

機関番号：72602  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21790332  
 研究課題名（和文）分子イメージングを用いた癌化に伴う INK4A 遺伝子発現サイレンシング機構の解析  
 研究課題名（英文）Analysis of silencing mechanism of INK4A gene expression during tumorigenesis with *in vivo* imaging system  
 研究代表者  
 山越 貴水（YAMAKOSHI KIMI）  
 財団法人癌研究会・癌研究所がん生物部・研究員  
 研究者番号：50423398

## 研究成果の概要（和文）：

癌化の過程で p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現がサイレンシングされるメカニズムを解明するためのアプローチとして、申請者が最近開発に成功したヒト p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子発現をマウスの生体内でリアルタイムに測定するシステムを用いて解析を進めた。その結果、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現は p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子転写制御領域のヒストンのメチル化というエピジェネティックな調節機構により制御されていることを見出すことが出来た。

## 研究成果の概要（英文）：

To elucidate molecular mechanisms of p16<sup>Ink4a</sup> gene silencing during tumorigenesis, we used bioluminescence imaging for non-invasive and real-time analysis of p16<sup>Ink4a</sup> expression under various physiological conditions in living mice. As a result, we discovered that oncogenic insults, such as Ras activation, provoke epigenetic de-repression of p16<sup>Ink4a</sup> expression through reduction of DNMT1 level as a DNA damage response *in vivo*.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子は、正常細胞に DNA ダメージや癌遺伝子の活性化など発癌の危険性が生じると発現が誘導され、サイクリン依存

性キナーゼ(CDK)インヒビターとして RB タンパク質を活性化させることにより、細胞周期を G1 期で停止させる機能を有する。また、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子はヒトの癌細胞において最も

高頻度に失活している癌抑制遺伝子の一つで、DNAの欠失や点突然変異、更にはDNAメチル化等、エピジェネティックな変化によっても失活していることが明らかとなっている。しかし、何故p16<sup>INK4a</sup>遺伝子は他の癌抑制遺伝子に比べ高頻度に失活しているかについては、未だ不明のままである。特に、遺伝子配列の異常ではなく、エピジェネティックな変化によりp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現がサイレンシングされる機構については、解明が進めば癌細胞においてサイレンシングを解除することで癌治療へ応用できる可能性があるにも関わらず、解析の難しさからこれまで殆ど研究がされてこなかった。一方、最近の研究からp16<sup>INK4a</sup>遺伝子の発現は培養条件に大きく影響を受けることが明らかにされており、p16<sup>INK4a</sup>遺伝子の発現制御については培養条件下ではなく生体内で解析を行うことが必要になってきている。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者が最近開発に成功したヒトp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現をマウスの生体内でリアルタイムに測定するシステムを用いて、発癌の進行過程でp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現のエピジェネティックなサイレンシング機構の詳細を明らかにすることを目的とした。更に、得られた成果を基にp16<sup>INK4a</sup>遺伝子のサイレンシングを防御する効果的な方法の開発を試み、癌の治療や予防に応用することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 皮膚発癌進行過程でのp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現動態の解析

既に確立されている皮膚化学発癌実験を行い、悪性腫瘍への進行過程でp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現動態をより詳細に解析し、p16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現が維持される悪性腫瘍と消失する悪性腫瘍の出現のタイミング及び頻度を明らかにする。

### (2) p16<sup>INK4a</sup>遺伝子転写制御領域のエピジェネティクス解析

p16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現が維持される悪性腫瘍組織と消失する悪性腫瘍組織の一部を継時的に採取し、p16<sup>INK4a</sup>遺伝子の欠失のみならず、p16<sup>INK4a</sup>遺伝子転写制御領域のエピジェネティックな変化について調べる。

### (3) p16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現をサイレンシングする因子の同定

p16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現が維持される悪性腫瘍と消失する悪性腫瘍の2つのタイプの悪性腫瘍を用いて、RBと相互作用する可能性のあ

る様々なヒストン修飾タンパク質やクロマチン結合タンパク質のp16<sup>INK4a</sup>遺伝子領域周辺への結合能の変化を詳細に解析する。ヒストン修飾状態やクロマチン結合タンパク質の挙動を継時的に比較検討することにより、機能性RBタンパク質のp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現サイレンシングにおける役割を明らかにする。

### (4) p16<sup>INK4a</sup>遺伝子サイレンシングの解除による癌抑制の試み

(3)の解析によりp16<sup>INK4a</sup>遺伝子の発現調節に関わることが確認された分子について、その発現を抑制するRNAiもしくはそれらの機能を抑制する化合物をスクリーニングし、得られた阻害剤を用いてp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現がサイレンシングされている癌細胞株を処理することでp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現が回復するかどうかを検討する。更に、得られた阻害剤もしくはRNAiをヒトp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現マウスへ投与し、発癌過程でp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現がどのように変化するかを解析することによりp16<sup>INK4a</sup>遺伝子サイレンシングの解除による癌治療の可能性を検討する。

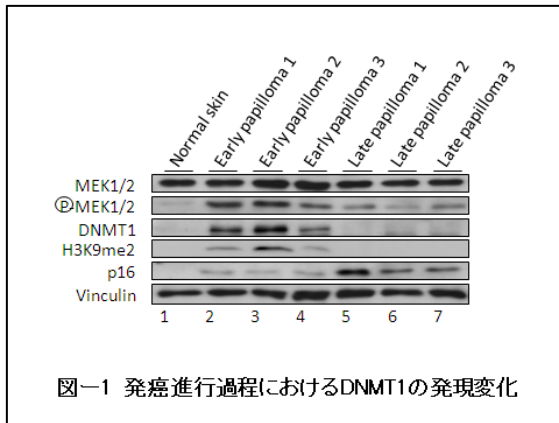
## 4. 研究成果

(1) 良性腫瘍が悪性腫瘍へ進行する過程でp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現が維持される悪性腫瘍と消失する悪性腫瘍の出現のタイミングを調べたところ、角化して退縮する前の悪性腫瘍においてp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現が低下した。また、その頻度はp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現が維持される悪性腫瘍と比べると低いことが分かった。

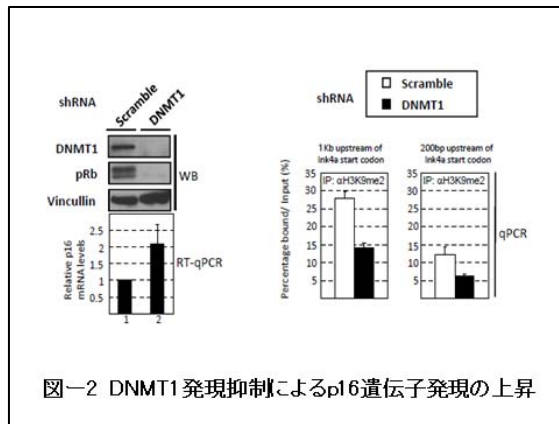
(2) 発癌進行過程におけるp16<sup>INK4a</sup>遺伝子転写制御領域のエピジェネティックな変化について調べたところ、p16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現はヒストン3リジン9のジメチル化(H3K9me2)によって負に調節を受けていることを見出した。そこで次に、p16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現が維持される悪性腫瘍組織と消失する悪性腫瘍組織を採取し、H3K9me2レベルを調べる必要があるが、現段階ではまだその結果を得ていない。

(3) p16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現を負に制御することが知られているDNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT1)はヒストンジメチレーズであるG9aと相互作用してH3K9me2を促進する機能のあることが報告されている。発癌進行過程でDNMT1の発現解析を行ったところ、良性腫瘍が形成されてからかなり時間が経過した後にp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現が上昇する後期の良性腫瘍ではDNMT1の発現が低下した(図1)。また、悪性腫瘍ではDNMT1の発現が顕著に上昇していた。これらの結果から、DNMT1がp16<sup>INK4a</sup>遺伝子発現のサイレンシングに関与

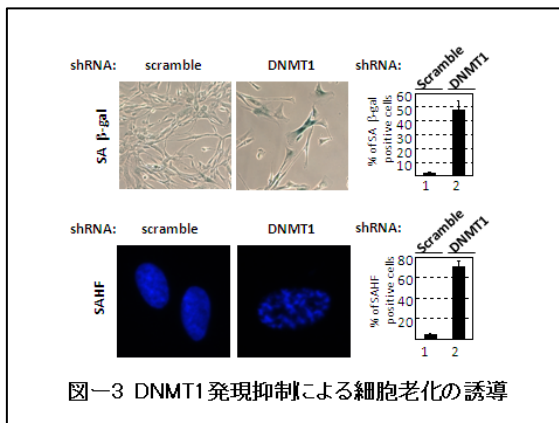
している可能性が示された。



(4)(3)の結果から、正常なヒト繊維芽細胞を用いて p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子発現をサイレンシングする DNMT1 の発現抑制を試みた。その結果、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子発現が顕著に上昇した(図二)。



また、DNMT1 の発現抑制による p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子発現の上昇とともに細胞老化が誘導されることも分かった(図三)。



この結果は、良性腫瘍が悪性化する過程においてヒストンのメチル化によって p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子発現がサイレンシングされている可能

性を示している。また、以上の結果は、ヒストンメチル化に関わる因子の阻害剤を癌細胞へ導入し、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子発現のサイレンシングを解除することで癌治療へ応用できる可能性が強く示された。

## 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 4 件)

- ① Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N., Yoshimoto, S., Tajima, T., Yamakoshi, K., Hirao, A., Yanagi, S., Fukami, K., Ishikawa, Y., Sone, S., Hara, E. & Ohtani, N. Intrinsic cooperation between p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>Waf1/Cip1</sup> in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Res.*, 15, 70(22), 9381-9390, 2010, 査読 有
- ② 山越貴水, 原英二、細胞老化研究の最前線、*メディカル・サイエンス・ダイジェスト*, Vol.36、4 (610) -7 (613)、2010 年、査読 無
- ③ Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A. & Hara, E. Real-time in vivo imaging of p16 gene expression: a new approach to study senescence stress signaling in living animals. *Cell. Div.*, 14, 5, 1. 2010, 査読 有
- ④ Yamakoshi, K., Takahashi, A., Hirota, F., Nakayama, R., Ishimaru, N., Kubo, Y., Mann, DJ., Ohmura, M., Hirao, A., Saya, H., Arase, S., Hayashi, Y., Nakao, K., Matsumoto, M., Ohtani, N. & Hara, E. Real-time in vivo imaging of p16<sup>INK4a</sup> reveals cross talk with p53. *J. Cell Biol.*, 10, 186(3), 393-407, 2009, 査読 有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Akiko Takahashi, Kimi Yamakoshi, Naoko Ohtani, Eiji Hara. Backup tumor suppressor role for p16<sup>Ink4a</sup> in the event of p53 inactivation. 第 33 回 日本分子生物学会年会・第 83 回 日本生化学会大会合同学会, 特別講演, 2010 年 12 月 (神戸)
- ② Kimi Yamakoshi, Akiko Takahashi, Naoko Ohtani, and Eiji Hara. Real-time *in vivo* imaging of p16<sup>Ink4a</sup> expression unveils a cross-talk between p53 and p16<sup>Ink4a</sup>. 2nd Salk Institute, Mechanisms and Models of Cancer meeting, 一般演題, 2009 年 8 月 (アメリカ合衆国カリフォルニア州ラ・ホヤ市)

〔図書〕（計 1 件）

- ① 山越貴水、原英二、インビボイメージングによる細胞老化誘導遺伝子 *p16<sup>INK4a</sup>* 及び p53 の機能解析、モデル動物利用マニュアル（仮題）、2011 年発刊予定、査読無

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山越 貴水 (YAMAKOSHI KIMI)  
財団法人癌研究会・癌研究所がん生物  
部・研究員  
研究者番号：50423398

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし