

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2009  
 課題番号：18390114  
 研究課題名 (和文) 腫瘍発生・進展における非定型的メチル化シトシンの病態学的意義についての網羅的解析  
 研究課題名 (英文) A Comprehensive Study of Pathological Significance of Atypical Cytosine Methylation during Tumorigenesis and Progression  
 研究代表者  
 前田 盛 (MAEDA SAKAN)  
 神戸大学・大学院医学研究科・戦略的客員教授  
 研究者番号：50030911

研究成果の概要 (和文)：種々の遺伝子の転写調節領域に存在する CpG-island のメチル化は、遺伝子発現を抑制的に非 CpG-island の意義は不明であった。私どもは、病理組織学的観察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い、非 CpG-island のシトシンメチル化による転写制御が、悪性腫瘍の進展に関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：While cytosine methylation in CpG-island, located usually regulatory region of many genes, is well recognized as an inhibitory epigenetic regulator, biological significance of the cytosine methylation other than CpG-island is unclear. By focusing morphology-oriented microscopic dissection methods, we investigated cytosine methylation status in the gene promoter, and found that some of the cytosine methylation outside of the CpG-island have major contributions during cancer progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：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、in situ hybridization

## 1. 研究開始当初の背景

種々の遺伝子の転写調節領域に存在する CpG-island 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。

## 2. 研究の目的

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。

### 3. 研究の方法

ホルマリン固定・パラフィン包埋薄切標本上でメチル化 DNA を検出するための標識核酸を用いたハイブリダイゼーション法、特殊な分子雑種を検出するモノクローナル抗体の作成。特に、副甲状腺、膀胱癌組織に関して、組織標本の固定条件やマイクロウェーブ処理の効果などを検討し、標本上で *in situ* でメチル化を検出する方法論の基礎検討を行う。申請者らが開発改良したアガロースビーズ法により、微量なサンプルからメチル化シトシンを検出する。

### 4. 研究成果

①神経成長因子 (NGF) の高親和性受容体 TrkA 遺伝子プロモータ領域には、非 CpG-island に AP-1 類似配列 (TGAGCGA) が存在する。この AP-1 類似配列への c-Jun 蛋白結合は転写抑制機能を有するため、膀胱癌の解析では、高度メチル化の細胞株や組織検体では TrkA が高発現となり、神経周囲浸潤とも相関していた。

②TATA-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 BAMB I 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出ししている。

③TGF  $\beta$  は腫瘍細胞の増殖を促進するが、偽受容体 BAMB I は TGF  $\beta$  /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 BAMB I 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 BAMB I 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 年度は、各種膀胱癌培養細胞株を用いて、TGF  $\beta$  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、BAMB I の強制発現、siRNA の効果を解析した。BAMB I 強制発現は、膀胱癌細胞株のアポトーシスを増加させ、TGF  $\beta$  による細胞遊走を抑制することを明らかにした。

### 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 51 件)

- ① Sann Sanda Khin, Kitazawa R, Win N, Than TA, Mori K, Kondo T, Kitazawa S, BAMB I gene is epigenetically silenced in a subset of high-grade bladder cancer, Int J Cancer, 125, 328-338, 2009, 査読あり
- ② 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
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ shii 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

⑥ 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

⑦ Kitazawa R, Mori K, Yamaguchi A, Kondo T, Kitazawa S, Modulation of Mouse RANKL Gene Expression by Runx2 and Vitamin D3, J Cellular Biochem, 105, 1289-1297, 2008, 査読あり

⑧ 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

⑨ 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

⑩ Kitazawa S, Kitazawa R, In situ Detection of Specific Gene Expression During and Immediately After Transcription at Electron Microscopic Level J Struct Biol, 153, 64-72, 2006, 査読あり

⑪ Kishimoto K, Kitazawa R, Kurosaka M, Maeda S, Kitazawa S, Expression Profiles of Genes Related to Osteoclastogenesis in Mouse Growth Plate and Articular Cartilage, Histochem Cell Biol, 125, 592-602, 2006, 査読あり

⑫ Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kitazawa S, Hirohashi S, DNA Methylation of Multiple Tumor-related Genes in Association with Overexpression of DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) during Multistage Carcinogenesis of the

Pancreas, Carcinogenesis, 27, 1160-1168, 2006, 査読あり

⑬ Mori K, Kitazawa R, Kondo T, Maeda S, Yamaguchi A, Kitazawa S, Modulation of Mouse RANKL Gene Expression by Runx2 and PKA Pathway, J Cell Biochem, 98, 1629-1644, 2006, 査読あり

⑭ Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M, MCP-1 Contributes to Macrophage Infiltration into Adipose Tissue, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis in Obesity, J Clin Invest, 116, 1494-1505, 2006, 査読あり

⑮ Kitazawa S, Takenaka A, Kondo T, Mizoguchi A, Kitazawa R, Protruding Disordered Loop of gClqR is Specifically Exposed and Related to Antiapoptotic Property in Germ Cell Lineage, Histochem Cell Biol 126, 665-677, 2006, 査読あり

他 3 6 件

[学会発表] (計 47 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)

② Kitazawa R, Mori K, Kondo T, Kitazawa S, Regulation of Osteoclastogenesis by CpG Methylation of Mouse Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) Gene Promoter Region, ASBMR 28th Annual Meeting, 2006.9.15-19 (Pennsylvania Convention Center Philadelphia, USA)

③ Kitazawa S, Kitazawa R, Fujimoto M, Mori K, Sann Sanda Khin, Ishii J, Kondo T, In Situ of Specific Gene Expression During and Immediately After Transcription at Electron Microscopic Level, The 16th International Microscopy Congress, 2006.9.3-8 (Sapporo Convention Center, Sapporo)

他 4 5 件

[図書] (計 2 件)

① 北澤荘平, 森清, 近藤武史, 北澤理子, 組織細胞化学2010-組織細胞化学イメージングの基礎と最前線: 生体内分子局在と機能を探る- 日本組織細胞化学会編集 エピジェネティクスと病理組織学的変化., 2010

②Kitazawa 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

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/patho2/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 盛 (SAKAN MAEDA)

神戸大学・大学院医学研究科・戦略的客員教授

研究者番号：50030911

### (2) 研究分担者

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

北澤 理子 (RIKO KITAZAWA)

神戸大学・大学院医学研究科・特命講師

研究者番号：00273780

近藤 武史 (TAKESHI KONDO)

神戸大学・大学院医学研究科・特命講師

研究者番号：20335441