

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 21日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791350

研究課題名（和文） 悪性脳腫瘍におけるメチル化遺伝子とヒストンのメチル化による
癌化機構の解明研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism of cancer by methylation of histone
and methylated genes in malignant brain tumor

研究代表者

中原 由紀子（NAKAHARA YUKIKO）

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：50380770

研究成果の概要（和文）：膠芽腫の細胞株と臨床標本における EHMT1 の発現や H3K9 の methylation status について検討した。膠芽腫細胞株である U87MG 株および T98G, U251MG 株、U118MG 株、A172 株に対して genomic quantitative PCR を行った。いずれの細胞株でも LOH を示唆する結果は得られなかった。EHMT1 遺伝子のシーケンスを試みが、mutation は検出されなかった。また、quantitative RT-PCR の手法を用いて EHMT1 遺伝子の転写活性を評価した。メッセンジャーRNA でも発現は認めなかった。細胞株ならびに臨床摘出標本に対し、ウエスタンブロッティングを行ったが EHMT1 蛋白の発現低下は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：We examined the genetic and epigenetic aberration of EHMT1 gene in the several glioblastoma cell lines and clinical specimen. Genomic quantitative PCR was performed in glioblastoma cell lines, such as U87MG, T98G, U251MG, U118MG and A 172. None of all cell lines showed the loss of heterozygosity. We did not detect the mutation of the EHMT1 gene on genomic sequence. We also examine the expression levels of mRNA and protein of EHMT1 using quantitative RT-PCR and Western blotting method in glioblastoma cell lines and clinical specimen. The expression of mRNA and protein of EHMT1 did not decrease in those materials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：エピジェネティクス、メチル化、膠芽腫、EHMT1

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫の一種である膠芽腫は、生存期間中央値が1年と臨床的に最も悪性な腫瘍のひとつである。近年、日本国内でも承認されたアル

キル化剤 (Temozolomide) と放射線照射の併用療法が生存期間を延長したとの報告がなされ、世界的な標準治療となっているが、延長し得た生存期間はわずか2カ月に過ぎない。海外ではすでにいくつかの分子標的治療薬が開発され、

膠芽腫の再発例に対して使用されているが、その治療成績も予後を改善させるところまでは至っていない。手術以外の有効な治療法の確立は我々脳外科医にとって急務である。この現状をふまえ分子生物学的に膠芽腫の性質を明らかにしていくことは治療戦略を構築する上で極めて重要であり、将来の分子標的治療薬開発につながるものと考えられる。

これまで我々は悪性脳腫瘍に対して様々な分子生物学的手法を用いて、ゲノム解析、エピジェネティクス解析を行ってきた。網羅的な遺伝子解析を行い、その中から悪性脳腫瘍において癌抑制遺伝子として働いている可能性がある遺伝子を同定可能であった研究もある。

しかし一方で、異常を示す遺伝子は多数あり、その中でどの遺伝子が癌化に強く関与しているのかを決定することは難しい。膠芽腫は不均一性(heterogeneity)を強く示す腫瘍として特徴づけられており、特に癌遺伝子、癌抑制遺伝子を特定することは困難であるといわれてきた。単一の遺伝子異常にとらわれるのではなく、それぞれの遺伝子異常がどのように関連しているのか、分子生物学的な“系”の中で異常を示した遺伝子群を関連づけていくことが重要であると考えられる。

現在、癌では DNA メチル化およびヒストンのメチル化に依存した遺伝子不活化機構が注目されている。他臓器の癌では、この“機構=系”によって不活化される遺伝子として p16 や hMLH1, BRCA1 などが挙げられている。従来の網羅的な遺伝子異常解析で検出されていた個々の遺伝子異常は“DNA メチル化-ヒストンメチル化系”の異常の結果として検出されていたものであり、個々の単一遺伝子の異常の上流に“DNA メチル化-ヒストンメチル化系”の異常が存在すると考えられる。

我々は、小児の代表的な悪性脳腫瘍である髄芽腫において、網羅的な遺伝子解析を行い、これまで報告のなかった多数の遺伝子の増幅や欠失を検出し、癌遺伝子、癌抑制遺伝子としての可能性を示唆したが、その中に非常に興味深い遺伝子、*Euchromatin Histone Methyltransferase 1 gene (EHMT1)* を認めた。髄芽腫において *EHMT1* 遺伝子は deletion および methylation により不活化されていることを発見した。*EHMT1* はヒストン H3 の Lys9 (H3K9) を特異的にメチル化する働きがある。さらに我々は髄芽腫において H3K9 が hypomethylation の状態であることを示し、網羅的な遺伝子解析において異常を示した遺伝子群の中に H3K9 に関

連した遺伝子を多数検出した (*Nature Genetics* 41, 465-472, 2009)。この報告は悪性脳腫瘍を対象とした研究の中で、世界で初めて *EHMT1*, *H3K9* について検討したものである。これまで他臓器癌で指摘されていたように、悪性脳腫瘍の分野でも DNA メチル化とヒストンのメチル化が密接に関連し、重要な遺伝子不活化機構として存在している可能性があると考えられる。

以上をふまえ、“DNA メチル化-ヒストンメチル化”の異常が、成人の悪性脳腫瘍である膠芽腫においても遺伝子不活化機構として働き、癌化に関与しているのではないかとという着想に至った。まず、膠芽腫の細胞株と臨床標本における *EHMT1* の発現や *H3K9* の methylation status について検討したい。これまで膠芽腫に対して行われた網羅的ゲノム解析で検出されていた膨大な数の遺伝子異常は、この“DNA メチル化-ヒストンメチル化”の異常から惹起された結果として検出された現象である可能性がある。さらに髄芽腫同様に膠芽腫においても *H3K9* が hypomethylation であることが証明されれば、*H3K9* を特異的にメチル化させるという新たな分子標的治療薬が開発でき、ひいては膠芽腫患者の生存期間を延長させる治療法の開発につながることを期待して、この研究をすすめていきたい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膠芽腫に対し *Euchromatin Histone Methyltransferase 1 (EHMT1)* とヒストン *H3K9* について検討する。これらの分子に関連した癌化制御機構を解明し、新たな分子標的治療薬を開発するための基礎研究結果を得ることである。

EHMT1 遺伝子のゲノム、発現解析をおこない、*EHMT1* が不活化されているか、その機序はゲノム上の変化かエピジェネティックな変化であるかを決定する。*EHMT1* の不活化と *H3K9* のメチル化に逆相関があるかを検討する。*H3K9* を特異的にメチル化する働きをしている *EHMT1* が不活化され、*H3K9* は hypomethylation となっていると予想している。*H3K9* によって影響を受ける遺伝子を同定し、膠芽腫の増殖メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 膠芽腫における *EHMT1* 遺伝子のゲノム、発現解析

- ① EHMT1 蛋白の発現解析を行う。抗 EHMT1 抗体を用いて、正常脳および膠芽腫細胞株における EHMT1 の蛋白発現を評価する。
 - ② 膠芽腫細胞株から mRNA を抽出し qPCR で発現量を定量化し、EHMT1 の発現が高い株と低い株を決定する。
 - ③ EHMT1 遺伝子が不活化されている機序を解析する。細胞株を用いて、不活化がゲノム異常によるのか、エピジェネティックな抑制機構が働いているかを検討する。
 - ④ 臨床摘出標本に対して抗 EHMT1 抗体を用いた Tissue microarray を行い、発現を評価する。凍結組織が確保できた検体については、蛋白発現、転写活性を定量する。
 - ⑤ EHMT1 の不活化が癌化に関与しているかどうかを検討する。EHMT1 construct を作製し、低発現株に EHMT1 を強制発現させ cell proliferation assay を行う。EHMT1 の不活化が癌化に関与していれば、EHMT1 を強制発現させた細胞株では細胞増殖が抑制されると予想される。
- 膠芽腫において EHMT1 が不活化されているか、不活化されていれば癌化と関連があるか、その機序はゲノム上の変化かエピジェネティックな変化によるものかを決定できる。

(2) EHMT1 遺伝子の不活化と H3K9 のメチル化に逆相関があるか

- ① 膠芽腫細胞株に対し Chromatin immunoprecipitation analysis を行い H3K9 のジメチル化の程度を評価する。
- ② 臨床摘出標本に対し、抗 dimethyl-H3K9 抗体を用いた免疫組織染色を行う。

H3K9 を特異的にメチル化する働きをしている EHMT1 が不活化されていることで、H3K9 は hypomethylation となっていることが予想される。

(3) H3K9 の methylation status で影響を受ける遺伝子の同定

膠芽腫細胞株のうち仮説に沿った結果を示した細胞株について、抗 acetyl-H3K9 抗体と抗 dimethyl-H3K9 抗体を用いたクロマチン ChIP-chip 法を行う。

4. 研究成果

細胞株は継代を重ねるにつれ、ゲノム変化とともにエピジェネティックな変化もきたすことがひろく知られている。したがって、本

研究においては初代培養株を使用することが適していると考えた。代表的な膠芽腫細胞株として U87MG 株および T98G 株の初代培養株を購入した。この 2 株は古くから膠芽腫の基礎研究に用いられてきた株で、これまでに多数の遺伝子異常が網羅的に解析されており、データベースから得られる遺伝学的情報も豊富な細胞株である。

研究の方法(1)にあげているように、まず、膠芽腫細胞株における EHMT1 遺伝子のゲノムを開始した。EHMT1 遺伝子は UCSU Genome Browser によると、第 9 番染色体に存在し 16 個のエクソンをもつ。Microarray のデータによると、adult および fetal の大脳において、優位な遺伝子の増幅、欠失は認めないとされている。

まず、U87 株と T98 株を培養し、genomic quantitative PCR を行った。この二つの細胞株では LOH を示唆する結果は得られなかった。EHMT1 遺伝子のシーケンスを試みた。しかし、mutation は検出されず、ジェノミックな異常は認めなかった。

並行して、EHMT1 の発現解析を行った。U87MG 株と T98 株から、メッセンジャー RNA を抽出した。quantitative RT-PCR の手法を用いて EHMT1 遺伝子の転写活性を評価した。UCSU Genome Browser の Microarray のデータから、コントロールサンプルとしてラットの大脳組織を使用することにした。しかし、quantitative RT-PCR の結果は、U87MG 株および T98 株ともにメッセンジャー RNA レベルでの転写活性は低下しておらず、コントロールと同等の発現レベルであった。

つぎに、蛋白レベルでの EHMT1 の発現を評価することを試みた。UCSU Genome Browser のデータベースで検索をしたところ、ヒトの組織から培養された細胞株のうち、kidney の細胞株である HEK-293 株において、EHMT1 蛋白が高い発現を示すことがわかった。この細胞株を入手し、positive control 株として使用することにした。U87MG 株と T98 株から蛋白を抽出し、ウエスタンブロッティングを行った。しかし、ウエスタンブロッティングでも、quantitative RT-PCR の結果と同様に、U87 株、T98 株はともに、EHMT1 蛋白を発現していた。二つの結果は整合性を持っており、正しい結果と判断した。

本研究は、膠芽腫において EHMT1 の発現が低下しているという点が、仮説の第一段階であり、これが証明されなければ、膠芽腫の癌

化機構を解明するという目的が達成できないと考えられた。したがって、初代培養を購入した U87MG 株、T98 株のほかに、当施設で保有していた膠芽腫細胞株、U251MG 株、U118MG 株、A172 株についても検討することにした。購入時に保存していた細胞株の mother stock から細胞を培養し、U87MG 株、T98 株と同様に、quantitative RT-PCR およびウエスタンブロッティングを行った。いずれの細胞株においてもメッセンジャーRNA 転写活性および、EHMT1 蛋白発現ともに低下している細胞株は認められなかった。

膠芽腫細胞株では、EHMT1 蛋白の発現低下は証明することができなかったが、quantitative RT-PCR およびウエスタンブロッティングの条件は確立することができていたため、実際の膠芽腫患者から摘出した臨床標本で検討することにした。当教室で凍結標本として保存されていた臨床検体は少なく、また、脳腫瘍という腫瘍の性質上、十分量の組織量が得られないことが多かった。さらに、膠芽腫は非常に heterogeneous な腫瘍であることも、実験結果に大きく影響したと考えられる。これまで当院で摘出した標本に関しては、パラフィン切片で保存しているものが多かったため、EHMT1 蛋白の発現解析には EHMT1 抗体を用いた免疫染色が有用と考え試みた。ここでも膠芽腫の heterogeneity が評価を困難にさせた。

これまでに小児の代表的悪性脳腫瘍である髄芽腫において、EHMT1 の発現が低下し、その機序は、EHMT1 遺伝子が deletion および methylation により不活化されていることを報告していた。

本研究の出発点は、EHMT1 の発現低下が、髄芽腫と同様に、成人の悪性脳腫瘍の代表である膠芽腫においても認められるのではないかという仮説から、膠芽腫の発現機構の解明に発展させる計画であったが、発現低下自体の評価が困難であった。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 由紀子 (NAKAHARA YUKIKO)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：50380770

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし