

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501263

研究課題名(和文) テストステロン曝露による前立腺エピゲノムの攪乱とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for induction of DNA methylation by testosterone overdose in the rat prostate

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化異常は発がん重要な役割を果たしているが、慢性炎症以外に明確な誘発要因は不明である。本研究では、アンドロゲン過剰状態がDNAメチル化異常を誘発することを実証し、その機構を解明することを目的とした。前立腺がんでは特異的にメチル化されている遺伝子を合計5個同定した。テストステロンを投与したラットの前立腺において、Amn1およびMmp23のメチル化異常の増加を認めた。テストステロン過剰状態により前立腺において慢性炎症に類似した状態が誘導されていることを確認した。DNAメチル化異常の誘発要因として、アンドロゲン過剰状態が関与していることが明らかになり、炎症反応の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aberrant DNA methylation is deeply involved in prostate carcinogenesis. However, inducers of aberrant methylation in the prostate are almost unknown. Here, we investigated whether androgen excess can induce aberrant methylation or not, using a rat prostate cancer model. We first identified two marker genes, methylated in testosterone/DMAB-induced invasive adenocarcinomas, in addition to three genes previously isolated. Next, we analyzed temporal profiles of methylation levels in the dorsolateral lobe of rats, and found that aberrant methylation of two genes (Amn1, Mmp23) was induced during the testosterone treatment. Androgen excess did not induce mRNA expression of DNA methyltransferases in the rat prostate. In contrast, it induced infiltration of lymphocytes and neutrophils in the prostate. These results demonstrated that androgen excess can induce aberrant DNA methylation in the prostate, and suggested that inflammatory response underlies aberrant methylation induction.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：DNAメチル化 エピゲノム 前立腺 アンドロゲン テストステロン

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化をはじめとするエピジェネティック修飾の異常は、ヒト発がんに関与する。最近、神経・精神疾患、免疫疾患、代謝疾患など、遺伝子発現の非可逆的低下を伴う後天的疾患にも関与する可能性が指摘されている。従って、DNA メチル化異常を誘発する要因、および、その分子機構を解明することは、疾患予防のために極めて重要である。

DNA メチル化異常の誘発要因として、加齢に加えて、ピロリ菌感染・肝炎ウイルス感染などの慢性炎症が重要であることが、申請者の所属する研究室等で証明されてきた。しかし、慢性炎症の関与が乏しいとされる前立腺がんや乳がんでも DNA メチル化異常は認められ、その誘発要因に関してはまだ不明の点が多い。また、上皮細胞でのどのような遺伝子(群)の発現・機能異常が DNA メチル化異常を誘発するのかについても不明である。

申請者は、これまでに、化学発がんモデルでは DNA メチル化異常がほとんど認められないこと、一方で、テストステロンと発がん物質 DMAB 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が存在することを見出してきた。そこで、エピジェネティック異常誘発要因としてテストステロンに着目し、テストステロン過剰状態を 50 週間継続したラットの前立腺において、1 遺伝子のプロモーター領域が異常にメチル化されていることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、テストステロン過剰状態が DNA メチル化異常を誘発することを実証し、テストステロン過剰状態により DNA メチル化異常が誘発される機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞、ラットとテストステロン投与 ラット前立腺がん細胞株(PLS10, 20, 30)は名古屋市立大学の高橋智教授より供与を受けた。オス F344 ラットの皮下にテストステロンプロピオネートを充填したシリコンチューブを埋め込むことにより、テストステロンを投与した。6 週齢から投与を開始し、6、26、36、46、56 の各週齢において経時的に前立腺、精巣、血液を採取した。

(2) DNA メチル化解析 重亜硫酸処理を施した DNA を鋳型にして高感度・定量的な real-time MSP 法を用いて定量した。

(3) 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。

(4) ヒストン修飾解析 H3K4me3, H3K27me3 に特異的なモノクローナル抗体を

用いたクロマチン免疫沈降 real-time PCR 法により行った。

4. 研究成果

(1) DNA メチル化異常マーカーの探索

3 種類のラット前立腺がん細胞株(PLS10, PLS20, PLS30)の脱メチル化剤処理により発現が上昇する遺伝子をマイクロアレイで解析し、それらの中から、正常前立腺では非メチル化状態であるが、前立腺がんではメチル化されている遺伝子を合計 5 個(*Aebp1*, *Amn1*, *Mmp23*, *Nkx3.1*, *Tgfbr2*) 同定した。

(2) テストステロン過剰状態における DNA メチル化異常

オス F344 ラットの皮下にテストステロンプロピオネートを充填したシリコンチューブを 6 週齢から 5 週間おきに埋め込むことによりテストステロンを投与、6、11、16、26、36、46、56 の各週齢において前立腺、精巣、血液を採取した(各 N=6)。同定した 5 個のマーカー遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を、高感度・定量的な DNA メチル化解析法(Real-time MSP 法)により、浸潤性のがんの発生母地となる前立腺背側葉において解析した結果、*Amn1* および *Mmp23* で DNA メチル化異常の増加が認められた(最大 0.9% および 2.5%, 図 1)。

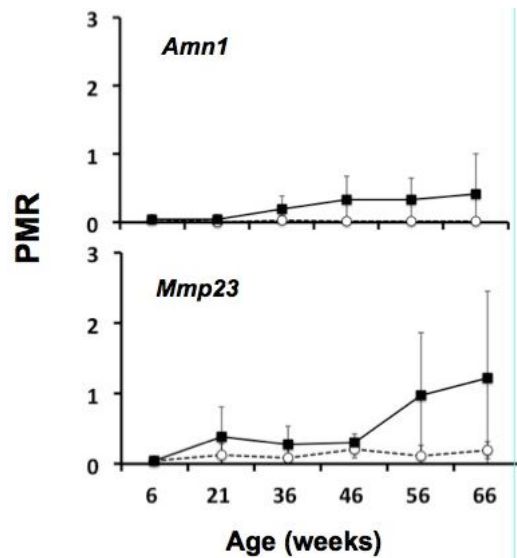


図 1 ラット前立腺におけるテストステロン投与後の DNA メチル化異常誘発 (■:投与, ○:非投与)

(3) 前立腺の病理解析および各種炎症細胞マーカー・各種炎症性サイトカインの発現解析 前立腺の病理解析および各種炎症細胞マーカー・各種炎症性サイトカインの mRNA 発現解析を行った結果、テストステロン投与により経時的にリンパ球、好中球の浸潤が増加し、一部の炎症関連遺伝子 (*Cxcl2*, *Il1b*, *Nos2*, *Tnf*) がメチル化レベルと並行して発現上昇することを明らかにした(図 2)。慢性炎症は重

要なメチル化誘導機構として知られており、テストステロン過剰状態により前立腺において慢性炎症に類似した状態が誘導され、DNAメチル化異常を誘発した可能性が強く示唆された。

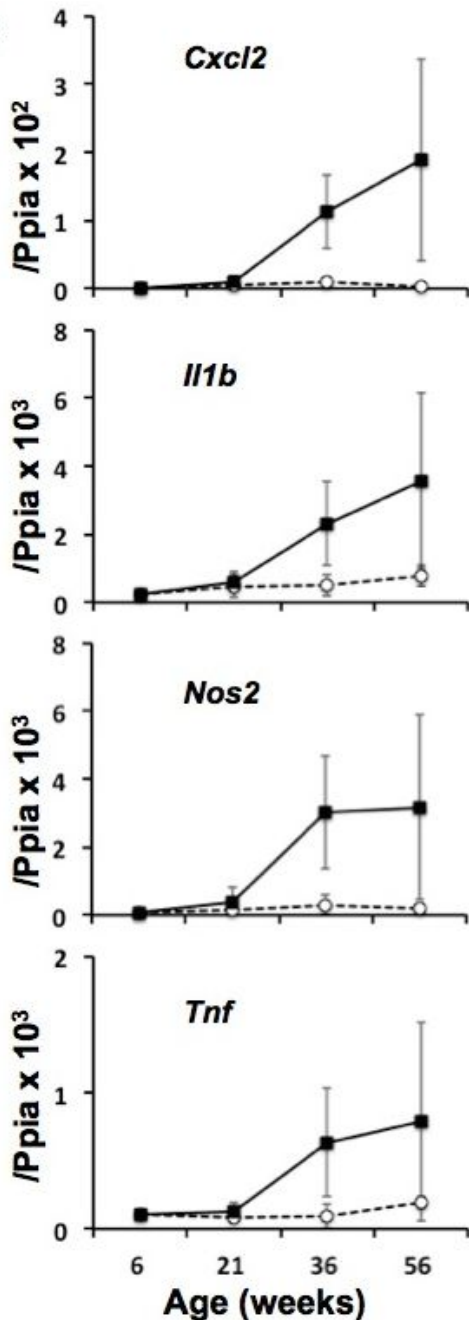


図2 ラット前立腺におけるテストステロン投与による炎症関連遺伝子の mRNA 発現増加 (■:投与, ○:非投与)

(4) テストステロン過剰状態により慢性炎症に類似した状態が誘導される機構の解析

テストステロン過剰により慢性炎症類似の状態になった前立腺においては、バクテリアゲノムの増加は認めず、感染の影響は無いものと考えられた。一方で、細胞増殖の指標である Ki67 index は加齢に応じて低下するが、テストステロン過剰状態だと低下は認めら

れないことを見出した(図3)。過剰な細胞増殖に伴う細胞死が炎症の原因になっていることが示唆された。

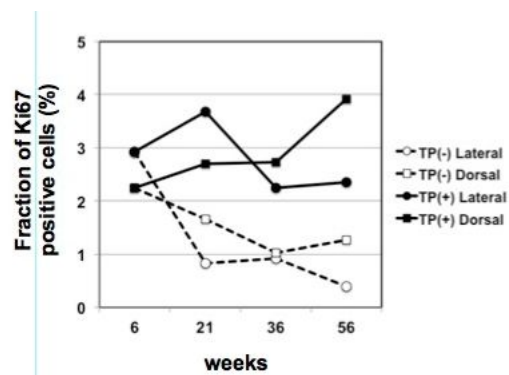


図3 ラット前立腺におけるテストステロン(TP)投与による Ki67 index の変化

(5) まとめと今後の展望

本研究により、DNAメチル化異常の誘発要因として、テストステロンが関与していることが初めて明らかになり、炎症反応の関与が示唆された。今後、テストステロン曝露によるエピゲノムの攪乱の予防という新たなコンセプトに基づくがん予防に発展する可能性がある。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

1. Satoshi Yamashita et al. Androgen excess induces aberrant DNA methylation in the prostate. AACR Annual Meeting 2013 2013年4月6日-10日 Washington, D. C. U.S.A.
2. 山下 聡ら Molecular mechanisms for induction of DNA methylation by testosterone overdose in the rat prostate. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3日 名古屋
3. 山下 聡ら ラット前立腺がんモデルを用いたテストステロンによるDNAメチル化異常誘発とその分子機構の解明第26回発癌病理研究会 2011年8月30日 札幌

〔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・研究
所・ユニット長
研究者番号：80321876

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし