

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19333

研究課題名(和文) 鋸歯状病変を介した大腸発癌経路における新規脱メチル化遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of novel demethylation genes in the serrated pathway.

研究代表者

藤野 泰輝 (FUJINO, Yasuteru)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：60747442

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)：メチレーションアレイ解析を行い、SSA/Pに共通する脱メチル化遺伝子としてS100P、PKP3、MUC2、S100A2の4遺伝子を同定した。TaqMan PCRではいずれもmRNA量の亢進が認められたが、免疫染色ではS100Pの発現のみ著明に亢進していた。MassARRAY解析にてMIAMI法で同定したS100Pのプロモーター、exon1及びintro1領域が30%程度脱メチル化されていることを確認した。大腸癌細胞株(HT29, WiDr)やSSA/Pオルガノイド培養細胞を標的にS100P遺伝子のsiRNAを用いたノックダウン実験を行ったところ、いずれも細胞増殖や浸潤能は有意に抑制された。

研究成果の概要(英文)：Methylation array analysis was performed using SSA/P samples and cancer in SSA/P samples, and we identified four genes(S100P, PKP3, MUC2, S100A2) as demethylation genes common to SSA/P. Each mRNA level was found to be increased by TaqMan PCR. Only Protein expression of S100P was markedly enhanced by immunostaining. We found that 30% of the promoter exist in exon 1 and intron 1 was demethylated. Knockdown experiments using siRNA of S100P gene were performed on the colon cancer cell line (HT29, WiDr) or SSA/P organoid culture cells, and cell proliferation and invasion ability were significantly suppressed in each cell.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸鋸歯状病変 脱メチル化

1. 研究開始当初の背景

近年、大腸癌の発生経路として serrated polyps から発癌する serrated pathway が注目されている。Serrated polyps は、大きく hyperplastic polyp(HP)、Sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) と traditional serrated adenoma(TSA)に分類される。このうち、SSA/P は右側大腸に多く発生し、BRAF 変異が高率に認められるとともに CIMP マーカー(MINT, p16 など)のメチル化を認めることが報告されている。右側大腸癌では、しばしば MLH1 のメチル化により MSI 陽性の癌となることから、SSA/P は MSI 陽性癌の前病変として注目されている。

一方、Aberrant crypt foci(ACF)は、マウスやラットの大腸発癌モデルにおける最も初期の前病変と考えられている。当教室の高山らは、大腸拡大内視鏡を用いてヒト大腸の微小病変である ACF を観察し、ACF が大腸発癌経路(adenoma-carcinoma sequence)の最も早期の precursor である可能性を指摘した(N Engl J Med 339: 1277-1284, 1998)。申請者はこれまで、SSA/P 及び SSA/P 症例における右側結腸の ACF を観察し、

- (1)SSA/P 患者では健常人に比べて ACF の陽性率及び数が有意に高いこと、
 - (2)SSA/P 数と ACF 数が有意に相関すること、
 - (3)ACF では B-RAF 変異が高率に認められること、
- を見出した。

また、ACF, SSA/P, cancer in SSA/P 組織を用いて MIAMI 法によりメチレーションアレイ解析を行い、(1)SSA/P では PQLC1, HDHD3, RASL10B, GJA3, SLC26A2, FLI1 の6つの遺伝子が高率にメチル化されていること、(2)ACF ではこれらの1~3個の遺伝子がメチル化されていること、(3)cancer in SSA/P の cancer 部分ではこれらの6遺伝子を含む遺伝子群に加えて MLH1 がメチル化されていること、を明らかにした(Br J Cancer, in press)。つまり、B-RAF 変異及びこれらの遺伝子のメチル化が続けて起こることにより ACF が形成され、さらにこれらの遺伝子が高率にメチル化されることにより SSA/P が形成され、最終的に MLH1 がメチル化されて癌に進展すると考えられるが、その詳細は不明である。最近、大腸発癌においては Line-1 などの遺伝子が脱メチル化されていることが報告され、癌化における脱メチル化の意義が注目されている。つまり、脱メチル化により癌遺伝子の発現抑制が解除されて癌化に関わるとされている。申請者は、MIAMI 法でメチレーション解析を行うことによって、同時に脱メチル化遺伝子が複数存在することを見出している。具体的には、S100P, S100 2, PKP3, MUC2 などの遺伝子が ACF ではいくつか脱メチル化しており、SSA/P 及び cancer in SSA/P に進展するにつれ高率に脱メチル化されていることを確認している。

つまり、ACF-SSA/P-cancer sequence においては、これらの遺伝子の脱メチル化による遺伝子の過剰発現が関与していることが想定される。実際に、申請者は、メチレーションアレイ解析により脱メチル化されていた S100P 遺伝子を染色したところ、SSA/P では過剰発現していることを見出している。これまでの申請者の検討により ACF-SSA/P-cancer sequence において、遺伝子のメチル化だけではなく、脱メチル化によっても癌化が促進することが推測される。本研究によって ACF-SSA/P-cancer sequence における脱メチル化の意義を明らかにするとともに、その分子生物学的な機序を解明する。

2. 研究の目的

大腸鋸歯状病変(serrated polyps)の一つである Sessile serrated adenoma/polyp(SSA/P)は、右側結腸に多く発生し、高い癌化ポテンシャルを有することが報告されているが、その発生機序及び発癌機序は不明である。申請者はこれまで、大腸微小病変である aberrant crypt foci(ACF)、SSA/P、さらには癌との分子生物学的な関連性をメチル化、BRAF、KRAS、MSI などの解析により証明してきた。当該研究においては、ACF、SSA/P 及び癌組織を用いて DNA メチル化アレイによる網羅的解析を行い、新規脱メチル化遺伝子の同定をまず行う。そして、標的遺伝子を knock down させた細胞株を用いて増殖能や遊走浸潤能などの機能解析を行う。さらに、CRISPR/Cas システムを用いて脱メチル化遺伝子を transgene として knock in した遺伝子改変マウスを作製し、ACF、SSA/P 及び SSA/P 由来大腸癌の発現頻度を調べる。以上の検討等により、ACF-SSA/P-cancer sequence における脱メチル化の意義と発癌の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)Bisulfite pyrosequence 法による各脱メチル化遺伝子の脱メチル化の確認
メチレーションアレイ解析で拾い上げた S100P をはじめとする各脱メチル化遺伝子に関して Bisulfite pyrosequence 法による脱メチル化の確認を行う。つまり、SSA/P 組織、SSA/P 症例に認められた右側結腸の ACF 組織、右側結腸癌組織から DNA を抽出し、Bisulfite 処理、Pyrosequence を行い CpG 領域の T% /C%を解読して DNA メチル化比率を決定し脱メチル化の程度を確認する。

(2) ACF、SSA/P 及び癌組織における脱メチル化遺伝子の発現解析

各脱メチル化遺伝子の real time PCR 解析

SSA/P 組織、SSA/P 症例に認められた右側結腸の ACF 組織、右側結腸癌組織を用いて、脱メチル化されている遺伝子の発現を Taqman probe を用いた real time PCR 法により定量比較する。

ヒト検体の免疫染色

SSA/P 組織、SSA/P 症例に認められた右側結腸の ACF 組織、右側結腸癌組織を用いて、各脱メチル化遺伝子の免疫染色を行い、発現及び局在を調べ正常大腸組織と比較検討する。

(3) SSA/P 細胞を用いた脱メチル化遺伝子の機能解析

オルガノイド培養を行い、初代樹立した SSA/P に対して、S100P の siRNA を transfection し、cell proliferation assay、migration assay、invasion assay を行い、増殖能や遊走浸潤能などの定量評価をする。

(4) S100P 遺伝子の脱メチル化サイトの定量化

S100P 遺伝子座において MIAMI 法を用い、5つのプローブ領域で大腸癌、正常組織間で CG のメチル化解析したところ 4 番目のプローブ領域で大腸癌組織が正常組織と比較して hypomethylation していることが示唆された。MassARRAY の解析対象領域の絞り込みで UCSC genome browser や ENCODE project での data から 4 番目の probe の上流に広範な転写制御領域があることが分かったため、解析対象領域をカバーする 3 つのプローブを設計し解析を行った(図 1)。

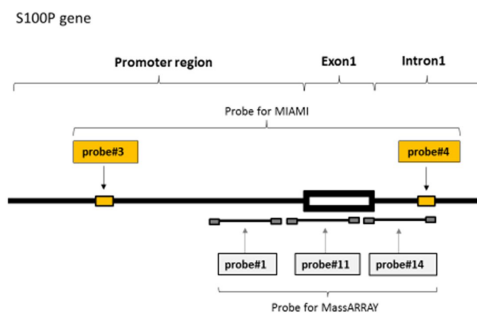


図 1 : S100P 遺伝子の解析対象領域をカバーする 3 つのプローブ

4 . 研究成果

(1) Bisulfite pyrosequence 法による各脱メチル化遺伝子の脱メチル化の確認
メチレーションアレイ解析では、SSA/P に共通する脱メチル化遺伝子として、S100P、PKP3、MUC2、S100A2 の 4 遺伝子を同定した。Bisulfite pyrosequence 法では、各遺伝子の脱メチル化を認めた。

(2) ACF、SSA/P 及び癌組織における脱メチル化遺伝子の発現解析

TaqMan PCR では、S100P、MUC2、S100A2 の mRNA 量の亢進が認められた。

免疫染色では、S100P の発現が著明に亢進していた(図 2)。

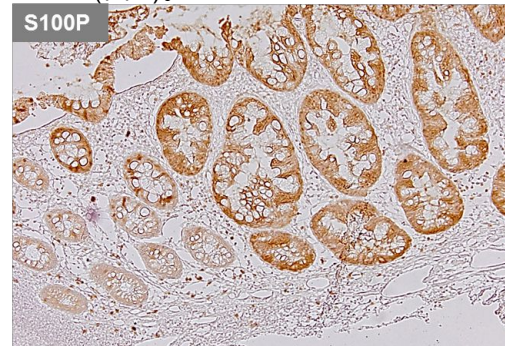


図 2 : SSA/P における S100P 免疫染色

(3) SSA/P 細胞を用いた脱メチル化遺伝子の機能解析

オルガノイド培養を行い、初代樹立した SSA/P に対して、S100P の siRNA を transfection し、cell proliferation assay、migration assay、invasion assay を行ったところ、増殖能や遊走浸潤能が亢進していた。

(4) S100P 遺伝子の脱メチル化サイトの定量化

正常粘膜と比較して SSA/P 組織では、18 部位中 9 部位で CpG が有意差を持って脱メチル化されていた(図 3)。

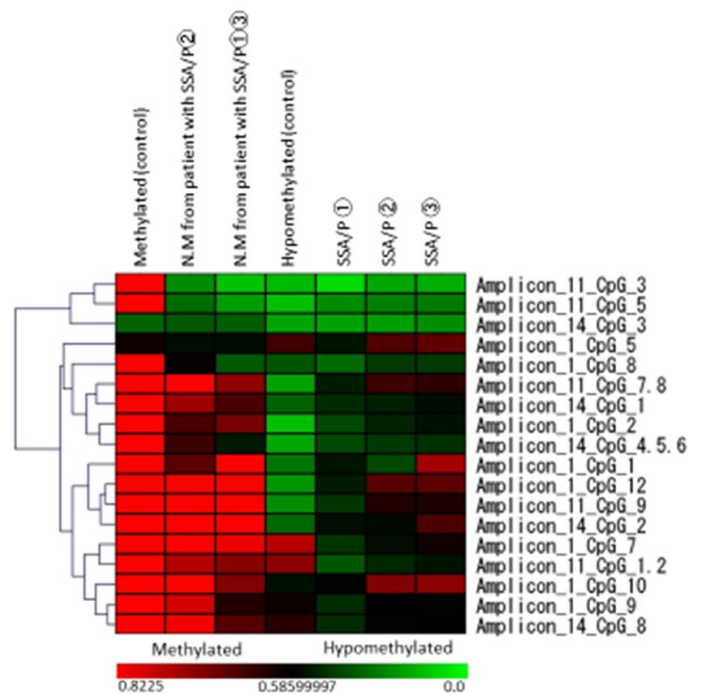


図 3 : S100P 遺伝子の脱メチル化サイトの定量化

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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

藤野 泰輝 (FUJINO, Yasuteru)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：60747442

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

六車 直樹 (MUGURUMA, Naoki)

徳島大学・病院・准教授

高山哲治 (TAKAYAMA, Tetsuji)

徳島大学・大学大学院医歯薬学研究部・教授