

平成21年4月21日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間： 2007～2008
課題番号：19790935
研究課題名（和文） エピジェネティック異常により制御される遺伝子群の癌細胞浸潤能への
関与
研究課題名（英文） The effect on cell motility by the genes regulated by epigenetic
factor
研究代表者
氏名（ローマ字）：新井 誠人（ARAI MAKOTO）
所属機関・部局・職：千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30396684

研究成果の概要：

食道癌由来培養細胞に脱メチル化剤を投与することによって、発現増加を認めた遺伝子をマイクロアレイ解析によって絞り込み、その中で、chromosome 15 open reading frame 48 (C15orf48) に注目した。この遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化を確認し、細胞運動能との関連を明らかにした。以上より、機能不明の異常メチル化により発現が制御される C15orf48 遺伝子の機能解析を行い、細胞運動能との関連性が深いことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：エピジェネティクス、細胞運動能、マイクロアレイ、異常メチル化、発現解析、Boyden Chamber、C15orf48

1. 研究開始当初の背景

プロモーター領域の異常メチル化、ヒストンの脱アセチル化によるクロマチン構造の変化によって遺伝子配列に変化をもたらすことなく、発癌や癌の進展に大きな役割を果たすエピジェネティックな異常も注目を集めている。これは、従来の遺伝子変異や、欠失、増幅といった遺伝子配列そのものに変化をきたすジェネティックな異常とは全く異なるものであると考えられていたが、ジェネティックな異常とエピジェネティックな異常はお互いに関連性を持つことも報告されてきている。エピジェネティック異常により発現が制御されている遺伝子を検出する方法として、癌由来の培養細胞に脱メチル化剤を投与し、発現が回復した遺伝子をマイクロアレイによって検出し、その候補遺伝子とする方法が広く用いられている。マイクロアレイの長所として、一度に多数の遺伝子を検出できる点が挙げられるが、一方で、機能不明の遺伝子も多く含まれ、本当に重要な遺伝子の絞り込みが逆に難しくなることもある。しかし、複数のマイクロアレイ解析のデータを組み合わせ、バイオインフォマティクスの手法を用いることによって、重要な役割を果たす遺伝子群の絞り込みが可能となっている。これまで、脱メチル化剤で発現が上昇した遺伝子群には、細胞浸潤や細胞骨格に関与する遺伝子が数多く含まれることをマイクロアレイ解析によって明らかにしてきた。

2. 研究の目的

これまでの知見をもとに、脱メチル化剤によって発現が上昇する遺伝子群の中で機能が不明の遺伝子について、その機能解析を、細胞浸潤能に着目して進めた。

3. 研究の方法

(1) 食道癌由来培養細胞株2種類を用いた。それぞれの培養細胞に対して、脱メチル化剤(5-aza-2'-deoxycytidine、以下DAC)を、 $1\ \mu\text{M}$ もしくは $5\ \mu\text{M}$ の濃度で96時間投与した。その前後で発現上昇を認めるマイクロRNAを、異常メチル化によって発現が制御されている候補遺伝子とした。対象としたのは、食道癌由来の培養細胞株3種(TE-1、TE-2、TE-10)である。発現上昇を認めた遺伝子の検出方法として、約30000個の遺伝子がスポットされたマイクロアレイを用いた。この手法は、これまで広く応用され、様々な異常メチル化に制御される遺伝子が発見、報告されている。マイクロアレイの結果はリアルタイムPCRにて確認した。共通

して発現上昇を認めた遺伝子についてさらに検討を進めた。

(2) 候補遺伝子については、転写開始点(TSS)周囲にCpGアイランドが存在するかについて、web上で公開されている方法にて検討し(<http://www.cpgislands.com/>)。CpGアイランドが存在した場合には、バイサルファイト処理後に、プロモーター領域のゲノムをPCRによって増幅し、クローニングを行った。バイサルファイト処理によって、一本鎖DNA上のシトシンはスルホン化、加水脱アミノ化反応し、引き続き脱スルホン化することでウラシルに変換される。メチル化シトシンはメチル化シトシンのままである。そのためバイサルファイト処理したDNAを鋳型に用いてPCR増幅しシーケンスを行うと、メチル化シトシン部位はCのまま、非メチル化シトシン部位はTとして区別されることになる。遺伝子ごと、培養細胞ごとに8個ずつクローンを採取し、塩基配列を決定した。

(3) 完全長cDNAとG418耐性遺伝子が組み込まれた発現プラスミドを培養細胞にトランスフェクションし、G418によって、耐性遺伝子がトランスフェクションされたクローンをセクションし、恒常的に遺伝子を高発現するクローンを採取した。各クローンと、negative controlの培養細胞との間で、Boyden chamber法とwound heal assayにて細胞浸潤能を比較検討した。Boyden chamber法とは、 $8.0\ \mu\text{m}$ の孔があいているチャンバー内で、Fetal Bovine Serum(FBS)が含まれていない培養細胞液で増殖する。一方で孔の外側ではFBSが含まれている培養細胞液を満たす。これにより、FBSが誘因物質となり、細胞の移動を促すこととなる。24時間後に、孔を超えて増殖した細胞数を測定することにより、細胞浸潤能は明らかとなる。wound heal assayは、ほぼconfluentに増殖した培養細胞に対して、一定の幅の傷をつけることにより、細胞を除去する。その後、除去された部分が、培養細胞によって再度覆われるまでの時間を計測することにより、細胞浸潤能が測定できる。細胞増殖能が大きく異なると、細胞浸潤能の計測に影響を与えるため、細胞増殖能は、元の培養細胞と高発現クローンで差異がないものを選定した。

4. 研究成果

(1) DAC処理後の遺伝子発現量の変化: マイクロアレイ解析により、各培養細胞にて発現が上昇した遺伝子の一部を示す。食道癌由来3種を対象として、マイクロアレイ

の結果を比較検討を行った。食道癌由来の培養細胞であるTE-1、TE-2、TE-10

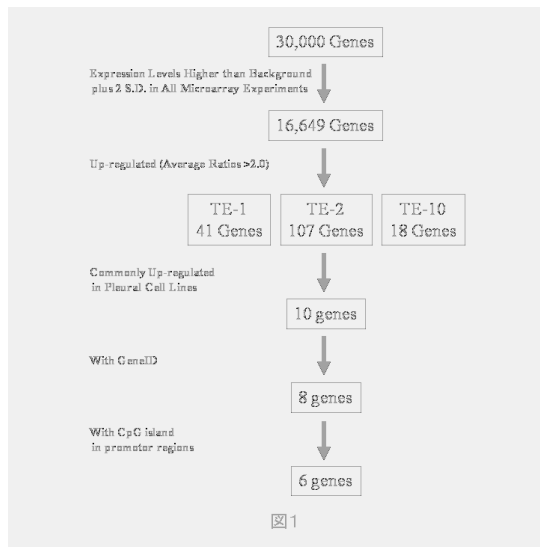


図1

0では、それぞれ2倍以上の発現上昇を認めた遺伝子は、それぞれ41個、107個、18個認めた。そのうち複数の培養細胞で発現上昇した遺伝子は、10個であった。この10個の遺伝子のうち、GeneIDが存在する遺伝子は8個であった。これらの内、6個の遺伝子がプロモーター領域にCpGアイランドを認めた(図1)。

リアルタイムPCR法にて、遺伝子発現量の変化を確認したところ、4個の遺伝子で、DAC処理後の遺伝子発現量の回復が確認された。以下の4個の遺伝子である、cathepsin L2 (CTSL2), Normal mucosa of esophagus specific 1(NMES1), growth arrest and DNA-damage inducible, α (GADD45A), fatty acid binding protein 5 (FABP5)。(1)の検討で絞り込まれた4個の遺伝子のプロモーター領域について、バイサルファイト処理

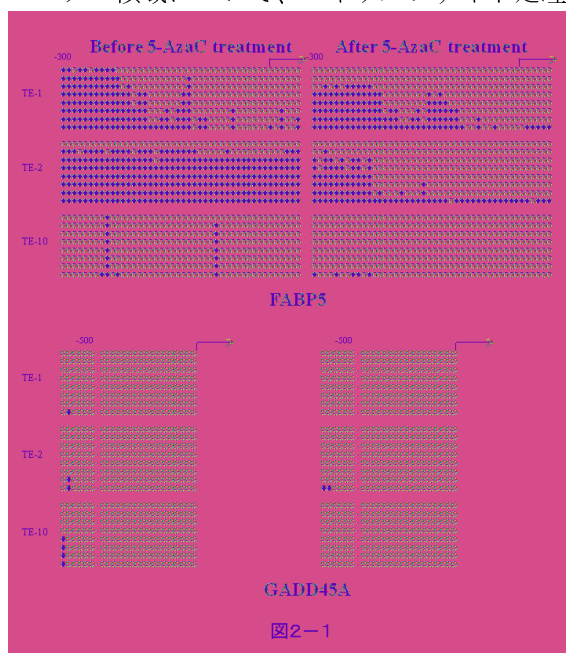


図2-1

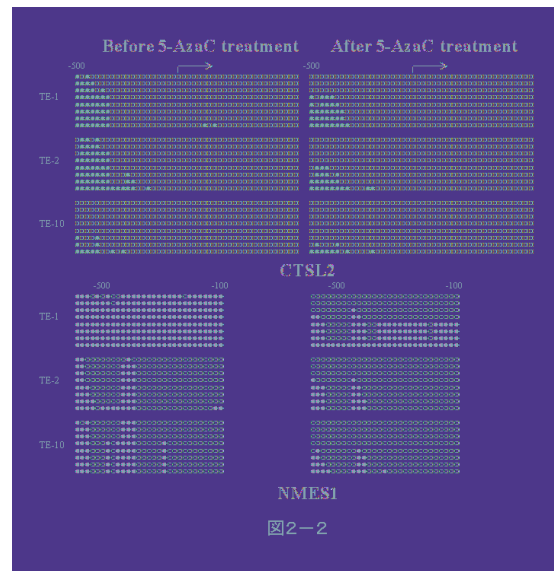


図2-2

後に、PCRにて増幅させ、クローニングした。各培養細胞、各遺伝子ごとに8個ずつのクローンの塩基配列を決定して、異常メチル化の有無を検討した。結果として、NMES1、FABP5、CTSL2の3個の遺伝子のプロモーター領域における異常メチル化を認めた(図2、黒丸は異常メチル化したシトシンを示す)。

(2) NMES1は食道癌での発現低下が報告されている遺伝子であることから、その機能解析を進めた。TE-1、TE-2の

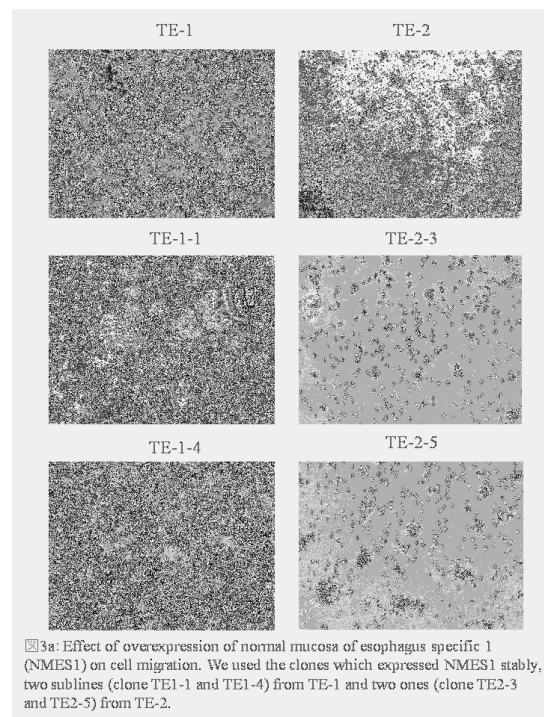
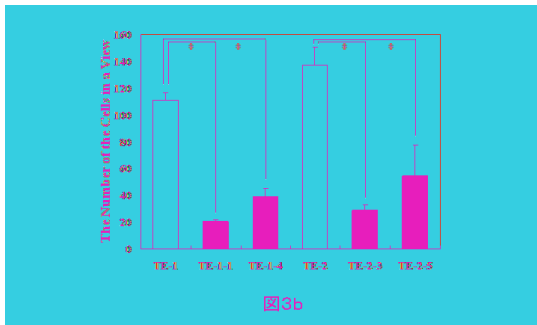


図3a: Effect of overexpression of normal mucosa of esophagus specific 1 (NMES1) on cell migration. We used the clones which expressed NMES1 stably, two sublines (clone TE1-1 and TE1-4) from TE-1 and two ones (clone TE2-3 and TE2-5) from TE-2.

培養細胞株を用いて、NMES1を高発現するクローンを作成した。これらから、NMES1は高発現を維持し、かつ細胞増殖能はあまり差がないクローンを、解析に用いた。そのために、MTSアッセイにて、TE-1、



TE-2 それぞれに対して、細胞増殖能の差がないクローン (TE-1-1, TE-1-4, TE-2-3, TE-2-5) を選別した。これらの NME S 1 を高発現するクローンを、有孔のチャンバー内で無血清培養液を用いて、増殖させた。FBS を誘因物質として、孔を通り抜けて増殖した細胞数を測定した。視野内の平均細胞数は、図 3a, 3b に示すように、TE-1, TE-2 いずれの培養細胞株を用いても、元の培養細胞に比較して、NME S 1 が高発現するクローンは、細胞浸潤能が低下していた。また、TE-2 は、面を占めるようには増殖しないため、TE-1 の培養細胞を用いて、wound heal assay を行った。結果は、NME S 1 高発現クローン (TE-1-1, TE-1-4) では、元の細胞 (TE-1) と比較して、細胞浸潤能が低下していた。

マイクロアレイを用いた解析は、一度の実験で数万の遺伝子の発現変化を解析することが可能であり、多くの研究で用いられてきた。しかし、機能不明の遺伝子もマイクロアレイ上にスポットされており、また一度に余りにも多くの遺伝子の変動することにより、それらすべてを検証することは事実上不可能である。そのために、マイクロアレイの結果から効率よく、有意義なデータを抽出する手段として、バイオインフォマティクスが重用されてきた。遺伝子の塩基配列情報を基に、膜貫通性を有することが予想される情報などを手掛かりに、遺伝子の機能解析が試みられている。本研究では、これまでの我々のデータを基に、脱メチル化剤投与後に発現が上昇する遺伝子群には、特定の機能を有する傾向があることを明らかにした。この結果を踏まえて、食道癌由来培養細胞を用いて、脱メチル化剤にて発現上昇を認めた遺伝子に対して、予想された細胞浸潤能について機能解析を行ったところ、細胞浸潤能を抑制し、癌の成育に抑制的に関与することが明らかとなった。マイクロアレイのデータを組み合わせることと、ある程度機能予測がある上での解析によって効率良く、機能不明遺伝子の解析を行うことができた。一方で、同様に、肝細胞癌由来の培養細胞を用いた検討によって、選り出された機能不明の cysteine and glycine-rich protein 1 (CSR P 1) の細胞運動

能、浸潤能を Boyden Chamber 法やマトリゲルを用いた改変法にて検討を行った。しかしながら、CSR P 1 は、細胞運動能には関連性を認めなかった。今後、臨床検体を用いて、NME S 1 が癌の転移もしくは悪性度などと関連するかについて検討予定である。

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 3 件)

- (1) 新井誠人、他 8 名、Analysis of the methylation status of genes up-regulated by the demethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine, in esophageal squamous cell carcinoma, *Oncol Rep*, 20 (2), 405-412 2008. 査読有
- (2) 杉本貴史、新井誠人、他 3 名、Integrated analysis of expression and genome alteration reveals putative amplified target genes in esophageal cancer. *Oncol Rep*, 18 (2), 465-72 2007. 査読有
- (3) 弥富真理、新井誠人他 10 名 Altered gene expression by cisplatin in a human squamous cell lung carcinoma cell line. *Anticancer Res.* 27(5A):3235-43 2007. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 新井誠人 他、肝癌細胞株におけるエピジェネティック異常とマイクロRNAの関わり の 検 討、第 4 3 回 日 本 肝 臓 学 会 総 会、2007 年 5 月 31 日、東京
- (2) 新井誠人 他、食道扁平上皮癌における NME S 1 の役割の検討、第 93 回日本消化器病学会総会、2007 年 4 月 20 日、青森

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
新井 誠人 (ARAI MAKOTO)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30396684

- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし