

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791516

研究課題名（和文） テーラーメイド医療に向けたDNAエピジェネティクス定量

研究課題名（英文） The quantitative analysis of epigenetics for tailor-made cancer therapy

研究代表者

松崎 秀信（MATSUZAKI HIDENOBU）

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：70325124

研究成果の概要（和文）：

初年度はエピジェネティクスの解析及び定量手法の確立を目指した。口腔癌細胞株を7株、対象は抗癌剤感受性に関連するMGMT遺伝子(06-methylguanine DNA methyltransferase)である。メチル化の定量的検討にはbisulfite DNAのPCR後にTAKローニングし、シーケンシングした。結果、細胞株間でのメチル化の多寡を半定量的に解析出来た。さらに、ChIP アッセイによる定量法も検討した。次年度は、抗癌剤FR901228の標的の特定を目指した。FR901228投与前後の各細胞株での血管新生関連遺伝子発現変化検討として、リアルタイムRT-PCRでの網羅的解析を行った。その結果、FR901228投与後において、matrix metallo proteinase (MMP) ならびにTissue inhibitor of metallo proteinase(TIMP)発現が低下する細胞株を数株認めた。さらに、HUVEC(血管内皮細胞)への影響を検討により、血管新生能が低下した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we examined the effects of FR901228, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, on epigenetic regulation of gene expression in oral cancer cell lines. The epigenetic status was quantified before and after FR901228 treatment via chromatin immuno-precipitation assay (ChIP). The methylation status was also quantitatively examined after 5-aza-dC/ FR901228 treatment. Moreover, the altered-expression of genes related to angiogenesis and invasion may contribute to the recuperation of biological functions linked to FR901228 such as an inhibitory effect on tumor angiogenesis and cell invasion. These results indicate that FR901228 and its target genes may be excellent leads for future studies on the potential benefits of HDAC inhibitors and epigenetics in cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学

### 1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスは、各種癌関連遺伝子プロモーターに生じるメチル化、アセチル化に代表されるDNAの塩基配列の変異を生じない遺伝子発現調節機構のことである。エピジェネティクスの生じる部位や、その総量は、転写発現を左右し、ヒト癌の発生段階、ならびにその予後に関連する。これらのDNAに生じるエピジェネティクスを定量出来れば、癌の発生解明や抗癌剤の治療効果、予後判定に役立つ。しかし、その検出は難しく、また定量性も低い。

そこで申請者は、エピジェネティクスを生じたDNAを免疫学的特異的に沈降させるクロマチン免疫沈降法(Chromatin immunoprecipitation assay, 以下 ChIP assay)とサザンブロットを利用した新DNA エピジェネティクス定量法を考案した。

近年、エピジェネティクスの量的変化が癌の臨床診断において重要であることは明らかとなってきたものの、その定量性の不安定さ、感度の低さ等により、臨床応用には至っていない。当該研究の癌細胞株をモデル実験として、信頼性の高い定量法を確立出来れば、患者毎のエピジェネティクスの変化量に基づく癌の悪性度や治療予後予測が可能となり、臨床応用への新たな一歩となる。また、エピジェネティクスは化学療法予後との関連も指摘されており、今回のエピジェネティクス標的型『分子標的抗癌剤』FR901228 スクリーニングテストへの応用

は、世界初の試みである。

### 2. 研究の目的

本研究では、DNA エピジェネティクス定量法を確立し、抗癌剤について評価が行えるかどうかを検討する。

(1) 平成 20 年度：エピジェネティクス定量法とその定量性の確立。

(2) 平成 21 年度：分子標的抗癌剤 FR901228 の標的血管新生阻害遺伝子の特定と、それらに生じるエピジェネティクスの変化量に基づく血管新生阻害効果スクリーニングテストの確立。

以上を当初における目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 平成20年度

エピジェネティクス定量法とその定量性の確立。

①ChIP assayは、転写因子のDNA上へのリクルートを検討する手法である。エピジェネティクスの制御を受ける遺伝子では、そのDNA CG部に生じたメチル基を介して、エピジェネティクス関連タンパクが結合する。当該研究では口腔癌細胞株を用いて、結合タンパクとDNAが結合させて免疫沈降し、エピジェネティクスを受けるDNAプールを得る。

メンブレン上にDOT状にblottingし、薬剤耐性遺伝子認識プローブをhybridizationさせる。そのシグナル強度を数値化し、各遺伝子のエピジェネティクスを定量する。bisulfite sequencing (従来法)にてエピジェネティクス量の割合を算出し、当該法との定量性を比較検討する。

## (2)平成21年度

分子標的抗癌剤FR901228の標的血管新生阻害遺伝子の特定と、それらに生じるエピジェネティックスの変化量に基づく血管新生阻害効果スクリーニングテストの確立。

① 細胞株での各血管新生関連遺伝子の発現状況とFR901228投与による発現変化の検討。  
DNAチップを用いて、FR901228投与前後のRNAで発現変化した遺伝子を検索する(解析は外部機関に依託)。

② FR901228によるヒストンアセチル化の定量によるスクリーニングテスト確立。  
上記の血管新生候補遺伝子に生じるヒストンアセチル化を定量し、その発現変化と比較し、血管新生阻害効果のスクリーニングテストとしての可能性を検討する。

## 4. 研究成果

### 平成20年度

本年度はエピジェネティックスの解析及び定量手法の確立を目指した。

口腔癌細胞株を7株(HSC4, HSC3, HSC2, KB, SAS, Hep2, HO-1-u-1)培養した。これらの細胞株より抽出したDNAをbisulfite処理し、遺伝子のプロモーターCpGに生じるメチル化を検討した。検討に際して、候補とした遺伝子はMGMT(06-methylguanine DNA methyltransferase)である。同遺伝子がコードする酵素MGMTは、抗癌剤の一種であるアルキル化剤に対する細胞感受性を反映するとして注目されている。MGMT遺伝子の発現制御機構は、epigeneticsを主体としているとされ、中でもメチル化による制御が知られていることから、今回の候補とした。メチル化の検討にはbisulfite sequencingを行った。

bisulfite sequencingに際しては、bisulfite後のDNAを対象に、PCRにてMGMT遺伝子プロモ

ーター部分を増幅、TA cloningし、各細胞株ごとに10~20クローンをピックアップ、sequencingした。以降、sequencingでのメチル化CpGの割合を基準とすることとした。結果、HSC4, HSC3, HSC2, KB株は、メチル化は少なく、一方、SAS, Hep2, HO-1-u-1株においてはメチル化が多いことが分かった。現在は、ChIP assayによるメチル化定量を行うべく、DNAの断片化について条件設定調整中である。また、ChIP assayに用いるepigenetics関連タンパク群について、抗体を検討している。HDAC1(histone deacetylase 1)、MeCP2などを候補とすることとした。

平成21年度は、分子標的抗癌剤FR901228の標的血管新生阻害遺伝子の特定と、それらに生じるエピジェネティックスの変化量に基づく血管新生阻害効果スクリーニングテストの確立を目指した。研究計画当初、DNAチップを用いて、FR901228投与前後のRNAで発現変化した遺伝子の検索を外部機関に依託予定としていたが、SuperArray社 RT2 Profiler PCR Arraysを用いたリアルタイムRT-PCR(カタログ番号APHS-028)での網羅的血管新生関連遺伝子解析が可能となったため、ヒト口腔癌由来細胞株7株(HSC4, HSC3, HSC2, KB, SAS, Hep2, HO-1-u-1)についてFR901228投与前後の各血管新生関連遺伝子発現変化を検討した。RT2 Profiler PCR Arraysは、血管新生関連遺伝子として、転写因子群、接着因子群、サイトカイン、ケモカイン群、プロテアーゼ、各種阻害因子とマトリックスタンパク群、増殖因子とレセプター群を対象として作製されたキットを用いた。その結果、FR901228投与後において、matrix metallo proteinase (MMP)ならびにTissue inhibitor of metallo proteinase (TIMP)発現が有意に低下する細胞株を数株認めた。さらに、KURABO社 血管新

生キットを用いて、FR901228のHUVEC(血管内皮細胞)の管腔構造形成への影響を検討したところ、FR901228濃度依存的に管腔構造形成が低下し、血管新生能が低下することを示唆することが出来た。今後は、RT2 Profiler PCR Arraysで得られたFR901228ターゲット遺伝子を対象として、その制御機構などを検討していきたいと考えている。

#### 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)

①Matsuya R, Kuroda M, Matsumoto Y, Kato H, Matsuzaki H, Asaumi J, Murakami J, Katashima K, Ashida M, Sasaki T, Sei T, Himei K, Katsui K, Katayama N, Takemoto M, Kanazawa S, Mimura S, Oono S, Kitayama T, Tahara S, Inamura K.

A new phantom using polyethylene glycol as an apparent diffusion coefficient standard for MR imaging.

Int J Oncol. 査読有、Vol. 35、  
No. 4、2009、pp. 893-900

②Matsumoto Y, Kuroda M, Matsuya R, Kato H, Shibuya K, Oita M, Kawabe A, Matsuzaki H, Asaumi J, Murakami J, Katashima K, Ashida M, Sasaki T, Sei T, Kanazawa S, Mimura S, Oono S, Kitayama T, Tahara S, Inamura K.

In vitro experimental study of the relationship between the apparent diffusion coefficient and changes in cellularity and cell morphology.

Oncol Rep. 査読有、Vol. 22、  
No. 3、2009、pp. 641-648

[学会発表] (計1件)

①村上 純, 畦坪 輝寿, 松崎 秀信, 柳 文修, 浅海 淳一

1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid(DHNA)投与による骨吸収抑制作用について  
第50回日本歯科放射線学会総会  
平成21年5月29-30日  
大阪国際会議場(グランキューブ大阪)

[図書] (計1件)

①Jun Murakami et al. Nova Science Publishers, Inc. Drug Resistant Neoplasms. 2009, 38

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

松崎 秀信 (MATSUZAKI HIDENOBU)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号: 70325124