

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19390100

研究課題名 (和文) 非 CpG アイランド領域シトシンメチル化の包括的病態解析

研究課題名 (英文) A Comprehensive Analyses of Pathophysiological Significance of Cytosine Methylation in non-CpG-island

研究代表者

北澤 荘平 (SOHEI KITAZAWA)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授

研究者番号：90186239

研究代表者の専門分野：病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：エピジェネティクス、CpG-island、DNA メチル化

1. 研究計画の概要

CpG-island は、種々の遺伝子の転写調節領域に存在し、生理的な状態ではメチル化を受けることは少ない。この CpG-island 領域のメチル化は、遺伝子発現を抑制的に制御し、発がんや癌の進展過程で癌抑制遺伝子の不活化に関与している。私どもは、これまでその病態生理における意義が殆ど知られていない非 CpG-island のシトシンメチル化に注目し、この非 CpG-island 領域のメチル化、脱メチル化による転写制御について病理組織学的観察、つまり、形態学に即したエピジェネティクスの病的意義につき検討することを目的として計画を行った。特に、顕微鏡的に認識される「特定の形態的变化を示す病変部分」における遺伝子発現制御の解析を、遺伝子プロモータ領域の非定型的なメチル化シトシンの解析を中心に行うことを目標として、病理組織標本上で mRNA や蛋白発現の評価をするとともに、形態学的特徴に基づいて特定部位から微小組織を選択的に採取して、対象遺伝子に関するメチル化シトシンの検出を行う。

2. 研究の進捗状況

(1) TGF β は腫瘍細胞の増殖を促進するが、偽受容体 BAMBI は TGF β /BMP シグナルを遮断して、細胞増殖や骨形成を抑制する。膀胱癌、大腸癌、前立腺癌で、CpG メチル化による BAMBI 発現低下に関して、病理組織検体を用いて解析した。ミャンマーと本邦の検体を解析して、組織型が high grade 群では low grade 群よりも CpG メチル化が高度で BAMBI 発現が低く、ミャンマーの症例では本邦よりもメチル化が高頻度であった。平成 20 年度、21 年度は、各種膀胱癌培養細胞

株を用いて、TGF β シグナルの細胞増殖、アポトーシス、細胞遊走能への効果を検討し、BAMBI の強制発現、siRNA の効果を解析した。BAMBI 強制発現は、膀胱癌細胞株のアポトーシスを増加させ、TGF β による細胞遊走を抑制することを明らかにした。

(2) TATA-box 近傍の 1 カ所のメチル化による遺伝子発現抑制のあらたなメカニズムの発見をし、報告した。マウス諸臓器と培養細胞で RANKL 発現と CpG メチル化を比較検討すると、肝臓など RANKL を発現しない諸臓器では骨に比して転写開始部位以下のメチル化が高頻度で、しかも TATA-box の 3 塩基上流側の CpG のメチル化が高率に検出されたが、RANKL を発現する骨芽細胞では、同部位にメチル化がなかった。これは、破骨細胞分化因子 RANKL 遺伝子プロモータ領域の TATA-box 直上の(CGaggTTTATAA)は、メチル化シトシン結合蛋白 (MeCP2) の DNA 認識配列 (CpG と 3-5 塩基間をおいた 4 個の連続した A or T 配列, Mol Cell, 2005)であり、この部位の MeCP2 との結合は TATA-box 結合蛋白 (TBP)との結合を阻害して転写を抑制することを発見し、世界に先駆けて報告した。申請者らは更に BAMBI や SFRP-4 遺伝子プロモータについても、RANKL 遺伝子同様に、TATA-box 近傍に CpG 配列が存在しており、TATA-box 近傍のメチル化による MeCP2 蛋白結合を介した調節機構は、特殊なものではなく、多くの遺伝子の発現制御システムに関与する、新たなエピジェネティクス遺伝子発現制御機構であることを見い出している。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。代表者はこ

の研究期間中に特命教授に昇任し、独立した研究室で積極的に計画の推進に努めている。分担者もそれぞれ臨床の立場や基礎病理学の立場から研究の推進を行っている。また、神戸大学病理学分野の研究室の教員や大学院生の献身的な研究への協力参画により、当初の計画を達成することが出来た。

4. 今後の研究の推進方策

推進方策には当初の計画より大きな変更点はなく、これまでに研究分担者が個々に行ってきた研究の総括を行い、共同研究、協同成果として報告を行う。分担者の武中篤史が2010年7月より鳥取大学へ主任教授として転出を予定しており、成果のとりまとめのためには学外で数回程度の会合を行う必要があり、国内の学会総会を利用して緊密な研究交流を進める。また現在進行中の検討課題である酸化ストレスや慢性炎症統発性腫瘍とエピジェネティクスの関連において、CpG非依存性のメチル化を sodium bisulfite mapping 法にて検討を更に進める。Dnmt3bによる de novo メチル化が先行し、さらに持続的酸化ストレスが除去された後には、主として dnmt1 により、CpG 配列依存的に維持メチル化が保存されていくことを包括的に解析する。

5. 代表的な研究成果

(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 45 件)

- ① Sann Sanda Khin, Kitazawa R, Win N, Than TA, Mori K, Kondo T, Kitazawa S, BAMBI gene is epigenetically silenced in a subset of high-grade bladder cancer, *Int J Cancer*, 125, 328-338, 2009, 査読あり
- ② Takahashi Y, Iida K, Takeno R, Kitazawa R, Kitazawa S, Kitamura H, Fujioka Y, Yamada H, Kanda F, Ohta S, Nishimaki K, Fujimoto M, Kondo T, Iguchi G, Takahashi K, Kaji H, Okimura Y, Chihara K, Hepatic failure and enhanced oxidative stress in mitochondrial diabetes, *Endocr J*, 55, 509-14, 2008, 査読あり
- ③ Darwanto A, Kitazawa R, Kondo T, Kitazawa S, MeCP2 Expression and Promoter Methylation of Cyclin D1 Gene are Associated with Cyclin D1 Expression in Developing Rat Epididymal Duct, *Acta Histochem Cytochem*, 41, 135-142, 2008, 査読あり
- ④ Ishii J, Kitazawa R, Mori K, McHugh K. P., Morii E, Kondo T, Kitazawa S, Lipopolysaccharide Suppresses RANK Gene Expression in Macrophages by Down-Regulating PU.1 and MTF, *J*

Cellular Biochem, 105, 896-904, 2008, 査読あり

- ⑤ Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W, Inoue K, Kitazawa R, Kitazawa S, Matsuki Y, Hiramatsu R, Masubuchi S, Omachi A, Kimura K, Saito M, Amo T, Ohta S, Yamaguchi T, Osumi T, Cheng J, Fujimoto T, Nakao H, Nakao K, Aiba A, Okamura H, Fushiki T, Kasuga M, FSP27 Contributes to Efficient Energy Storage in Murine White Adipocytes by Promoting the Formation of Unilocular Lipid Droplets, *J Clin Invest*, 118, 2808-2821, 2008, 査読あり
- ⑥ Niemhom S, Kitazawa S, Kitazawa R, Maeda S, Leopairat J, Hypermethylation of Epithelial-cadherin Gene Promoter is Associated with Epstein-Barr Virus in Nasopharyngeal Carcinoma, *Cancer Detect Prev*, 32, 127-134, 2008, 査読あり
- ⑦ Kondo T, Kitazawa R, Yamaguchi A, Kitazawa S, Dexamethasone Promotes Osteoclastogenesis by Inhibiting Osteoprotegerin through Multiple Levels, *J Cell Biochem*, 103, 335-345, 2008, 査読あり
- ⑧ Kitazawa R, Kitazawa S, Methylation Status of a Single CpG Locus 3 Bases Upstream of TATA-box of RANKL Gene Promoter Modulates Cell- and Tissue-specific RANKL Expression and Osteoclastogenesis, *Mol Endocrinology*, 21, 148-158, 2007, 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

- ① サン サンダキン, 北澤理子, 近藤武史, 森清, タイタンエイ, ネウイン, 北澤荘平, 日本とミャンマーにおける膀胱腫瘍進展過程におけるBAMBI遺伝子のエピジェネティクス制御の変化, 第66回日本癌学会学術総会, 2007.10.3-5 (横浜)

[図書] (計 2 件)

- ① Kitazawa S, Mori K, kondo T, Fujimoto M, Kitazawa R, DNA Methylation Research Trends, Epigenetic roles of CpG methylation at non-CpG-islands revealed by morphology-oriented epigenetic research (Editor: Kobayashi TB), pp43-pp66, Nova Science Publishers, New York, 2007