

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650291

研究課題名(和文) エピジェネティクス工学による未来型後天性疾患治療

研究課題名(英文) Acquired Disease Treatment by Epigenetics Engineering

研究代表者

川上 浩良 (KAWAKAMI HIROYOSHI)

首都大学東京・都市環境科学研究科・教授

研究者番号：10221897

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子発現を支配する(1)DNAのメチル化、(2)ヒストンの翻訳後修飾、(3)クロマチン構造の因子を工学的に制御することにより、全く新しい遺伝子発現制御に繋がるエピジェネティクス工学を確立することを目的とした。さらに、エピジェネティクス工学を、後天性疾患の予防と治療に結びつけた新しい薬剤療法を提案、特に抗がん剤で新しい細胞の分化誘導治療の可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

In this research, to establish epigenetics engineering for cellular differentiation, we have designed new biodegradable nanospheres for controlled release. A prepared new carrier was delivered into human leukemia HL-60 cells, resulting in significant differentiation to granulocytic cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：エピジェネティクス、DNAメチル化、ヒストン修飾、クロマチン

1. 研究開始当初の背景

疾患を引き起こす遺伝的異常は、従来ジェノタイプ(遺伝子型)で検討されてきた。しかし、疾患の多くは後天的環境因子の影響を強く受けるため、従来型治療法には限界がある。エピジェネティクスはDNA塩基配列によらずに遺伝子発現を制御でき、その発現プロファイルは一度ゲノム上に書き込まれると安定して細胞分裂後も維持できるという特徴を有している。後天性疾患は、塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子発現制御であるエピジェネティクス異常が

強く関与していると考えられ、エピジェネティクスを人為的に制御できれば新しい治療法となりうる。さらにエピジェネティクスは、胚発生・分化、成体では組織幹細胞や分化の制御にも必須の機構であり、それが生命現象に果たす役割も極めて大きい(*Cell*, **128**, 683-692 (2007)など)。

エピジェネティクスの機構は、(1)DNAのメチル化、(2)ヒストンの翻訳後修飾、(3)クロマチン構造制御により決定される(図1)。エピジェネティクスに異常が起きると様々な疾患が引き起こされる。エピジェネ

テックス異常の代表的なガンは、DNA メチル化異常による遺伝子変異、ガン抑制遺伝子の不活化、細胞周期異常を引き起こすことが知られている (*Nature*, **464**, 1071-1076 (2010) など)。ガン以外の後天性疾患においても、エピジェネティクス異常が、遺伝子の低転写、それに伴う慢性的炎症、非可逆的な遺伝子の低発現を誘発することが示されている (*Nature*, **447**, 433-440 (2007) など)。また、分化した細胞と iPS 細胞、ES 細胞とでは異なる DNA メチル化プロファイルを示すなど、細胞の品質管理からもエピジェネティクスの重要性が指摘されている。

2. 研究の目的

後天性疾患は、塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子発現制御であるエピジェネティクス異常が強く関与していると考えられ、エピジェネティクスを人為的に制御できれば斬新な治療法を創製できる。本研究では、エピジェネティクス因子の(1)DNA のメチル化、(2)ヒストンの翻訳後修飾、(3)クロマチ構造、を工学的に制御することにより、全く新しい遺伝子発現制御に繋がるエピジェネティクス工学を確立することを目的とした(図1)。さらに、エピジェネティクス工学を、後天性疾患の予防と治療に結びつけた新しい薬剤療法を提案した。具体的には、塩基配列を伴わずにエピジェネティクス機序だけで、遺伝情報(転写⇄翻訳⇄発現)を『書き込む』、あるいは『消去』することができる未来型創薬設計を行った。

3. 研究の方法

本研究では、先述したエピジェネティクス工学を確立するため以下に示す研究を計画し実施する。なお、動物実験の一部は東京都健康長寿医療センターの施設を借用し行う。

① in vitro 転写・翻訳系における遺伝子のON制御

② in vitro 転写・翻訳系における遺伝子のOFF制御

①、②において、先ず細胞実験系でエピジェネティクス工学を実証する。

③ エピジェネティクス制御キャリア合成

④ 心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損モデルマウス(高DNAメチル化モデル)の in vivo 評価

③、④において、動物実験系でエピジェネティクス工学の可能性を検証する。

具他的には、ポリ乳酸(PLA)・カチオン性脂質・DNA・阻害剤を用いた新規ダブルターゲティングキャリア(以下キャリアと称する、図2)を調製し、粒径や、キャリア内にDNAや阻害剤が封入されているかを評価した。次に、キャリアはHL60細胞に導入し、細胞

生存率評価及び分化率評価を行なった。さらに、ヒストンアセチル化量の変化は、ウエスタンブロット法により評価した。

4. 研究成果

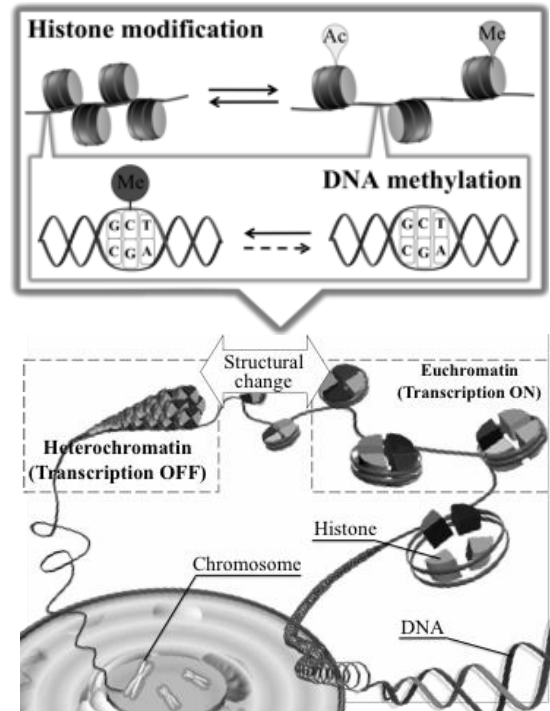


図1 エピジェネティクスの概念

キャリアの粒径は動的光散乱光度により測定し、 679 ± 51 nm となった。図3には、キャリアを添加したヒト肝癌由来細胞(HepG2)を用いてルシフェラーゼアッセイを行なった結果を示す。キャリアを導入したHepG2細胞では、ルシフェラーゼをコードしたプラスミドDNAであるpGL3の発現が確認された。すなわち、キャリア内にDNAが封入されていることが明らかとなった。

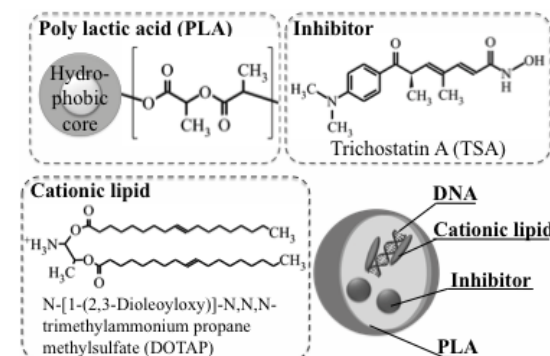


図2 新規キャリア

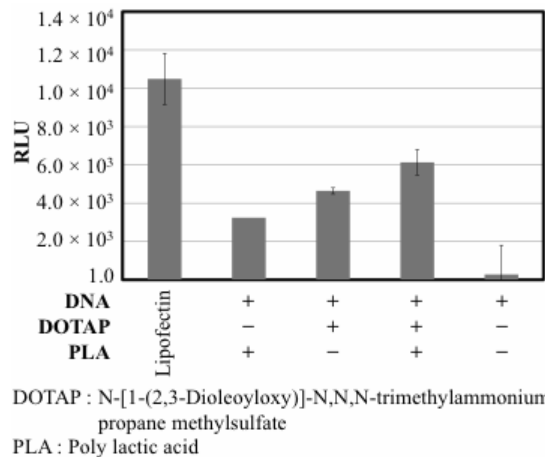
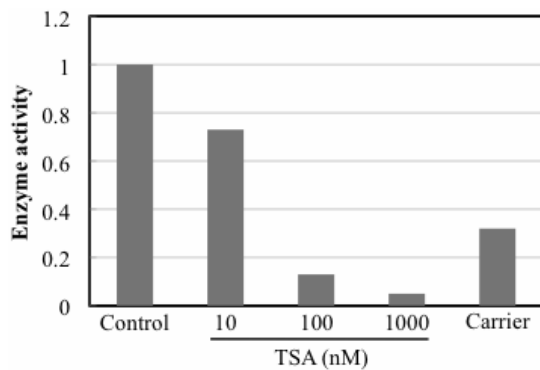


図3 pGL3 発現量

図4には、キャリア内に封入された阻害剤の量をセルフリーの環境において酵素を用いて測定した結果を示す。キャリアは、未添加系と比較して、酵素活性の低下を示した。以上の結果から、PLA/カチオン性脂質/DNA/阻害剤複合体の形成が示された。



TSA : Trichostatin A

図4 酵素活性

図5には、キャリアを導入した HL60 細胞におけるヒストンアセチル化量の測定結果を示す。キャリアを導入した HL60 細胞では、DNA 及び阻害剤を単独で添加した細胞と比較してヒストンアセチル化量が上昇していた。このことから、キャリアが細胞内に効率的に導入され、強力にヒストンアセチル化を誘導していることが示唆された。

図6には、キャリアを導入した HL60 細胞の顆粒球への分化率を示す。キャリアを導入した細胞は、DNA もしくは阻害剤のみを添加した場合よりも分化率が高かった。CAF(ヒストンアセチル化酵素)は、HDAC3 (ヒストン脱アセチル化酵素)と拮抗することでアセチル化の恒常性を維持している。CAF のみを添加した細胞では HDAC3 が強く作用し、アセチル化量の増加は、未添加系と比較して 1.25 倍に抑制され、分化誘導が起きなかった。一方、

阻害剤 TSAはHDAC3を含む種々のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)を阻害することで、相対的に内在性ヒストンアセチル化酵素の機能が高まり、アセチル化量が 1.40 倍となった。さらに、キャリアは TSA により HDAC を阻害することで、CAF の活性を維持することができた。その結果、未添加系に対して 1.65 倍のアセチル化量の増加を導き、阻害剤もしくは DNA 単独で添加した場合よりも高い分化率を示したと考えられる。

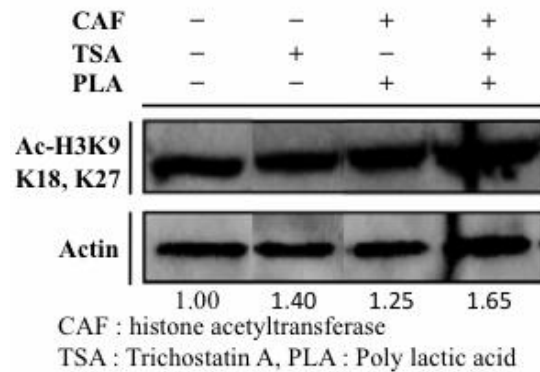


図5 HL60 細胞におけるヒストンアセチル化量

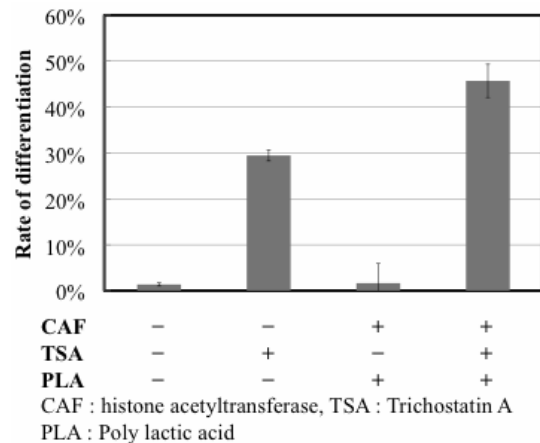


図6 HL60 細胞の顆粒球への分化率

ダブルターゲットキャリアは、ヒストン修飾の制御を行なう上で、阻害剤もしくはプラスミド DNA 単独で添加した場合よりも高効率かつ持続的に制御できることが示された。さらにキャリアを導入した HL60 細胞は、高効率に顆粒球へ分化した。このことからエピジェネティクスを工学的に制御することが、細胞分化治療に繋がる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計2件）

- (1) 碓健一, 浅羽祐太郎, 野口太甫, 朝山章一郎, 川上浩良, 新規ヒストンアセチル化酵素阻害剤の合成とエピジェネティクス制御, 第61回高分子学会年次大会, 2012年5月31日, パシフィコ横浜 (依頼講演).
- (2) 川上浩良, 新しい遺伝子操作を目指したエピジェネティクス工学, 国際バイオテクノロジー展, 2012年4月27日, 東京ビックサイト (依頼講演).
- (3) 碓健一, 浅羽祐太郎, 朝山章一郎, 川上浩良, 新しい遺伝子治療を目指したエピジェネティクス工学の確立, 第33回日本バイオマテリアル学会大会, 2011年11月22日, 京都テルサ。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 浩良 (KAWAKAMI HIROYOSHI)
首都大学東京・都市環境科学研究科・教授
研究者番号: 10221897

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし