

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300336

研究課題名(和文) エピジェネティック異常の超高精度蛍光イメージングによるがん悪性度診断法開発

研究課題名(英文) Development of a diagnostic method for epigenetic posttranslational modifications of histone using fluorescence imaging

研究代表者

権田 幸祐 (Gonda, Kohsuke)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80375435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNAやヒストンのエピジェネティック異常の蓄積は、がん抑制遺伝子の転写抑制を引き起こし、発がんを促す。これまで、エピジェネティック異常の検出法は、細胞の形態情報を失っており、細胞個々の情報が平均化されていた。本研究ではヒストンH3の9番目のリジン(H3K9)の修飾に注目し、蛍光1粒子イメージングによる独自病理染色法を開発した。その結果、従来のDAB染色に比べ幅広いレンジでヒストンの修飾レベルを測定することができた。また本方法によって、細胞個々のヒストンの修飾レベルを高精度に測定することが可能となり、がん細胞間のエピジェネティック異常の不均一性を評価することに寄与できた。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic post translational mutations plays an important role of tumorigenesis. To estimate the degree of modification level of histone methylation mutation, immunohistochemistry (IHC) using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (IHC-DAB) has been used. However, because the quantitative sensitivity of IHC-DAB is low, an improvement of IHC is desired. In this study, to develop a diagnostic method of histone methylation in breast cancer tissues with fluorescent signals, we developed IHC method using fluorescent nano-particle quantum dots (QDs). By immunostaining cultured breast cancer cells with QDs, we succeeded in detecting a statistically significant difference in the histone methylation between cancer cell lines. Moreover, the IHC-QDs results in cancer tissues demonstrated that the QDs were able to widely-detect histone modifications at low and high level. This novel IHC method may be expected to contribute to the diagnosis of various epigenetic post translational mutations in cancer.

研究分野：医工学

キーワード：ナノバイオ バイオテクノロジー がん エピゲノム イメージング 蛍光 免疫染色

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化修飾やヒストンのアセチル化・メチル化修飾などエピジェネティクスでは、修飾異常の蓄積が、がん発生を促すと考えられている。特に最近では特定のがん抑制遺伝子やヒストン修飾酵素に着目した解析が進み、エピジェネティック異常の仕組みの一端が明らかにされつつある。またエピジェネティック異常は、遺伝子塩基配列の突然変異とは異なり、異常の除去が可能であるため、今までにない新しいがん治療法として期待されている[1-11] (図1)。

効果的ながん治療を行うには、的確ながん診断は必須である。これまでのエピジェネティック異常の診断は、シーケンシング、質量分析、高感度発色の抗原抗体反応(ウェルプレート)、などの方法開発が主流であった。これらの方法は感度や定量性に優れているものの、がん組織を破碎した抽出液を用いるため、がん細胞の形態情報が失われている。またがん細胞個々の情報が平均化されてしまうため、高悪性度のがん細胞が存在してもその割合が少ない場合、見逃してしまう危険性があった。多くのがんの確定診断に細胞レベルの情報は必須であり、形態を含む細胞個々のがん診断法として、免疫組織化学法が臨床で利用される。しかし免疫組織化学法の発色に関して、酵素反応を利用した色素法(DAB等)では反応条件(基質量、温度、時間)に左右され定量性が低く、蛍光法では褪色や組織自家蛍光による S/N 比の悪化が問題となっていた (図2)。

2. 研究の目的

本研究計画では独自画像解析技術による新規の免疫組織化学法を応用し、ヒトがん組織のエピジェネティック異常の診断システムを開発する。この新システムを用い、ヒト乳がん組織のエピジェネティック異常が、がん悪性度とどのような相関性を持つのか臨床標本を利用し検討する。

3. 研究の方法

エピジェネティック異常を診断するために、ヒストンH3の9番目のリジン(H3K9)に注目して解析する。H3K9のメチル化はDNAメチル化と協調して強固な遺伝子不活性化機構として働く(PNAS 2004)。また正常細胞ではH3K9は無修飾もしくはアセチル化されているが、がん化に従いアセチル化→モノメチル化→ジメチル化→トリメチル化に移行する(図1)。本計画では、以下のテーマで研究を進める。

(1) 蛍光1粒子イメージングによるエピジェネティック異常の組織診断法開発:

H3K9のヒストン修飾を認識する抗体を用いた免疫染色で、超高精度に修飾量を蛍光粒子イメージングする。

(2) ヒト乳がん組織のエピジェネティック異常の病理診断:

ヒト乳がん組織のエピジェネティック異常が、がん悪性度とどのような相関性を持つのか臨床標本を利用し検討する。

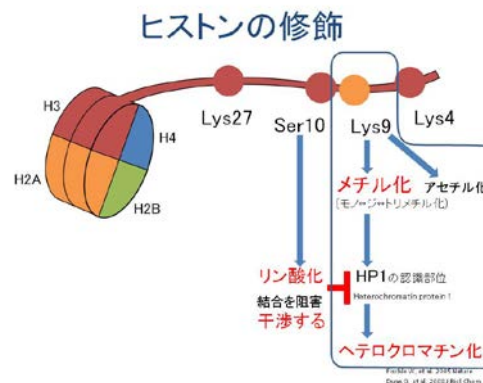


図1 ヒストン修飾の概要

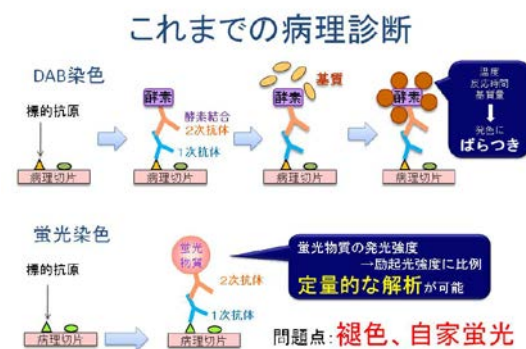


図2 DAB染色と蛍光染色の特徴

4. 研究成果

24年度は、ヒストン修飾の免疫蛍光染色法の確立のために、ヒト培養細胞を使った実験を行った。様々なメーカーからヒストンH3のアセチル化やメチル化を認識する抗体を複数種類購入し、ヒト乳がん培養細胞MCF-7を使って、Cy3や蛍光粒子を標識剤とした染色法の確立を試みた。染色条件の検討では、界面活性剤の種類や濃度を色々と試すとともに、タンパク質分解酵素を染色プロセスに応用した。その結果、A社の抗ヒストンH3アセチル化抗体やC社の抗ヒストンH3メチル化抗体で、MCF-7のヒストン修飾を特異的に染色することに成功した。またヒト乳がん培養細胞株MCF-7の細胞抽出液中のヒストン修飾量を、それぞれの抗体を用いてウェスタンブロットで検出することにも成功した。

25年度は、24年度に検討したヒストン修飾の蛍光免疫染色法をさらに改良した。実際には、24年度の反応条件を基盤として、さらに界面活性剤の種類や濃度を検討し、いくつかのタンパク質分解酵素を応用することで、Cy3や蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色法の特異性を向上させた。ヒト乳がん由来の低転移性や高転移性の培養細胞株を複数種類用い、

これらの培養細胞株の免疫染色を 25 年度に改良した方法で行った。その結果、細胞株間のヒストン修飾レベルの違いを高精度解析することに成功した。

26 年度は 25 年度に確立した方法を応用して、ヒト乳がん組織(30 症例)の蛍光免疫染色を行った。その結果、従来の蛍光染色に比べ幅広いレンジでヒストンの修飾レベルを測定することができた。本方法によって、ヒストンの修飾レベルを高精度に測定することが可能となり、がん細胞同士のエピジェネティック異常の不均一性を評価することにも寄与できたと考えられる。

<引用文献>

① Parrella P. Epigenetic Signatures in Breast Cancer: Clinical Perspective. *Breast Care (Basel)*, 5 巻, 2010, 66-73

② Brower V. Epigenetics: Unravelling the cancer code. *Nature*, 471 巻, 2011, S12-3

③ Munster PN, Thurn KT, Thomas S. A phase II study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat combined with tamoxifen for the treatment of patients with hormone therapy-resistant breast cancer. *Br J Cancer*, 104 巻, 2011, 1828-35

④ Choe M K, Hong C P, Park J, et al: Functional elements demarcated by histone modifications in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 418 巻, 2012, 475-82

⑤ Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res*, 69 巻, 2009, 3802-3809

⑥ Baylin SB, Ohm JE: Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, 6 巻, 2006, 107-16

⑦ Fischle W, Tseng BS, Dormann HL. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, 438 巻, 2005, 1116-22

⑧ Duan Q, Chen H, Costa M, et al. Phosphorylation of H3S10 blocks the access of H3K9 by specific antibodies and histone methyltransferase. Implication in regulating chromatin dynamics and epigenetic inheritance during mitosis. *J Biol Chem*, 283 巻, 2008, 33585-90

⑨ Jeong YS, Cho S, Park JS. Phosphorylation of serine-10 of histone H3 shields modified

lysine-9 selectively during mitosis. *Genes Cells*, 15 巻, 2010, 181-192.

⑩ Seligson DB, Horvath S, Shi T, et al: Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence, *Nature*, 435 巻, 2005, 1262-6

⑪ Barlési F, Giaccone G, Gallegos-Ruiz MI, et al: Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 25 巻, 2007, 4358-64

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① Nemoto N, Shibahara Y, Tada H, Uchida K, McNamara KM, Chan MS, Watanabe M, Tamaki K, Miyashita M, Miki Y, Gonda K, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H., Clinical significance of subtype classification in metastatic lymph nodes of breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *International Journal of Biological Markers*, 査読有, 印刷中.

② Suzuki Y, Roy C, Promjunyakul W, Hatakeyama H, Gonda K, Imamura J, Pillai B, Ohuchi N, Kanzaki M, Higuchi H, Kaku M., Single quantum dot tracking reveals that an individual multivalent HIV-1 Tat-protein transduction domain can activate machinery for lateral transport and endocytosis. *Molecular and Cellular Biology*, 査読有, 33 巻, 2013, 3036-3049
DOI: 10.1128/MCB.01717-12

③ 多田寛, 権田幸祐, 大内憲明, がんの in vivo 1 分子イメージング、ここまで進んだバイオセンシング・イメージング Part II 研究最前線 18 章 (化学同人)、査読無、2012, 166-171

④ Gonda K, Miyashita M, Watanabe M, Takahashi Y, Goda H, Okada H, Nakano Y, Tada H, Amari M, Ohuchi N., Development of a quantitative diagnostic method of estrogen receptor expression levels by immunohistochemistry using organic fluorescent material-assembled nanoparticles., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 426 巻, 2012, 409-414
DOI : 10.1016/j.bbrc.2012.08.105.

[学会発表] (計 1 件)

① Satoh K, Gonda K, Tada H, Takahashi Y, Watanabe M, Amari M, Ishida T, Ohuchi N. Quantitative diagnosis of the histone modification levels in breast cancer tissue using quantum dots. 6th International Symposium on Nanomedicine. November 29-December 1, 2012, くにびきメッセ (島根県・松江市).

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.tohoku.ac.jp/org/contribute/107/index.html>

<http://www.med.tohoku.ac.jp/org/health/159/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

権田 幸祐 (GONDA Kohsuke)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80375435

(2) 研究分担者

大内 憲明 (OHUCHI Noriaki)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90203710

多田 寛 (TADA Hiroshi)
東北大学病院・講師
研究者番号：50436127

(3) 連携研究者

渡辺 みか (WATANABE Mika)
東北大学病院・准教授
研究者番号：20292344