

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19380

研究課題名（和文）一酸化窒素によるエピジェネティクス依存的誘導遺伝子のデータベース構築

研究課題名（英文）Database construction of epigenetics-dependent gene induction by nitric oxide

研究代表者

上原 孝（Uehara, Takashi）

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：00261321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、DNMTの活性変化を介したNOによるエピジェネティック制御を受ける遺伝子群を同定することである。そこで、種々の培養細胞にNOドナーを曝露し、発現レベルが変化する遺伝子群を同定した。その結果、1) NOは細胞株ごとに異なる遺伝子の発現パターンを変化させること、2) NOにより発現変動する遺伝子は細胞株間に共通したパスウェイに濃縮されないこと、3) NOにより発現変動する遺伝子はがんの発症や悪性化に関わるものが多いこと、が明らかとなった。以上の結果より、NOはDNA脱メチル化を誘導し、細胞ごとに異なる遺伝子の発現を広範に変化させることで、がんの発症・悪性化を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NOによって発現が変動する遺伝子の機能的なプロファイリングを行った。同定した発現変動遺伝子をそれぞれの由来組織の機能・がんに関与するかを文献やデータベースによって調査し、発現変動遺伝子と細胞株の由来組織との関連を推定した。その結果、各細胞株の由来組織の機能に関連した発現変動遺伝子はあまり得られず、がんの発症や悪性化に関わるものが知られている遺伝子が多く発現上昇している傾向が見られた。以上の結果より、NOはその組織の機能に関与する変化を引き起こす可能性が低く、特定の遺伝子発現の変化を介したがんの発症や悪性化を促す可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify a group of genes epigenetically regulated by NO through changes in DNMT activity. We exposed various cultured cells to NO donor and identified a group of genes with altered expression levels. The results revealed that: 1) NO alters the expression patterns of genes that differ among cell lines, 2) genes whose expression changes due to NO are not enriched in common pathways among cell lines, and 3) many genes are involved in cancer development and malignant transformation. These results suggested that NO may promote cancer development and malignant transformation by inducing DNA demethylation and broadly altering the expression of genes that differ from cell to cell.

研究分野：薬理学

キーワード：一酸化窒素 酸化ストレス エピゲノム DNAメチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、染色体クロマチンの翻訳後(後天的)修飾に注目が集まっている。特に、ゲノム DNA のメチル化などは遺伝子発現制御、すなわち、エピジェネティクスに関わり、この機構破綻が多くの疾患発症に繋がることが証明されつつある。しかしながら、エピゲノム制御酵素が生体内でどのように調節されているのかは全く不明である。申請者は先行研究から、DNA をメチル化する唯一の酵素である DNA メチル基転移酵素(DNMT)は一酸化窒素(NO)によって酸化(S-ニトロシル化)されて酵素活性が抑制されることを発見した(*Nature Communications* 2023)。その結果、ゲノム CpG 領域の脱メチル化が亢進し、遺伝子が誘導されることを見出した。さらには、ヒト大腸がんサンプルや発がんモデルマウスでも DNMT の酸化(S-ニトロシル化)修飾が認められた。

これまで NO は神経変性疾患、炎症反応を伴うがん、慢性閉塞性肺疾患(COPD)などに加え、最近では COVID-19(SARS-CoV2 感染によるサイトカインストームに伴う異常産生)における重症化・発症にも関わる可能性が指摘されている。一般に NO を含めた酸化ストレスによる遺伝子誘導機構は複雑であり、その詳細を調べることは困難であった。この問題を解決することが出来れば、エピゲノム異常によって誘導される遺伝子群が明らかになり、将来的に遺伝子のプロファイリングにも役立つと予想される。また、疾患関連因子やマーカー遺伝子の選出にも大いに役立つ。そのため

には、NO 刺激に伴う DNMT 不全に起因した遺伝子変動のみを特異的に抽出しなければならない。そこで申請者は、DNMT の酵素活性には影響せず、酸化(S-ニトロシル化)のみを分子特異的に阻害する化合物の作出に着手し、低濃度で薬理効果を発揮する薬物(DBIC と命名)の開発に成功した(特許第 6887640 号)。この化合物を利用することで、NO 誘発性遺伝子が DNMT 抑制を介したエピジェネティックな制御を受けているか否かを薬理的に明らかにすることが可能となった。

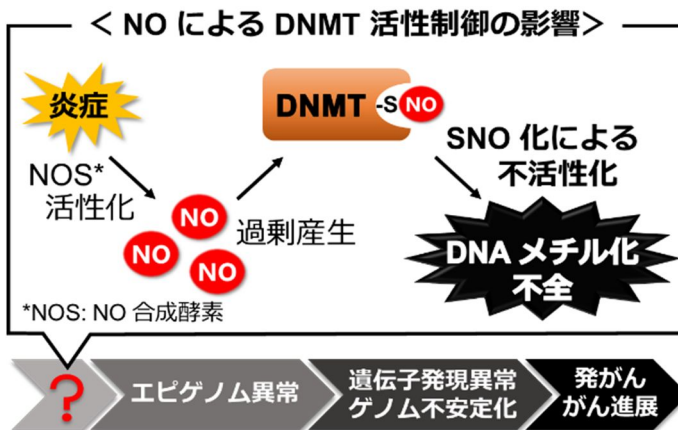


図 1. 研究背景の全体像

2. 研究の目的

炎症由来の一酸化窒素(NO)は発がんに寄与することが報告されている。NO は S-ニトロシル化(SNO 化)修飾を介して様々なタンパク質の機能を制御する。これまで我々は、DNA メチル化を触媒する DNMT が SNO 化を受け、酵素活性が低下することを見出した。さらに NO は細胞周期調節因子 *CCND2* のプロモーター周辺における CpG 脱メチル化ならびに遺伝子発現を誘導することを見出した。以上より、エピジェネティック制御における NO の役割を明らかにすることは、がんをはじめとする種々の病態解明につながると予想された。そこで本研究では DNMT の活性変化を介した NO によるエピジェネティック制御を受ける遺伝子群を異なる細胞種から同定することを目的とした。そこで、NO によってエピジェネティックス依存的に誘導される遺伝子を RNA-seq に供して網羅的に特定し、細胞種間で比較・データベース化することを計画した。

3. 研究の方法

NO のゲノムワイドな影響を検証するため、次世代シーケンサーを用いて培養細胞株のトランスクリプ

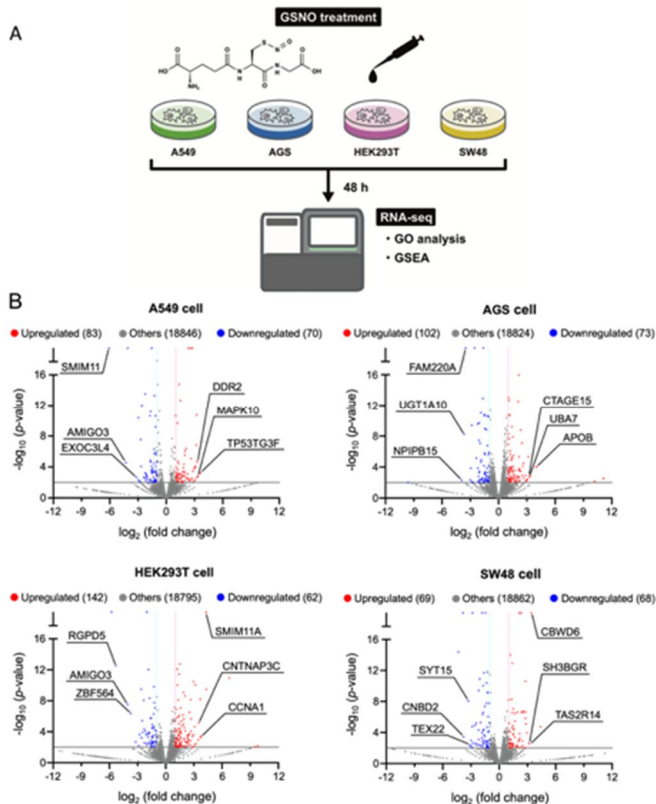


図 2. NO 処理による遺伝子発現変化

A: 実験方法の概略

B: 各細胞における遺伝子変化: 各細胞株に 100 μM GSN0 を 48 時間処理し、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。

トームを網羅的に解析した .RNA-seq により遺伝子発現に対する NO の影響を各細胞株において網羅的に解析した .RNA-seq に供した細胞株は、がん発症・悪性化における NO 処理の遺伝子発現に与える影響を解析するため、ヒト由来のがん細胞株としてヒト肺基底上皮腺がん由来細胞株 A549、ヒト結腸上皮腺がん由来細胞株 Sw48、ヒト胃粘膜上皮がん由来細胞株 AGS を用いた .また、正常組織由来の細胞株によってがん細胞由来の細胞株との比較を行うため、ヒト胎児腎臓上皮細胞由来細胞株 HEK293T を用いた .これらは炎症が発がんに関与することが知られている組織に由来する細胞株から選定した .さらに各組織から重複なく一つずつ細胞株を選定することで、NO のトランスクリプトームへの影響が組織によって異なるか否かを検証することを目指した .NO 供与体としては S-ニトロソチオールに分類される化合物の中から、半減期が長く持続的に NO を放出しうる GSNO を用いた .Fold change が計算できた 18999 遺伝子について縦軸に \log_{10} 変換した p -value、横軸に \log_2 変換した Fold change の値をとった volcano plot を行った .さらに $p < 0.01$ の遺伝子を Differentially expressed genes (DEGs) として定義し、コントロールと比較して GSNO を処理した場合に発現増加した遺伝子 (Upregulated DEGs) および発現低下した遺伝子 (Downregulated DEGs) を同定した .

4 . 研究成果

(1) 培養細胞株のトランスクリプトームに対する NO の影響

NO により発現変動する可能性のある遺伝子を各細胞株で同定した (図 2) . 発現変動遺伝子の細胞株間での共通性を比較するため、ベン図の作成を行った (図 3) . その結果、発現上昇・発現低下遺伝子の双方において、細胞株間に共通する発現変動遺伝子はほとんど認められなかった .

そこで、発現変動遺伝子の機能的な共通性が存在するかを明らかにするためパスウェイ解析を行った . その結果発現上昇・発現低下の双方において、機能的に類似した遺伝子群 (パスウェイ) の濃縮は各細胞株に共通したものは見られなかった .

これらの結果によって、生体内で産生される NO が各組織で異なるトランスクリプトーム変化を誘導する可能性が示唆された . すなわち NO が誘導する遺伝子発現変化は、特定の遺伝子や特定の機能を持った遺伝子群に集中せず、各組織に特徴的な遺伝子が発現変動する可能性が推定された . DNA メチル化のパターンは各組織によって大きく異なることが知られており、それが組織ごとに特徴的な遺伝子発現パターンを示すことが示唆されている . 本研究によって NO により発現変動する遺伝子が各細胞株で異なることが明らかになったことから、NO がゲノム上の広い領域で DNA メチル化の変化を介した遺伝子発現を誘導するか、更なる検討が必要である .

(2) 発現変動遺伝子の機能的プロファイリング

NO が発現変動を誘導する遺伝子が各組織によって異なることの機能的な意義を推定するため、

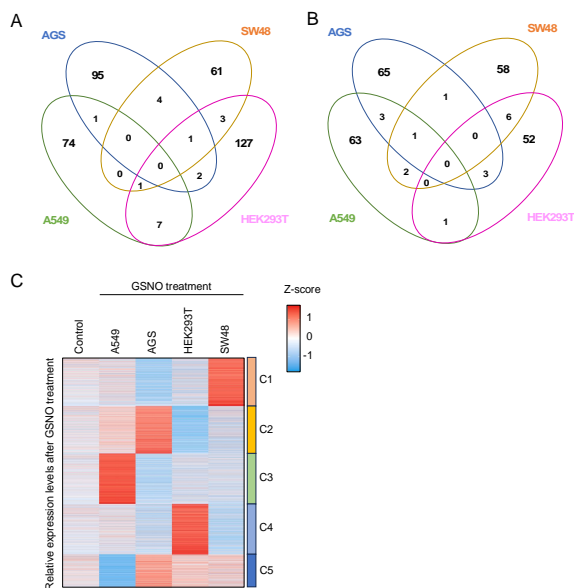


図 3 . NO 処理による遺伝子発現変化の比較
A: 4 つの細胞株で有意にアップレギュレートされた遺伝子間のオーバーラップを示すベン図
B: 4 つの細胞株で有意にダウンレギュレートされた遺伝子間のオーバーラップを示すベン図.
C: 各細胞株における GSNO 処理前後の発現変化の z スコアを示すヒートマップ

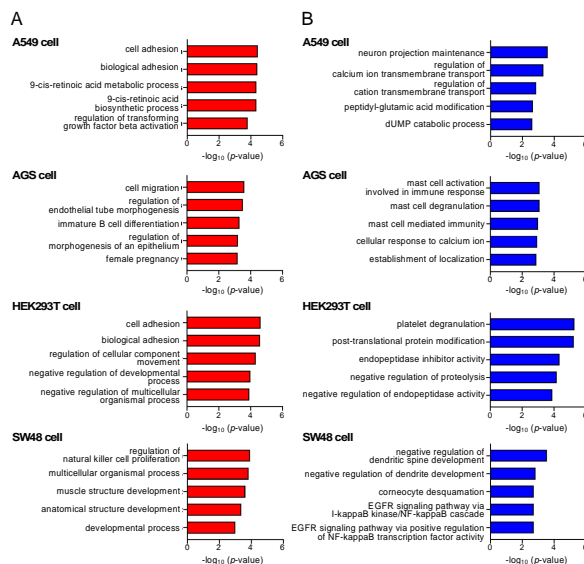


図 4 . NO 曝露細胞株で共通して活性化または抑制されたパスウェイ . 生物学的プロセス (BP) と KEGG パスウェイを用いて解析し、増加した遺伝子 (A) と減少した遺伝子 (B) のジーンオンロジー (GO) 解析 . 上位 5 パスウェイを棒グラフで示した .

発現変動遺伝子の機能的なプロファイリングを行った。1)で同定した発現変動遺伝子をそれぞれの由来組織の機能・がんに関与するかを文献やデータベースによって調査し、発現変動遺伝子と細胞株の由来組織との関連を推定した。

その結果各細胞株の由来組織の機能に関連した発現変動遺伝子はあまり得られず、がんの発症や悪性化に関わることが知られている遺伝子が多く発現上昇している傾向が見られた(図4)。

以上の結果より NO はその組織の機能に関与する変化を引き起こす可能性が低く、特定の遺伝子発現の変化を介したがんの発症や悪性化を促す可能性が示唆された。

(3) 結論

本研究により以下の知見を得た。

NO 感受性の新たな遺伝子群を同定した。

NO は細胞株ごとに異なる遺伝子の発現パターンを変化させる。

NO により発現変動する遺伝子は細胞株間に共通したパスウェイに濃縮されない。

NO により発現変動する遺伝子は、がんの発症や悪性化に関わるものが多い。

以上の結果と本研究室で得られた以前の知見より、体内で産生された NO は DNA 脱メチル化を誘導し、細胞ごとに異なる遺伝子の発現を広範に変化させることで、がんの発症・悪性化を促進する可能性が示唆された。

今後は本研究で得られたがん関連の遺伝子の発現変化と、DNA メチル化をはじめとするエピジェネティック変化の関連を検討し、がん発症・悪性化におけるエピジェネティクスと NO の役割を解明することが課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okuda, K. et al.,	4. 巻 14
2. 論文標題 Pivotal role for S-nitrosylation of DNA methyltransferase 3B in epigenetic regulation of tumorigenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-36232-6	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 該当する

1. 著者名 Mizushima, T. et al.,	4. 巻 49
2. 論文標題 Transcriptional analysis in various cell lines exposed to nitric oxide	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 281-288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.49.281	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤嘉崇
2. 発表標題 DNMT3B 分子特異的 S-ニトロシル化阻害薬の作出
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上原 孝
2. 発表標題 一酸化窒素の新規生体内作用と創薬への展開
3. 学会等名 日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/yakko/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------