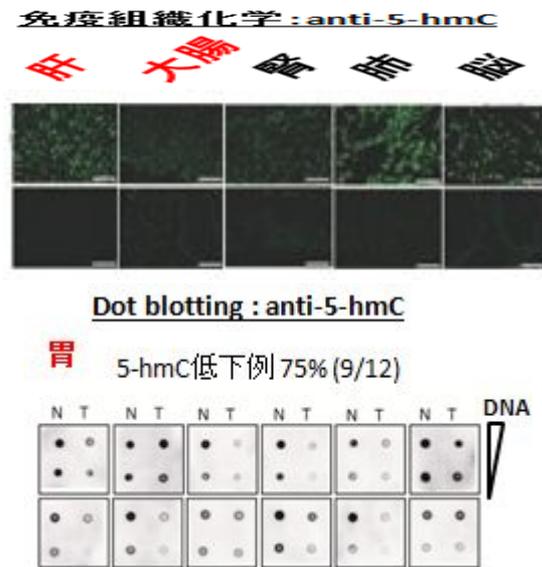
1. 研究開始当初の背景

TET ファミリータンパクによるメチル化シトシン(mC)のヒドロキシメチル化シトシン(hmC)への変換から DNA の脱メチル化反応は始まる(Tahiliani M. Science 2009, Ito S. Nature 2010, Ito S. Science 2011, He YF. Science 2011) (図 1)。



(図 1 TET による DNA 脱メチル化反応)

我々の、以前の検討において、正常組織細胞と比較してがん細胞では hmC が著明に低下していることが示された(Kudo Y. Cancer Sci. 2012)。この結果は DNA 脱メチル化反応の変化ががん細胞の生物学的特性に關与する可能性が示唆するものであった (図 2)。



(図 2 ヒト各臓器の腫瘍部における 5-hmC 含有量の検討)

2. 研究の目的

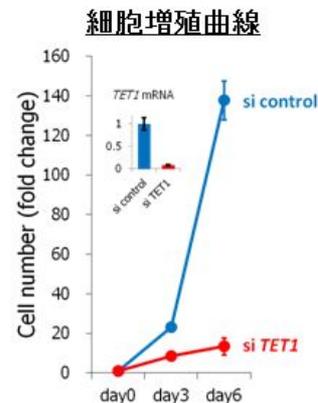
そこで我々は TET1 分子に注目し、それが消化器領域がんなどの固形腫瘍においていかなる働きをもつのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

培養がん細胞株において TET1 遺伝子をノックダウンし、まずはその表現型を観察した。ノックダウンがん細胞の遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析により網羅的に評価し、表現型の責任遺伝子群を同定した。ゲノムワイドな遺伝子のメチル化あるいはヒドロキシメチル化解析は、DNA 免疫沈降/次世代シーケンシング解析法によりおこない、上記注目遺伝子群のメチル化も評価した。TET1 分子の結合はクロマチン免疫沈降法により解析した。

4. 研究成果

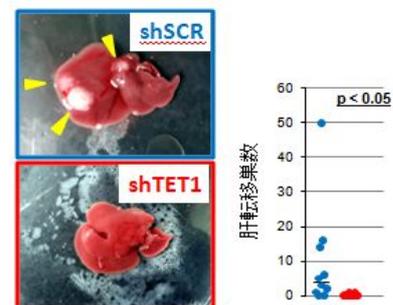
大腸がん細胞株、肝がん細胞株、膵がん細胞株において TET1 遺伝子をノックダウンしたところ、がん細胞の増殖速度が低下した (図 3)。



(図 3 TET1 遺伝子ノックダウン大腸がん細胞株の増殖速度)

また、マウスモデルを用いた検討では TET1 遺伝子をノックダウンした大腸がん細胞株は肝転移形成能が低下していた (図 4)。

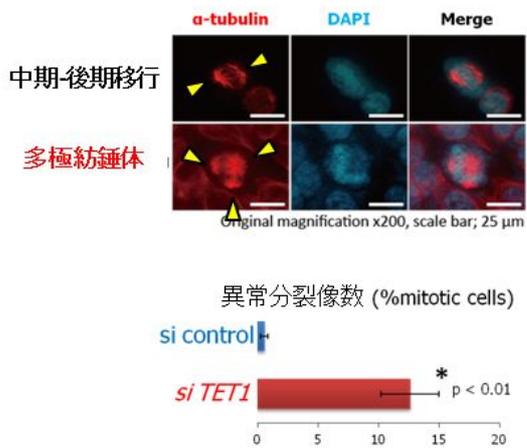
In vivo 転移モデル



(図 4 TET1 遺伝子ノックダウン大腸がん細胞によるマウス肝転移形成能)

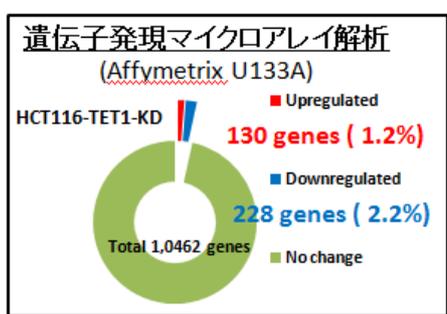
詳細な観察の結果、TET1 遺伝子のノックダウンによりがん細胞では有糸分裂異常が有意に多く生じており (図 5)、増殖抑制の一因

と考えられた。



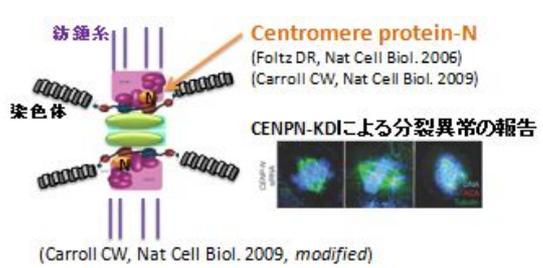
(図5 TET1遺伝子ノックダウン大腸がん細胞株の有糸分裂異常像)

網羅的に遺伝子発現解析をおこなったところ、発現増加した遺伝子は1.2%(130/10462遺伝子)、発現低下した遺伝子は2.2%(228/10462遺伝子)認めた(図6)。



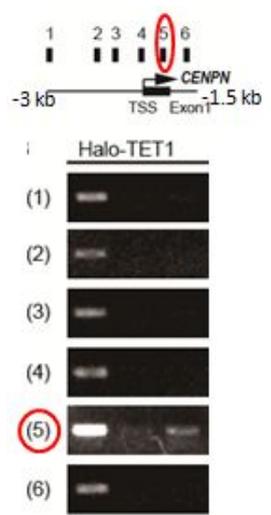
(図6 TET1遺伝子ノックダウン大腸がん細胞株の遺伝子発現マイクロアレイ解析)

発現低下を示した遺伝子の多くは、Gene Set Enrichment解析により細胞分裂、有糸分裂、細胞増殖に関わる遺伝子が多く含まれることがわかった。その中に含まれるセントロメアタンパク遺伝子群(CENP遺伝子)に注目した。CENP遺伝子はその発現低下が有糸分裂異常を引き起こすことが既に報告されている(Foltz DR. Nat Cell Biol 2006)(図7)。



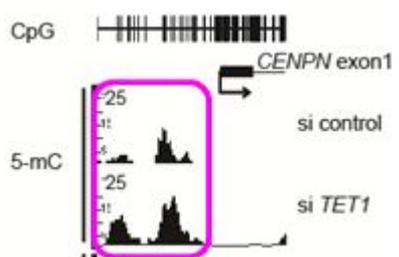
(図7 セントロメアタンパク群)

クロマチン免疫沈降法により TET1 分子は CENP 遺伝子に結合することが明らかとなった(図8)。



(図8 クロマチン免疫沈降法による CENPN 遺伝子への TET1 タンパクの結合解析)

さらに、TET1 遺伝子のノックダウンにより CENP 遺伝子群の CpG-shore とされる領域のメチル化レベルが増加していた(図9)。



(図9 メチル化 DNA 免疫沈降-PCR 法による TET1 遺伝子ノックダウン大腸がん細胞株の DNA メチル化解析)

以上の結果は、TET1 の機能阻害が CENP 遺伝子の発現抑制を介した有糸分裂異常惹起することで、がんの増殖抑制効果をもたらす可能性を示すものである。

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0件)

[学会発表](計2件)

- (1) 工藤洋太郎、立石敬介、永江玄太、中塚拓馬、山本恵介、浅岡良成、田中康雄、池上恒雄、白井聖一、米沢理人、関元昭、油谷浩幸、小池和彦. TET1 Regulates Proper Mitotic Process in Cancer Cell.、第73回日本癌学会

学術総会. 2014年9月25~27日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(2) 工藤洋太郎、立石敬介、永江玄太、山本恵、中塚拓馬、浅岡良成、田中康雄、池上恒雄、白井聖一、関元昭、米沢理人、油谷浩幸、小池和彦. 消化器癌における DNA 脱メチル化酵素 TET1 の役割の検討. 第 101 回日本消化器病学会総会. 2015年4月23~25日. 仙台国際センター(宮城県仙台市).

〔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：
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

工藤 洋太郎 (KUDO, Yotaro)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90608358

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：