

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19354

研究課題名（和文）メチル化DNAの塩基配列特異的in situ検出技術の開発研究

研究課題名（英文）Development of nucleotide sequence-specific in situ detection technology for methylated DNA

研究代表者

北澤 荘平（Kitazawa, Sohei）

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90186239

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：現在iPS細胞を用いた再生医学、加齢研究への応用研究が急速な展開を示す一方で、遺伝子のre-programming現象の詳細やagingについては手探りの状態が続いている。メチル化シトシンを中心とするエピジェネティクス解析を、非病変部や血管などの正常構造を含むヘテロな材料に対して、生化学的手法のみで遂行することの限界を示している。代表者らは、組織細胞構造を保ったまま、特定塩基配列に存在する地と新メチル化をICONプローブとrolling circle amplification法を用いて「形態学に即したエピジェネティクス研究」という新たな研究分野の開拓を、この研究費により推進することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、これまでの組織化学的手法では、解析不可能であった遺伝子の特定部位のメチル化シトシンの有無を組織切片上で同定する事を可能とした。病理組織学的な診断手法の確立、再生過程におけるエピジェネティクス制御機構のre-programming現象の詳細、発生過程における遺伝子刷り込み現象や組織・器官形成の多様性とメチル化との関連、さらには癌をはじめとする種々の病理病態におけるエピジェネティクス制御機構の破綻、加齢におけるミトコンドリアのDNAメチル化についての解析など、広い範囲の研究、診断、臨床医学に対して、分野横断的に展開させることが可能であり、その研究成果の適応範囲はきわめて広範である。

研究成果の概要（英文）：While research on the application of iPS cells to regenerative medicine and aging research is currently showing rapid development, the details of gene re-programming phenomena and aging remain in a state of exploration. Epigenetics analysis centered on methylated cytosine has shown the limitation of using only biochemical methods for heterogeneous materials including normal structures such as non-pathological lesions and blood vessels. This grant has enabled the Principal Investigator and his colleagues to explore a new research field of “morphology-based epigenetics research” by using ICON probes and rolling circle amplification method to identify land and new methylation in specific sequences while preserving tissue cell structure. The research grant has enabled us to promote the development of a new research field of “morphology-based epigenetics.”

研究分野：病理学

キーワード：メチル化シトシン in situ hybridization 組織細胞化学 病理診断 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクス制御機構は、iPS 細胞による再生医療をはじめとするポストゲノム研究の最重要課題の一つである。メチル化シトシンは、エピジェネティクス制御機構の主体をなす DNA 修飾であり、細胞・組織分化や腫瘍発生・進展、老化現象などに重要である。DNA 塩基配列レベルのヒトゲノム解析が終了し、現在 iPS 細胞を用いた再生医学、加齢研究への応用研究が急速な展開を示す一方で、再生に極めて重要な遺伝子の re-programming 現象の詳細や制御方法については手探りの状態が続いている。これは、メチル化シトシンを中心とするエピジェネティクス解析を、非病変部や血管などの正常構造を含むヘテロな材料に対して、生化学的手法のみで遂行することの限界を示しており、組織細胞化学の新たな手法の開発が急務であった。

2. 研究の目的

本研究課題は、遺伝子の特定部位、特にミトコンドリア D-loop、遺伝子調節 (promoter) 領域、ゲノム刷り込み現象に関与する領域のメチル化シトシンの状態を、細胞や組織の形態を保ったまま (in situ) で検出する新たな組織化学的手法の確立を世界に先駆けて開発することを目指すものである。相補的に結合したシトシンがメチル化している場合に特異的に錯体を形成する構造をグアニンに認識したプローブと組織切片・染色体上での in situ DNA 増幅法 (Padlock probe 法) とを併用する新規の形態学的手法により、腫瘍をはじめとする種々の病態発生に関与するエピジェネティクス変化を細胞内小器官レベルで、高感度で特異的に検出する技術開発を目標とした。

3. 研究の方法

当該研究の前半期には、標的のメチル化シトシンに対してオスミウム酸錯体を形成し、標的 DNA との間に強固な結合を形成するプローブ作成を中心に、メチル化部位特異的なプライマー配列と、組織切片・染色体標本上での in situ DNA 増幅法 (Padlock プローブ法) の条件最適化を重点的に行い、後半期には単一遺伝子での検出、細胞内小器官レベルでの検出適応の拡大、病理診断へむけて、以下の様な研究を行う。

細胞・組織切片上でのメチル化シトシン-標識グアニン複合体の検出(培養細胞を用いた予検討) in situ hybridization に用いる細胞の固定条件を決定するために、種々の固定液、固定時間、固定後処理について検討する。最終的には、病理組織の固定に最も汎用されている 10%ホルマリン固定、パラフィン包埋検体を用いた検出が可能となる条件を決定する。メチル化シトシンは、申請者等の検討 (Lab Invest 2000, JBMR 2001, Cancer Science 2004, Histochem Cell Biol, 2018) で、包埋後 10 余年を経過しても安定な状態で保存されており、過去に蓄積されてきた病理組織標本を用いた後向き解析が可能であることを想定している。さらに、Padlock 法での合成過程で伸張する DNA を直接蛍光標式することにより、更なる感度の向上を図り、単一メチル化シトシン塩基の組織細胞化学的検出を目指す。

病理組織標本でのメチル化シトシンの in situ での検出とその病態解析への展開：これまで解析が不可能であった、ゲノム刷り込み現象と癌、再生・リプログラミングにおける脱メチル化の機構、発生初期におけるメチル化シトシンパターンの形成過程、老化現象・酸化的ストレスとミトコンドリア DNA のメチル化、および非 CpG-island 領域のメチル化による遺伝子発現制御と病理病態との関わりなどの応用研究へと発展させることが可能である。最終年度には、これらの応用研究への発展を目指して臨床病理学的検討を進める。病理学教室や病理検査室において、過去に蓄積した病理組織を有効に活用する。その際、組織における DNA は多くの核内蛋白質などとクロスリンクされているため、強い蛋白分解酵素による前処理が必要であり、その最適な条件を種々の detergent で検討する。

4. 研究成果

本研究課題においては、従来の組織化学では不可能であった、遺伝子発現制御の形態学的解析、特に DNA のメチル化解析を、細胞・組織構造を保ったまま行うことを可能とした。これは、DNA メチル化を中心としたエピジェネティクス制御機構を形態学的研究へと広く展開させる可能性を持つものである。メチル化シトシンの検出には、メチル化シトシンと相補的な位置のプローブとなる DNA 中のグアニンに標識を行い、メチル化シトシンと特異的かつ強固に結合した標識グアニンプローブを基軸として、padlock probe により、常温での DNA 増幅法による伸展反応を行い、組織切片上で形態を温存しつつ、DNA 伸展中に標識核酸をとりこませることで遂行可能であった。加齢におけるミトコンドリアの DNA メチル化についての解析、神経組織、特に海馬、小脳の神経細胞に於けるミトコンドリア DNA のメチル化の検出が可能となった。これらの成果は直ちに発生学、再生医学、加齢研究、癌研究へと広領域に分野横断的な応用展開が期待できる。本研究は、これまでの組織化学的手法では、解析不可能であった遺伝子の特定部位のメチル化シトシンの有無を組織切片上で同定することを目的としたものである。特定塩基配列でのメチル化シトシンと強固に結合する標識プローブと結合後の Padlock プローブによる in situ DNA 増

幅による検出は、これまでにない新たな組織細胞化学的手法である。再生過程におけるエピジェネティクス制御機構の re-programming 現象の詳細、発生過程における遺伝子刷り込み現象や組織・器官形成の多様性とメチル化との関連、さらには癌をはじめとする種々の病理病態におけるエピジェネティクス制御機構の破綻、など、広い範囲の研究、診断、臨床医学に対して、分野横断的に展開させることが可能であり、その研究成果の適応範囲はきわめて広範である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yan M, Komatsu N, Muro R, Huynh N, Tomofuji Y, Okada Y, Suzuki H, Takaba H, Kitazawa R, Kitazawa S, Pluemsakunthai W, Mistui Y, Satoh T, Okamura T, Nitta T, Im S, Kim C, Kollias G, Tanaka S, Okamoto K, Tsukasaki M, Takayanagi H	4. 巻 23
2. 論文標題 ETS1 Governs Pathological Tissue-remodeling Programs in Disease-associated Fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1330-1341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-022-01285-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitazawa S, Haraguchi R, Takaoka Y, Kitazawa R	4. 巻 159
2. 論文標題 In Situ Sequence-specific Visualization of Single Methylated Cytosine on Tissue Sections Using ICON Probe and Rolling-circle Amplification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 263-273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-022-02165-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kitazawa S, Ohno T, Haraguch R, Kitazawa R	4. 巻 55
2. 論文標題 Histochemistry, Cytochemistry and Epigenetics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Histochemica et Cytochemica	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.21-00095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 北澤 荘平	4. 巻 40
2. 論文標題 エピジェネティクスと病理 エピジェネティクス総論	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 病理と臨床	6. 最初と最後の頁 102-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitazawa S, Ohno T, Haraguch R, Kitazawa R	4. 巻 55
2. 論文標題 Histochemistry, Cytochemistry and Epigenetics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Histochemica et Cytochemica	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.21-00095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 北澤 荘平	4. 巻 40
2. 論文標題 特集編集: エピジェネティクスと病理	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 病理と臨床	6. 最初と最後の頁 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 北澤 荘平	4. 巻 40
2. 論文標題 エピジェネティクス総論	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 病理と臨床	6. 最初と最後の頁 102-108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 北澤 荘平、原口 竜摩、小原 幸弘、鷹岡 友紀、北澤 理子	4. 巻 41
2. 論文標題 組織細胞化学2021	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 組織細胞化学2021	6. 最初と最後の頁 199-211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野 真理, 北澤 理子, 原口 竜摩, 小原 幸弘, 井上 潮音, 遠香 董, 北澤 荘平
2. 発表標題 in vitro共培養系を用いた破骨細胞分化における腫瘍細胞の機能考察
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三瀬 萌絵, 原口 竜摩, 平田 佳那, 北澤 荘平, 北澤 理子
2. 発表標題 エストロゲンはmRNAの半減期を短縮させることで破骨細胞分化因子RANKLを抑制する
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原口 竜摩, 小原 幸弘, 北澤 理子, 北澤 荘平
2. 発表標題 Wntシグナル調節分子sFRP4の腎臓老化における機能考察
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北澤 理子, 原口 竜摩, 谷脇 真潮, 北澤 荘平
2. 発表標題 実験的加齢モデルにおける破骨細胞分化因子受容体RANKのプロモータ領域CpGメチル化による発現低下
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	北澤 理子 (Riko Kitazawa) (00273780)	愛媛大学・医学部附属病院・准教授 (16301)	
研究 分担者	原口 竜摩 (Rhuma Haraguchi) (00423690)	愛媛大学・医学系研究科・准教授 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------