

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590323

研究課題名（和文）高頻度なDNAメチル化異常を示す腫瘍を発生するトランスジェニックラットの作成

研究課題名（英文）Establishment of a transgenic rat model which develop tumors with high frequent aberrant DNA methylation

研究代表者

山下 聡 (YAMASHITA SATOSHI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：80321876

研究成果の概要（和文）：

DNAメチル化異常は発がんにおいて重要であり、個体レベルでの解析は今後益々重要になる。本研究では、メチル基転移酵素 Dnmt3b の発現誘導が可能なラットを作成し、Dnmt3b の高発現が悪性度の高い腫瘍の誘発に関与するか否かを明らかにすることを目的とした。発現調節型ラット Dnmt3b2 トランスジーンを作成した。さらに、作製した動物の応用可能性を広げるため、トランスジェニックマウスに変更、cDNA もマウスのものとした。今後、予定通りのマウスが作製できれば、DNAメチル化異常を促進・抑制する環境因子・生体内分子の評価が容易になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Aberrant DNA methylation is essential in carcinogenesis, and analysis using animal model is important. The aim of this study was to establish a transgenic rat that can control expression of DNA methyltransferase, Dnmt3b, and to clarify whether high Dnmt3b expression induce tumors with malignant phenotypes or not. The transgenes that can induce rat *Dnmt3b2* expression were constructed. For universal use, I decided to construct transgenic mouse, and the rat cDNA was replaced by a mouse cDNA. If a transgenic mouse is established, it will enable us to assess factors that induce or suppress aberrant DNA methylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト発がんには、遺伝子プロモーター領域の CpG アイランド (CGI) のメチル化に

よる遺伝子発現抑制（サイレンシング）が、極めて重要であることが多くの研究者により明らかになっている。一方で、DNAメチル

化異常を誘発する環境因子・生体内分子についての知見は極めて限られている。DNA メチル化異常の誘発には、標的細胞のみならず、炎症細胞等の関与も大きいと予測され、個体レベルでの解析が今後ますます重要になると考えられる。

これまでに研究代表者らは、多くの実験動物発がんモデルについて、遺伝子プロモーター領域 CGI の DNA メチル化異常を、ゲノム網羅的な方法により検索してきた。

3, 2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) とテストステロンにより誘発したラット前立腺がんでは DNA メチル化によりサイレンシングされる遺伝子を見出すことができたものの、他の複数のモデルでは、見出すことができなかった。世界的には、実験動物発がんモデルでの DNA メチル化異常の報告は散見されるが、適切に遺伝子プロモーター領域 CGI のメチル化および遺伝子発現抑制を解析した報告は 5 個以下と極めて少なかった。これらは、実験動物腫瘍におけるメチル化サイレンシング遺伝子はヒト腫瘍に比べて少ないことを強く示唆している。その原因として、変異原性物質による動物発がんモデルでは突然変異の関与が大きいこと、実験動物の腫瘍はヒト腫瘍に比べて悪性度が低いことに加え、実験動物では DNA メチル化異常が十分な頻度で誘発されていない可能性が考えられた。

そこで、研究代表者は、*de novo* のメチル化を担う DNA メチル基転移酵素 3B (DNMT3B) の遺伝子発現を、ヒト及びラットの腫瘍で検討した。ヒト腫瘍では、DNMT3B の発現が高いものが多いのに対し、ラット腫瘍では低いものがほとんどであった。従って、実験動物では、*Dnmt3b* の発現が低い、または、発現誘導がかかりにくいことが、腫瘍に DNA メチル化異常が少なく、悪性度が低いことの一因であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、*Dnmt3b* の発現が誘導可能なトランスジェニックラットを作製し、*Dnmt3b* の高発現がヒトの腫瘍と類似した悪性度の高い腫瘍の誘発に関与するか否かを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞 ヒト前立腺がん細胞株は ATCC より購入した。ラット前立腺がん細胞株は名古屋市立大学の高橋智先生より供与を受けた。遺伝子発現ベクターの導入は Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いて行った。

(2) 遺伝子発現ベクター pBlueScript II に Human EEF1A1 (Eukaryotic translation elongation factor 1A1) promoter および Chicken beta-globin insulator を組み入れ

たベクターは国立がん研究センター研究所の丹羽透博士より供与を受けた。pTRE2hyg, pTA2, pTEToff および pTRE2Luc は Clontech 社から購入した。

(3) *Dnmt3b* cDNA のクローニング ラット *Dnmt3b2* のクローニングは、ラット AT6.3 細胞の cDNA を作製、*Dnmt3b2* CDS (2.6kb) を PCR 増幅し、*Bam*HI を配した forward プライマー、*Sa*I を配した reverse プライマーを用いて nest PCR でさらに増幅した産物を pTRE2hyg に ligation することによって行った。クローニングの確認は *Xho*I 処理後の電気泳動によるインサート長の測定およびシーケンシングにより行った。マウス *Dnmt3b2* のクローニングは、マウス精巣組織の cDNA を作製し、同様に行った。

(4) 遺伝子発現解析 SYBR Green を用いたりアルタイム RT-PCR により行った。

(5) TET-OFF システムの動作確認 遺伝子導入効率が良好なヒト前立腺がん細胞株 PC3 および LNCaP に、pTRE2Luc および EEF1A1-tTA2 ベクター (または pTEToff) を遺伝子導入した。ドキシサイクリン存在および非存在下における pTRE2Luc 由来のルシフェラーゼの発現を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) およびルミノメーターを用いて測定し、比較することにより TET-OFF システムの動作確認を行った。

## 4. 研究成果

(1) 発現調節型ラット *Dnmt3b2* トランスジェニックラットの作製

*Dnmt3b* の発現が誘導可能なトランスジェニックラットを作成するために、まず、発現調節型ラット *Dnmt3b2* トランスジェニックラットを作製した。*Dnmt3b2* は DNMT3B の活性型アイソフォーム 2 種類のうち、ヒト腫瘍で主に発現増加している DNMT3B2 のラットホモログである。*Dnmt3b* を含む BAC を導入したマウス個体は胎生致死であることが既知である。そこで、胎生致死を避けるため、また、任意の時期に DNA メチル化が誘発されやすくするために、TET-system を活用した。遺伝子発現の On-Off が明瞭とされる TET-OFF-system を用いるために、2 個のトランスジェニックベクターを作製した (図)。

(a) EEF1A1-tTA2 ベクター

ユビキタスに遺伝子発現を誘導するヒト EEF1A1 プロモーターの下流に Tet リプレッサーを含む制御因子 (tTA2) をつないだ発現ベクターを作製した。一般に、トランスジェニックが安定して発現しない理由の一つとして、そのメチル化が知られている。本研究では、メチル化を促進することを目的とするので、導

入遺伝子をメチル化から防御することが必要と考えられた。そこで、導入配列の前後にインスレーターを挿入した。

(b) pTRE2-Dnmt3b2 ベクター

pTRE2-hyg ベクター (Tet 応答配列 (TRE) および minCMV プロモーターを持ち、ハイグロマイシン選択が可能なベクター) にラット *Dnmt3b2* cDNA を挿入した。

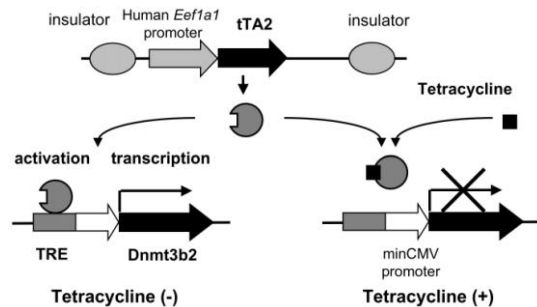


図 発現調節型ラット *Dnmt3b2* トランスジェン

(2) EEF1A1-tTA2 ベクターによる下流の遺伝子発現調節の確認

pTRE2Luc および EEF1A1-tTA2 ベクターを導入した PC3, LNCaP 細胞株においては、ドキシサイクリン存在下でルシフェラーゼの発現はそれぞれ 1/33 および 1/818 に減少していることが確認された。TET-OFF システムにおいて標準的に用いられている pTEToff を導入した場合はそれぞれ 1/133 および 1/783 に減少しており、EEF1A1-tTA2 は pTEToff と同等に機能して下流の遺伝子発現を低下し得ることが確認できた。

(3) minCMV プロモーターからの CpG 配列除去

pTRE2-Dnmt3b2 ベクターで用いている minCMV プロモーターは DNA メチル化により不活化される可能性が高いことが考えられた。そこで、minCMV 中の CpG 配列の C を全て T に置換したプライマーを作製、PCR で増幅した産物を制限酵素を用いて置換することにより、プロモーターを non CpG-minCMV プロモーターに置換した non-CpG-pTRE2-Dnmt3b2 ベクターを作製した。

(4) *Dnmt3b2* mRNA の発現調節の確認

PC3, LNCaP 細胞株に non-CpG-pTRE2-Dnmt3b2 および EEF1A1-tTA2 ベクターを導入し、ラット *Dnmt3b2* mRNA の発現を測定したところ、ドキシサイクリン存在下で *Dnmt3b2* の発現は 1/6 および 1/128 に減少していた。non-CpG-pTRE2-Dnmt3b2 および EEF1A1-tTA2 ベクターが *Dnmt3b2* を導入し、かつ、ドキシサイクリン存在下で *Dnmt3b2* mRNA 発現を減少させるシステムとして機能していること

が確認できた。

(5) マウス *Dnmt3b2* への置換

作製した動物の応用可能性を広げるため、動物種をマウスに変更した。non-CpG-pTRE2-Dnmt3b2 ベクターの *Dnmt3b2* をマウス cDNA 由来の *Dnmt3b2* に置換した。

(6) 今後の展望

今後、これらの構築したベクターを用いて、*Dnmt3b2* 発現の ON, OFF が任意に制御可能なトランスジェニックマウスの作成を進める。予想通りのモデルが作成できれば、DNA メチル化異常を促進・抑制する環境因子・生体内分子の評価が容易になると考えられる。

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 4 件)

Yamashita, S., Hosoya, K., Gyobu, K., Takeshima, H. and Ushijima, T. Development of a novel output value for quantitative assessment in methylated DNA immunoprecipitation-CpG island microarray analysis. *DNA Res.* 2009;16: 275-286. 査読有り

Ushijima, T. and Yamashita, S. Methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA). *Methods Mol Biol.* 2009;507:117-130. 査読有り

Nakajima, T., Enomoto, S., Yamashita, S., Ando, T., Nakanishi, Y., Nakazawa, K., Oda, I., Gotoda, T. and Ushijima, T. Persistence of a component of DNA methylation in gastric mucosae after *Helicobacter pylori* eradication. *J Gastroenterol.* 2010;45:37-44. 査読有り

Tomita, H., Hirata, A., Yamada, Y., Hata, K., Oyama, T., Mori, H., Yamashita, S., Ushijima, T. and Hara, A. Suppressive effect of global DNA hypomethylation on gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2010;31: 1627-1633. 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

山下 聡, 細谷浩介, 形部 憲, 牛島俊和 MeDIP-CpG アイランドマイクロアレイ解析においてメチル化レベルを定量するための新規指標の開発第 3 回エピジェネティクス研究会年会 2009 年 5 月 22 日東京

Yamashita, S., Hosoya, K., Gyobu, K.,

Lahoti, M. and Ushijima, T. Development of a Novel Output Value for Quantitative Assessment in Methylated DNA Immunoprecipitation-CpG Island Microarray Analysis. Epigenetics in Development and Diseases Conference: 4th Asian Epigenomics Meeting. August 24, 2009. Singapore

Yamashita, S., Hosoya, K., Gyobu, K. and Ushijima, T. A novel output value for quantitative assessment in methylated DNA immunoprecipitation-CpG island microarray analysis. 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月2日横浜

山下 聡、細谷浩介、形部 憲、竹島秀幸、牛島俊和 MeDIP-microarray による DNA メチル化解析において定量を可能にする新規指標 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日横浜

山下 聡、形部 憲、丹羽 透、岡 大嗣、井垣弘康、九嶋 亮治、大杉治司、李栄柱、末広茂文、牛島俊和 MeDIP-CpG アイランドマイクロアレイ解析による食道癌転移マーカーの同定第4回エピジェネティクス研究会年会 2010年5月29日鳥取

Satoshi Yamashita, Ken Gyobu, Toshikazu Ushijima. Identification of DNA methylation markers to predict metastasis of esophageal cancer by MeDIP-CpG island microarray analysis. The 5th Asian Epigenomics Meeting & A3 Symposium 2010 June 20, 2010. Jeju, Korea

Satoshi Yamashita, Ken Gyobu, Satoru Takahashi, Yasunori Matsuda, Toshikazu Ushijima. Testosterone overdose induces aberrant DNA methylation in the prostate. 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月22日大阪

Satoshi Yamashita, Satoru Takahashi, Ken Gyobu, Yasunori Matsuda, Toshikazu Ushijima. Testosterone overdose induces aberrant DNA methylation in the rat prostate. The 18th International Workshop on Genetic Systems in the Rat 2010年12月1日京都

[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]

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 聡 (YAMASHITA SATOSHI)

独立行政法人国立がん研究センター・エピゲ

ノム解析分野・ユニット長

研究者番号: 80321876

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し