

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 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：23617037

研究課題名(和文)生活習慣・環境因子との相互作用に関与する遺伝子多型と膵癌リスク

研究課題名(英文)Global DNA methylation and genetic factors associated with folate metabolism on carcinogenesis in pancreatic cancer.

研究代表者

大浪 俊平(OHNAMI, SHUMPEI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・支援施設長

研究者番号：60291142

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)：葉酸は体内において葉酸代謝酵素によって代謝されるが、MTRRやMTHFRの代謝能力には遺伝子多型による個人差があるのではないかと考えられている。本研究では膵癌の易罹患性遺伝子として同定したMTRRと葉酸代謝経路で最も特徴づけられているMTHFRの遺伝子多型と癌に特徴的なゲノム全体の低メチル化との関わりを調べた。その結果、MTHFRの変異体では野生型と比較してMTHFR蛋白質及およびゲノム全体のメチル化の減少とホモシステイン値の上昇を示したが、MTRR変異体では明らかな差異は認められなかった。葉酸代謝経路におけるメチル化修飾を介する発癌機構にMTHFR遺伝子多型が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The study aimed to elucidate the relationship between global DNA hypomethylation characteristics of cancer and genetic polymorphisms of MTRR and MTHFR which are most evident in the folate metabolic pathway. To determine the functional activities in genetic polymorphisms associated with an amino acid change, we constructed cDNA with variation of MTHFR and MTRR. Total DNA methylation was determined by measuring the incorporation of methyl groups from 3H-SAM. We found that the exogenous MTHFR protein was produced at lower levels in the MTHFR transfectants harboring Val222 or Ala429 than in the wild-type. In contrast, exogenous MTRR protein showed no obvious differences between the Met22 variants and wild-type. MTHFR transfectants showed markedly decreased Hcy in culture media and a lower level of DNA methylation than did the control. The results indicate that polymorphic genes related to folate metabolism are involved in carcinogenesis through modulation of the methylation status.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：総合栄養学

キーワード：MTRR homocysteine DNA methylation MTHFR

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、罹患率と死亡率が同程度であり難治癌の筆頭である。また近年、その頻度も増加していることから、対策が必要な疾患としての重要性も増している。これまでに、膵癌の発生や進展に關与するいくつかの遺伝子が明らかにされてきたが、生存率の大幅な改善に寄与する有効な診断・治療法の開発にはつながっていない。したがって、膵癌に対する有効な一次予防・二次予防の確立は重要な課題であり、膵癌の発生リスクを説明しうる遺伝素因を同定することは、膵癌高危険度群の捕捉に役立ち、膵癌の罹患率・死亡率の減少に貢献しうると考えられる。我々は、これまでに膵癌の易罹患性を規定する遺伝子としてメチオニン合成酵素還元酵素 (MTRR) を同定した。この MTRR は、膵癌の予防要因として可能性が高いという評価を与えられている葉酸の代謝酵素であり、遺伝子多型の関連解析から裏打ちした最初の例としての意義もあり、膵癌の高危険度群の把握に基づく個別化された予防にもつながる可能性がある。本研究では、MTRR の機能解析に加え、葉酸代謝経路における遺伝子多型の間で最も詳しく特徴づけられている MTHFR の多型遺伝子がコードする蛋白質の機能変化を明らかにする。

2. 研究の目的

葉酸の摂取は、膵癌や食道癌、乳癌などの発生リスクを減少させることが大規模なコホート研究を含め多くの疫学調査で明らかにされている。一方、葉酸欠乏は DNA 鎖切断、DNA 修復活性の低下によるゲノム不安定性や突然変異率の増加および DNA メチル化異常に關与し、癌の発生や進展に深く關っていることも示されている。このことは葉酸の摂取が、こ

れらの障害の程度を修正できる可能性があることを示している。葉酸は体内において、MTHFR や MTRR のような葉酸代謝酵素によって代謝されるが、これらの代謝能力には遺伝子多型による個人差があるのではないかと考えられている。本研究では、MTHFR や MTRR の遺伝子多型による機能変化を *in vitro* 発現系を用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 蛋白質発現プラスミドの作成

MTRR および MTHFR 蛋白質発現ベクターは、pcDNA 3.1D/V5-His vector (Invitrogen) に両遺伝子のコード領域の cDNA を組み込んで作成した。多型による 1 塩基置換は PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara) を用い、サブクローニング後、サンガー法で塩基配列を確認した。これを 293 細胞 (Embryonic Kidney Cells) にトランスフェクションし DNA メチル化レベルを測定した。また培養上清については総ホモシステイン濃度を測定した。293 細胞における CMV プロモータ下での EGFP 遺伝子のトランスフェクション効率は 90% 以上であった。

(2) アイソトープ法による 5-メチルシトシン含量の測定

ゲノム全体の DNA メチル化レベルは、XbaI 酵素で消化した 100ng の DNA を M.SssI methylase (CpG methylase, BioLabs) あるいは dam methylase と S-adenosylmethionine および S-adenosyl-L-[methyl-³H]methionine (Amersham Biosciences) の存在下で 37 4 時間反応後、MicroSpin Columns (GE Healthcare) あるいは Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER) を用いて結合型/遊離型

(B/F) を分離することにより解析した。

(3) siRNA による MTRR の機能阻害およびマイクロアレイ分析

MTRR を発現している 70% コンフルエントの MIAPaCa-2 膵癌細胞株に 20nmol/L の MTRR-siRNA あるいは RNAi Negative Control を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) と共にトランスフェクションし、OPTI-MEM を加えて 37 °C で 5 時間インキュベーション後、抗生物質を含まない DMEM 液で培養した。機能阻害の効果は RT-PCR あるいは real time RT-PCR を用いて確認した。MTRR の機能阻害後の RNA を抽出し、アジレント 2100 バイオアナライザーで確認後、10 µg のビオチン標識 cRNA を遺伝子チップ (Affymetrix: Human Genome U133 Plus 2.0) とハイブリダイズして解析した。

4. 研究成果

(1) MTHFR および MTRR の遺伝子多型による機能変化

MTHFR および MTRR の変異を導入した cDNA を培養細胞中で強制発現させた場合、MTHFR Ala222 あるいは Glu429 野生型よりも Val222 あるいは Ala429 変異体の方で MTHFR 蛋白質の発現量が低下することが示された。一方、MTRR では野生型および変異体で差を認めなかった。

培養上清中のホモシステイン濃度は、MTRR Ile22 野生型に対して Met22 変異体で高い値を示した。また MTHFR では、Ala222-Glu429 野生型に対していずれの変異体も高値を示し、Val222-Ala429 の変異体の組み合わせが最も高い値を示した。ホモシステインに対する効果は、MTRR に比較して MTHFR の方が大きいことが示された (図 1)。さらにゲノム全体のメチル化シトシン含量は、

MTHFR では変異体の組み合わせの方が低下することが示された。

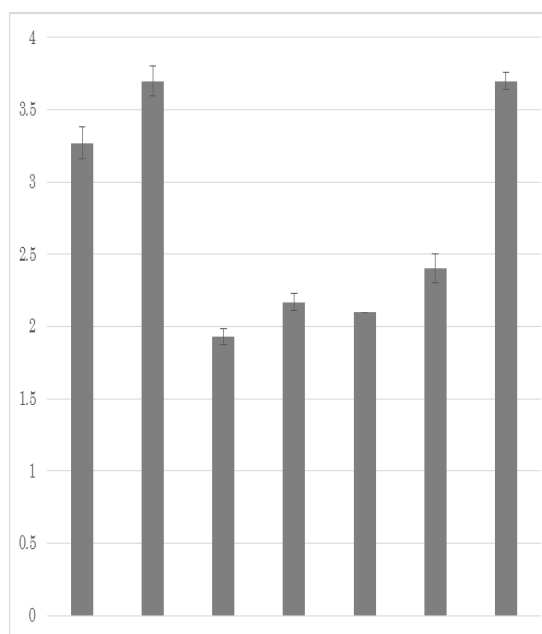


図 1. MTRR および MTHFR 遺伝子多型によるホモシステイン濃度 (nmol/ml)

MTRR Ile22(野生型)、 MTRR Met22
MTHFR Ala222-Glu429(野生型)、 MTHFR
Val222-Glu429、 MTHFR Ala222-Ala429、
MTHFR Val222-Ala429、 LacZ
control

(2) 膵がん細胞株における MTRR の機能解析

MIAPaCa-2 膵癌細胞株の MTRR の機能阻害により、チミジル酸合成酵素 (TYMS) の発現が 4.1 倍に増加していることを見出し、MTRR が TYMS と相互作用していることが示唆された (図 2)。TYMS は、DNA 複製に対する必須のプレカーサーである dUMP から dTMP の変換を触媒する葉酸代謝酵素で、また癌遺伝子としての機能を有する遺伝子でもあり、膵癌の発症に複数の葉酸代謝酵素が関与している可能性が示唆された。また、TYMS 遺伝子以外に MTRR 遺伝子

により発現が制御される分子として DNA 複製および細胞増殖に關与する Minichromosome maintenance (MCM) 遺伝子ファミリーを同定した。

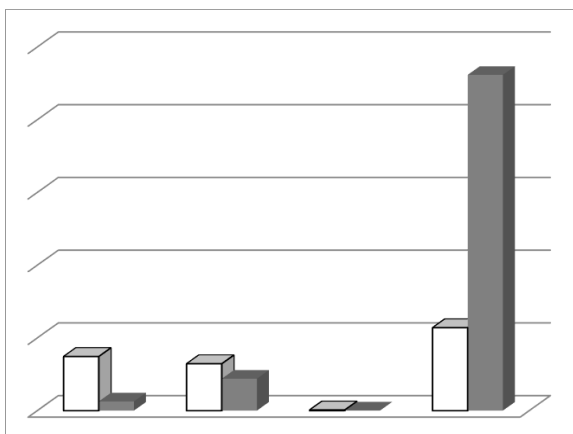


図 2 MTRR 遺伝子が高発現している MIAPaCa-2 膵癌細胞株の siMTRR による機能阻害後の葉酸代謝酵素關連遺伝子のマイクロアレイ分析

MTRR MTR MTHFR TYMS

MTRR の発現量は、siRNA 処理後に-5.9 倍に減少(3721.5 633.9)、TYMS は 4.1 倍に上昇(5699.6 23081.6)

白色バーは siRNA コントロール、黒色バーは siMTRR を示す。

以上の結果より、葉酸代謝酵素遺伝子の中では主として MTHFR 遺伝子多型が蛋白質発現量を変化させ、DNA のメチル化レベルおよびホモシステイン濃度に影響を与えることで癌の易罹患性に関わっていることが示唆された。癌における葉酸代謝酵素の遺伝子多型と DNA メチル化異常との間の關連性についての証拠は不十分であるが、本研究の成果からその全貌を明らかにできる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

大浪俊平、相田紘一郎、葉酸代謝酵素の遺伝子多型とゲノム全体の低メチル化との關連性、DNA 多型、査読無、21、2013
 小野弘恵、佐伯宜久、大浪俊平、坂本裕美、吉田輝彦、遺伝子多型は消化器がんの発症にどのように影響するのか、分子消化器病、査読無、8(3)、40-47、2011

[学会発表] (計 2 件)

大浪俊平、相田紘一郎 葉酸代謝酵素の遺伝子多型とゲノム全体の低メチル化との關連性、第 21 回日本多型学会 京都市 2012 年
 S. Ohnami, K. Narumi, H. Sakamoto, K. Aoki, T. Yoshida, Possible role of genes related to folate metabolism and global DNA methylation in pancreatic carcinogenesis. 第 70 回日本癌学会總會、名古屋市 2011 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大浪俊平 (OHNAMI, SHUMPEI)

独立行政法人国立がん研究センター・

研究所・支援施設長

研究者番号：60291142

