

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08392

研究課題名(和文) DNA脱メチル化技術を用いた前立腺癌細胞増殖に關与する高度メチル化遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of hypermethylated genes associated with increased cell proliferation of prostate cancer using DNA demethylation techniques

研究代表者

福重 真一 (Fukushige, Shinichi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90192723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化は、癌関連遺伝子発現を抑制し、高い増殖能力、不死化、浸潤、転移など癌の特徴に影響を及ぼす。我々は、ゲノムワイドなDNAメチル化遺伝子再活性化が前立腺癌細胞株LNCaPの増殖を著しく抑制し、アポトーシスを誘導することを見出した。アポトーシス誘導因子としてPYCARDを見出し、マイクロダイセクションした前立腺癌臨床検体を用い、高率にPYCARDプロモーター領域の癌特異的メチル化を見出した(46/51: 90%)。また、LNCaPにおけるPYCARD発現はアポトーシスを誘導した。これらの結果は、PYCARDの高度メチル化が前立腺癌の腫瘍形成において重要な役割を果たすことを示唆する。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is associated with the inappropriate transcriptional silencing of cancer-related genes and affects the hallmarks of cancer such as sustaining proliferative signaling, resisting cell death, and activating invasion and metastasis. We found that genome-wide reactivation of hypermethylated genes suppressed growth of prostate cancer cell line LNCaP and induced apoptosis. We searched for apoptosis-inducing genes whose promoters were hypermethylated in prostate cancers. As a result, we found that the promoter region of PYCARD, one of apoptosis-inducing factor, were highly methylated in a cancer-specific manner (46/51: 90%). In addition, PYCARD expression induced apoptosis in LNCaP cells. These results suggest that aberrant promoter hypermethylation of PYCARD plays an important role in prostatic tumorigenesis.

研究分野：実験病理学

キーワード：前立腺癌 DNAメチル化 DNA脱メチル化 PYCARD

1. 研究開始当初の背景

癌の特徴に關与するジェネティック、エピジェネティックな異常は、癌特異的な変化であるため、癌の診断、治療の標的として最適である (Fukushige S & Horii A, *Tohoku J Exp Med* 229: 173-185, 2013)。エピジェネティックな異常の中でも DNA メチル化は遺伝子の転写抑制と密接に關連し、癌抑制遺伝子や DNA 修復遺伝子など正常な細胞機能を維持する上で重要な遺伝子を標的とする (Fukushige S & Horii A, *Cancer Lett* 342: 231-237, 2014)。これら腫瘍形成を促進するドライバー遺伝子は DNA メチル化を受ける遺伝子全体から見ればほんの僅かであり、既にその機能が明らかな癌關連遺伝子を除き、同定することは難しい。そのため、一般には、プロモーター領域にメチル化が見られ、機能が明確な癌關連遺伝子についての解析が主流となっている。前立腺癌でも癌關連遺伝子のメチル化について解析が進んでいるが、未だ腫瘍形成に密接に關連するメチル化遺伝子は見つかっていない (Chiam K et al., *Cancer Lett* 342: 248-256, 2014)。本研究では、これらの問題を解決し、前立腺癌の細胞増殖に關わる主要なメチル化遺伝子を見つけるため、癌細胞のフェノタイプの変化を目印とするこれまでにないアプローチをとった。

我々は、これまで、メチル CpG 結合蛋白 MBD2 のメチル CpG 結合ドメイン (MBD) と転写因子 NF B の転写活性化ドメイン (AD) を繋いだ DNA コンストラクト (NF B(AD)-MBD) の細胞への導入によってメチル化遺伝子の発現が上昇することを見出し、MeTA (methyl-CpG targeted transcriptional activation) と名付けた (Fukushige S et al., *Biochem Biophys Res Commun* 377: 600-605, 2008)。この方法により、単に DNA メチル化の集積している遺伝子ではなく、転写抑制と關連するメチル化遺伝子を効率的に見つけ出すことに成功した (Shimizu H et al., *Biochem Biophys Res Commun* 411: 162-167, 2011, Sato Y et al., *Epigenetics* 6: 752-759, 2011)。また、NF B 転写活性化ドメインの代わりに DNA 脱メチル化に關与する TET 蛋白の活性な野生型触媒ドメイン (TET CDwt, Tahiliani M et al., *Science* 324: 930-935, 2009) を繋いだ DNA コンストラクト (MBD-TET CDwt) をヒト胎児腎細胞株 293T に導入したところ、プロモーターの脱メチル化を引き起こし、メチル化遺伝子発現を再活性化できた。さらに、マイクロアレイ解析から、MBD-TET CDwt による DNA 脱メチル化は、MeTA や脱メチル化剤では見つからなかった新規メチル化遺伝子の転写再活性化を引き起こすことが明らかとなった。この系とテトラサイクリン (tet) 遺伝子発現誘導系を組み合わせ、培地中への tet 投与によりゲノムワイドな DNA 脱メチル化を誘導したところ、前立腺癌細胞株 LNCaP の増殖が著しく抑制されることを

見出した。これに対し、1 アミノ酸置換により不活性な変異型 TET 触媒ドメイン (TET CDmut) を用いた場合、tet 投与による細胞増殖変化は全く見られなかった。また、1) FACS 解析により細胞増殖抑制には G2/M 期の停止が關与すること、2) 顕微鏡観察により MBD-TET CDwt 発現細胞は突起を欠く形態を示すこと、3) マイクロアレイ解析により脱メチル化誘導で 5 倍以上発現上昇した遺伝子は約 640 あり、その中には前立腺癌のメチル化マーカーとして知られる *GSTP1* (glutathione S-transferase pi 1) 遺伝子も含まれることが明らかとなった。しかし、LNCaP 細胞における *GSTP1* 発現回復は細胞増殖に影響を与えないことがわかっている (Lin X et al., *Am J Pathol* 159: 1815-1826, 2001)。

2. 研究の目的

DNA メチル化は、癌關連遺伝子発現を抑制し、高い増殖能力、不死化、浸潤、転移など癌の特徴に影響を及ぼすため、癌の診断、治療標的として重要である。しかし、一般に、癌細胞には多数のメチル化異常が見られ、どれが癌の特徴に關連するのを見出すことは難しい。我々は、最近、TET (Ten-eleven translocation) 蛋白を用いた DNA 脱メチル化誘導技術を開発し、前立腺癌細胞の増殖が著しく抑制されることを見出した。本研究では、この系を用い、前立腺癌細胞の増殖に關与するメチル化遺伝子を探し出し、DNA メチル化による細胞増殖促進メカニズムや診断バイオマーカー、治療標的としての可能性について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

LNCaP 以外の前立腺癌細胞株で DNA 脱メチル化による細胞増殖能の変化を見るため、DU145、PC-3 細胞を理研から、正常対象として、正常前立腺細胞株 (RWPE-1) を ATCC より購入した。それぞれの細胞株に、Tet リプレッサー (TetR) 発現コンストラクトを導入後、MBD-TET CDwt、MBD-TET CDmut を Tet オペレーター (TetO₂) 下流に挿入した DNA コンストラクトを導入し、MBD-TET CDwt あるいは、MBD-TET CDmut 蛋白を発現誘導する細胞株の作製を試みた (Gossen M & Bujard FM, *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5547-5551, 1992)。これらの細胞株にテトラサイクリン (tet) を投与し、MBD-TET CDwt、MBD-TET CDmut を発現誘導した時の細胞増殖能をアラマブルーアッセイで、細胞周期解析をフローサイトメトリーで検討する予定であった。しかしながら、上記アプローチで RWPE-1、DU145 細胞の MBD-TET CDwt、MBD-TET CDmut 発現誘導細胞株の作製が困難だったため、LNCaP 細胞に NF B(AD)-MBD (Sato Y et al., *Epigenetics* 6: 752-759, 2011) を導入し、方法の違いによる細胞増殖抑制活性を調べ、増殖抑制活性に共通するメチル化遺伝子を選択するとい

うアプローチをとった。

次に、同定した前立腺癌細胞増殖に関与する DNA メチル化異常をもとに診断・治療への応用の可能性を探った。まず、同定遺伝子の CpG アイランドに関する情報を *in silico* で解析後、前立腺癌および正常前立腺細胞株でのプロモーター領域の DNA メチル化状況をバイサルファイトシーケンスにより明らかにした。次に、転写と関連するプロモーター領域にメチル化特異的 PCR (MSP、Herman JG et al., Proc Natl Acad Sci USA 93: 9821-9826, 1996) のためのプライマーを作製し、51 症例の前立腺癌パラフィン包埋切片からレーザーマイクロダイセクションにより腫瘍部、非腫瘍部のゲノム DNA を採取し、DNA メチル化の頻度、特異性を解析した。これらの解析を通して診断バイオマーカーとしての可能性について検討した。

また、同定された癌関連メチル化遺伝子の性状を解析するため、cDNA ライブラリーから cDNA を単離し、発現ベクターにクローニングした。次に、発現コンストラクトを前立腺癌細胞株にトランスフェクションし、アラマブルーアッセイによって癌関連遺伝子の発現回復が細胞増殖抑制を引き起こすかどうか明らかにした。

4. 研究成果

(1) 前立腺細胞株における MBD-TET1 CD 発現誘導細胞株の作製

ゲノムワイドな DNA 脱メチル化をテトラサイクリン投与によって成し遂げるため、前立腺癌細胞株として LNCaP 以外に DU145、PC-3 の 2 細胞株を、また、正常対象として正常前立腺細胞株 RWPE-1 を用い、MBD-TET1 CD 発現誘導細胞株の作製を 2 ステップで実施した。まず、1st ステップでは、それぞれの前立腺細胞株に Tet リプレッサー (TetR) 発現コンストラクトを導入し、TetR を恒常的に発現する細胞株を作製した。また、作製した細胞株に pcDNA4/TO/lacZ プラスミドを導入し、lacZ の発現がテトラサイクリン投与によって十分に誘導される安定細胞株を選択した (DU145-TR5: 13 倍、PC-3-TR9: 29 倍、RWPE-1-TR36: 14 倍)。次に、2nd ステップで、野生型 (wt) と変異型 (mut) の TET1 CD を用い、MBD-TET1 CDwt、MBD-TET1 CDmut を Tet オペレーター (TetO₂) 下流に挿入した DNA コンストラクトを用い、テトラサイクリン投与で MBD-TET1 CD を発現誘導できる安定細胞株の作製を試みた。PC-3 細胞については、MBD-TET1 CDwt および MBD-TET1 CDmut の発現誘導細胞株の作製に成功したが、DU145、RWPE-1 細胞株については数回トランスフェクション実験を実施し、数多くの Zeocin 耐性株をスクリーニングしたが、MBD-TET1 CD コンストラクトを発現誘導できる細胞株を得ることはできなかった。作製できなかった原因については未だ不明であるが、LNCaP 細胞株に NF B(AD)-MBD コンストラクトを導入

しテトラサイクリン投与によって発現誘導できる安定細胞株を作製し、MBD-TET1 CD とは異なる方法でゲノムワイドにメチル化遺伝子を再活性化させ、細胞増殖抑制活性にどのような影響がでるのか解析することにした。

(2) 前立腺癌細胞株 LNCaP における NF B(AD)-MBD 発現の影響

前立腺癌細胞株 LNCaP の NF B(AD)-MBD 発現誘導細胞株として TR9-MeTA14 と TR15-MeTA5 という 2 つの安定細胞株を作製した。これらの細胞株にテトラサイクリンを投与し、NF B(AD)-MBD を発現誘導するとゲノムワイドなメチル化遺伝子の再活性化が引き起こされた。また、アラマブルーアッセイにより NF B(AD)-MBD 発現誘導細胞株はテトラサイクリン投与後 4 ~ 6 日目で著しい細胞増殖抑制が見られた。フローサイトメーターを用いた細胞周期解析の結果、TR9-MeTA14、TR15-MeTA5 どちらの細胞株でもテトラサイクリン投与後 2 日目で sub-G1 分画が増加し、4 ~ 6 日目と日を追うごとにさらに増加する傾向が見られた。NF B(AD)-MBD 発現でアポトーシスが誘導されることをさらに確かめるため、TUNEL アッセイを試み、テトラサイクリンを投与した細胞のみアポトーシス細胞を示す特異的な強いシグナルが観察された。

(3) アポトーシス誘導遺伝子 *PYCARD* の同定

テトラサイクリン投与前と投与後 4 日目の TR9-MeTA14、TR15-MeTA5 細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を実施し、ゲノムワイドなメチル化遺伝子の再活性化に伴い発現誘導されるアポトーシス誘導因子の探索をおこなった。TR9-MeTA14、TR15-MeTA5 細胞で共通にアポトーシスに伴い 2 倍以上発現誘導されるアポトーシス誘導遺伝子として *PYCARD* (120 倍)、*TNFRSF25* (15 倍)、*HRK* (4 倍)、*BIK* (3 倍)、*CIDEA* (2 倍) の 5 遺伝子を見出した。このうち、発現誘導率の高い *PYCARD*、*TNFRSF25* についてさらに解析を進めた。*PYCARD* プロモーター領域は正常前立腺細胞株 RWPE-1 でメチル化されておらず、前立腺癌細胞株 LNCaP においてのみメチル化が見られた。一方、*TNFRSF25* プロモーター領域は正常前立腺、前立腺癌細胞株ともにメチル化されていた。これらの結果は、*PYCARD* の前立腺癌特異的メチル化を示唆するものである。

(4) *PYCARD* 遺伝子再活性化による LNCaP 細胞におけるアポトーシスの誘導

LNCaP 細胞において *PYCARD* 遺伝子のテトラサイクリン誘導発現系を作製し、*PYCARD* 発現がアポトーシスを引き起こすかどうか検討した。そのため、cDNA ライブラリー (10 種の cDNA ライブラリーの混合液) から *PYCARD*

cDNAを増幅し、pcDNA4/T0/myc-Hisベクターにクローニングした。その後、LNCaP-TR9、LNCaP-TR15のTetRを発現する細胞株にPYCARDコンストラクトを導入し、テトラサイクリンで発現誘導できる安定細胞株を作製した。これらの細胞株はテトラサイクリン投与によってPYCARDが発現誘導され、フローサイトメーターでの解析により、sub-G1分画が著しく増加することが明らかとなった。これらの結果は、LNCaP細胞におけるPYCARD発現がアポトーシスを誘導することを示している。

(5) 前立腺癌臨床検体におけるPYCARDの癌特異的メチル化

正常前立腺細胞株、前立腺癌細胞株での結果を前立腺癌臨床検体で検証するため、マイクロダイセクターにより51症例の臨床検体を癌部と近傍正常部に分取後、メチル化特異的PCR(MSP)法で解析した。その結果、51症例中、46症例という極めて高率にPYCARDプロモーター領域の癌特異的メチル化が生じていることを見出した(46/51: 90%)。この結果は、PYCARDのメチル化が前立腺癌の腫瘍形成において重要な働きをしていることを強く示唆している。また、PYCARDメチル化を指標とする前立腺癌の診断、治療への可能性も示唆した。

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3件)

1. Mizuguchi Y, Saiki Y, Horii A, Fukushige S. Targeted TET oxidase activity through methyl-CpG binding domain extensively suppresses cancer cell proliferation. *Cancer Med* 査読有、5巻、2016年、2522-2533、10.1002/cam4.830.
2. Fukushige S, Horii A. Technological advances in epigenomics lead to a better understanding of inflammatory diseases, decitabine and H3K27me3. *Epigenomics* 査読有、7巻、2015年、133-136、10.2217/epi.14.90.
3. Matsuo S, Saiki Y, Adachi O, Kawamoto S, Fukushige S, Horii A, Saiki Y. Single-dose resuvastatin ameliorates lung ischemia-reperfusion injury via upregulation of endothelial nitric oxide synthase and inhibition of macrophage infiltration in rats with pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg* 査読有、149巻、2015年、902-909、10.1016/j.jtcvs.2014.10.030.

[学会発表](計7件)

1. 福重真一、宮内隼弥、大久保鉄平、齋木由利子、高橋正博、三塚浩二、荒井陽一、堀井明、Methylation of the *PYCARD* gene promoter is a highly frequent event in prostate tumorigenesis、第76回日本癌学会学術総会、2017年、9月28日~9月30日、パシフィコ横浜(横浜)
2. Fukushige S, Miyauchi T, Okubo T, Mitsuzuka K, Arai Y, Horii A. Methylation-mediated silenced *PYCARD* plays a key role in human prostate cancer. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017, 2017年4月1日~4月5日、Washington DC, USA
3. 福重真一、チャクマ・カンチャン、元井冬彦、海野倫明、堀井明、DNA hypermethylation of *IRX4* is a frequent event that may confer growth advantage to pancreatic cancer cells、第75回日本癌学会学術総会、2016年、10月6日~10月8日、パシフィコ横浜(横浜)
4. Fukushige S, Mizuguchi Y, Chakma K, Saiki Y, Horii A. Targeted TET oxidase activity through methyl-CpG binding domain extensively suppresses cancer cell proliferation. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016, 2016年4月16日~4月20日、New Orleans, LA, USA
5. Fukushige S, Mizuguchi Y, Chakma K, Saiki Y, Horii A. Targeted TET oxidase activity through methyl-CpG binding domain extensively suppresses cancer cell proliferation. 13th International Congress of Human Genetics, 2016年4月3日~4月7日、国立京都国際会館(京都)
6. Miyauchi T, Horii A, Fukushige S. Methyl-CpG targeted transcriptional activation (MeTA) induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells by reactivating hypermethylated genes. 10th AACR/JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, 2016年2月16日~2月20日、Maui, HI, USA
7. 福重真一、宮内隼弥、堀井明、DNMT-independent reactivation of hypermethylated genes induces growth suppression and apoptosis in LNCaP cells、第74回日本癌学会学術総会、2015年、10月8日~10月10日、名古屋国際会議場(名古屋)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

東北大学大学院医学系研究科病理学講座

分子病理学分野

<http://www.molpath.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福重 真一 (FUKUSHIGE SHINICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90192723

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()