

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791804

研究課題名(和文) 卵巣癌発症における MAT2A の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of MAT2A in ovarian cancer development

研究代表者

大槻 健郎 (OTSUKI, Takeo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：40531330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌では、ゲノムワイドなエピジェネティックな修飾の異常が関与している。本研究では、メチル基供与体を産生する MAT2A 遺伝子に着目して、卵巣癌におけるエピゲノム変異の原因究明および標的分子の同定を目的とした。解析した結果、MAT2A 遺伝子の過剰発現により標的遺伝子の癌抑制遺伝子 RB1 のプロモーター領域がメチル化され、遺伝子発現が抑制され、癌化を誘導する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide epigenetic changes are involved in human ovarian cancer. In this study, we found that MAT2A (methionine adenosyltransferase 2A), which produces a methyl donor for transmethylation and plays an important role in DNA and histone methylation, is highly expressed and its gene body region is hypomethylation in human ovarian cancer cells. MAT2A siRNA and its inhibitor (cycloicidine) suppress ovarian cancer cell growth. We found that tumor suppressor gene RB1 is a molecular target of MAT2A for human ovarian cancer. Our data suggest that RB1 is the new tumor maker of human ovarian cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：エピジェネティクス 卵巣がん MAT2A

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌では、遺伝子変異のみならず、ゲノムワイドな DNA メチル化、ヒストンテールのメチル化やアセチル化などのエピジェネティックな修飾の異常が関与している。最近、DNA やヒストンテールをメチル化する酵素反応にメチル基供与体 (SAM) を産生する MAT2A (methionine adenosyltransferase 2A) 遺伝子が必須であることが報告された (Chi P. Nat Rev Cancer. 2010)。DNA メチル化異常やヒストンテールのメチル化異常により、癌抑制遺伝子の遺伝子機能が低下し、遺伝子変異を伴わず、癌化に繋がる可能性が考えられる。しかしながら、これらのメチル化の異常がどのような機序によって起こるのか、その分子機構について未だ明らかではない。また、エピゲノム変異の制御因子の解明は、基礎的研究にとどまらず、がんの予防、早期診断、あるいは新たな癌治療薬の開発にも繋がる事が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、癌化に伴い、ダイナミックに変化するエピジェネティクスに関連しメチル基供与体を産生する MAT2A 遺伝子に着目して、卵巣癌におけるエピゲノム変異の原因究明および標的分子の同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) **卵巣癌細胞株**：卵巣癌細胞株 11 株 (PA1, SKOV など) および卵巣表層上皮細胞株 2 株 (OS1, OS2) を用いた。

(2) **卵巣癌患者の登録**：東北大学医学部産婦人科および関連病院において手術を施行した卵巣癌患者 (症例数 46 例) を年齢、組織型、進行期別に分類した。

(3) **発現解析**：培養細胞および臨床検体から RNA を抽出、逆転写し cDNA を合成した後、SYBR Green I による real time PCR により MAT2A 遺伝子の発現を定量解析をした。

(4) **エピゲノム解析**：卵巣癌培養細胞および癌臨床検体から DNA を抽出し、Bisulfite 処理し、MAT2A 遺伝子のプロモーターおよび

Gene body 領域について PCR により増幅後、クローニングし、10 個以上のクローンのシーケンスを行った。PCR 増幅領域内の全てのメチル化部位について解析した。

(5) **siRNA 発現ベクターの作製および導入細胞の樹立**：MAT2A 遺伝子のノックダウン用 siRNA を複数設計し、siRNA 発現ベクターを構築後、卵巣癌細胞株 SKOV および PA1 にトランスフェクションした。ノックダウン効率は、real time PCR および Western blotting によって測定した。複数設計した siRNA のうち、正常卵巣表層上皮細胞株と同レベルまでに MAT2A 遺伝子の発現を抑制した細胞株を以降の解析に用いた。樹立した細胞株を用いて、増殖能および遊走能・浸潤能について解析した。また、MAT2A の阻害剤であるシクロロイシン添加の影響についても検討した。

4. 研究成果

(1) 卵巣癌における MAT2A 遺伝子の発現量解析

卵巣癌細胞株 11 株および卵巣表層上皮細胞株 2 株を用いて、MAT2A 遺伝子の発現量解析を行った。その結果、MAT2A 遺伝子の発現は卵巣癌細胞株では卵巣表層上皮細胞株に比べ有意に高発現していた ($p < 0.025$) (図 1)。

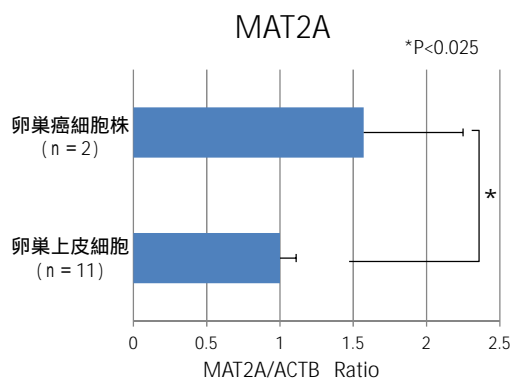


図 1 卵巣癌における MAT2A 発現量解析

(2) MAT2A のエピゲノム解析

卵巣癌細胞株 11 株、卵巣表層上皮細胞株 2 株、卵巣癌組織 46 例および正常卵巣組織 20 例を用いて、MAT2A 遺伝子のプロモーターおよび Gene Body 領域について DNA メチル化解析を行った。その結果、プロモーター領域で

はいずれもメチル化が見られなかった。培養細胞における Gene Body 領域では MAT2A の発現量の増加に伴いメチル化が低下し、負の相関が見られた ($R=-0.882$)。卵巣癌組織の Gene Body 領域のメチル化は、正常卵巣組織に比べ有意に低かった ($p < 0.01$) (図2)。

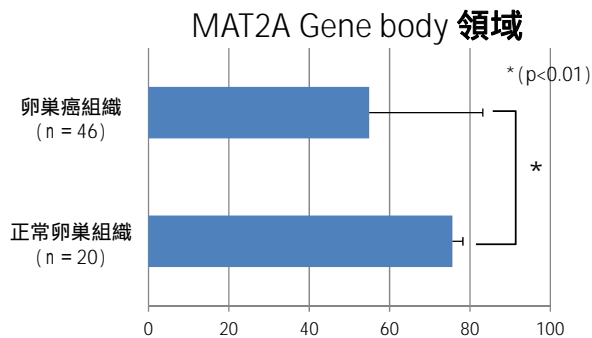
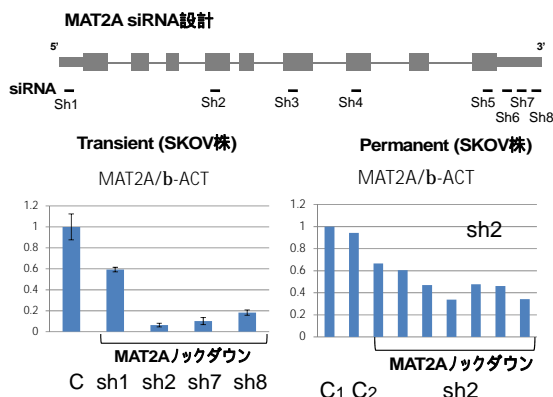


図2 MAT2Aのエピゲノム解析

(3) siRNA による MAT2A 遺伝子のノックダウン実験

siRNA 発現ベクターを用いて MAT2A ノックダウン細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用いて、MAT2A の発現量の変化が癌細胞の増殖能および遊走能・浸潤能に与える影響について in vitro で解析した。その結果、MAT2A の発現量の減少に伴い、細胞増殖が有意に抑制されることを見出した。さらに、MAT2A 阻害剤であるシクロロイシンを添加して卵巣癌細胞株を培養したところ、濃度依存的に細胞増殖が抑制された。これらの結果から、MAT2A 遺伝子の過剰発現が卵巣癌細胞の増殖を促進すること、またシクロロイシンが卵巣癌の治療薬として使用できる可能性が示唆された (図3)。



MAT2A siRNA を 8 ヶ所検討し、ノックダウン効率を検討した

一過性発現抑制 sh2 永続性発現抑制

Western blots



MAT2A 発現解析、sh2 が最も効果的であった

図3 MAT2A ノックダウン細胞を用いた解析

(4) MAT2A の標的遺伝子 RB1 の発現量解析とエピゲノム解析

卵巣癌における MAT2A 遺伝子の標的遺伝子を同定するために、real time PCR 法により、数十種類の癌遺伝子および癌抑制遺伝子の定量的な発現量解析を行った。その結果、卵巣癌において癌抑制遺伝子 RB1 が有意に抑制されていることが明らかになった。さらに、RB1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を解析したところ、高メチル化状態であった。

次に、46 例の卵巣癌組織を用いて MAT2A および標的遺伝子 RB1 の発現を解析した。その結果、卵巣癌組織のほぼ全例で MAT2A 遺伝子の発現量増加が見られ、組織分類では、漿液性卵巣癌で最も発現量が亢進していた。また、卵巣癌の進行に伴って、MAT2A 遺伝子の発現量が有意に増加していることが明らかとなった。一方、RB1 遺伝子の発現はほとんどの卵巣癌で減少しており、一部の卵巣癌組織では DNA のメチル化異常、遺伝子欠損および遺伝子変異が見られた。また、正常卵巣組織では MAT2A 遺伝子および RB1 遺伝子の発現変動は観察されなかった。

以上の結果より、MAT2A 遺伝子の過剰発現により癌抑制遺伝子 RB1 のプロモーターがメチル化され、その結果、遺伝子発現が抑制され、癌化を誘導する可能性が示唆された。また、MAT2A 遺伝子の発現量が卵巣癌の悪性度を評価・分類するための新規腫瘍マーカーと

して有用である。さらに動物を用いた解析も必要と考える。患者基本情報に照らし合わせ、年齢、組織型、進行期、生命予後などについて、統計学的な評価検定を行う必要がある。また、MAT2A の阻害剤が卵巣癌治療へと応用できる可能性を示唆するものとなる。よって本研究は今後、卵巣癌の予防・診断・治療へと展開することが期待される。

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 2 件)

Shoji T, Takatori E, Kaido Y, Omi H, Yokoyama Y, Mizunuma H, Kaiho M, Otsuki T, Takano T, Yaegashi N, Nishiyama H, Fujimori K, Sugiyama T. A phase I study of irinotecan and pegylated liposomal doxorubicin in recurrent ovarian cancer. (Tohoku Gynecologic Cancer Unit 104 study). **Cancer Chemother Pharmacol.** 2014 (査読有) 73(5):895-901. doi: 10.1007/s00280-014-2418-8.

Tokunaga H, Nagase S, Yoshinaga K, Tanaka S, Nagai T, Kurosawa H, Kaiho-Sakuma M, Toyoshima M, Otsuki T, Utsunomiya H, Takano T, Niikura H, Ito K, Yaegashi N. Small cell carcinoma of the uterine cervix: clinical outcome of concurrent chemoradiotherapy with a multidrug regimen. **Tohoku J Exp Med.** (査読有) 229(1):75-81. 2013. PMID : 23269283

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大槻 健郎 (OTSUKI , TAKEO)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師
研究者番号 : 40531330