

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570166

研究課題名(和文)ジアシルグリセロールキナーゼ を介するがん抑制機構の解明

研究課題名(英文) Study on the epigenetic silencing of diacylglycerol kinase gamma in colorectal cancer

研究代表者

甲斐 正広 (Kai, Masahiro)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80260777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんにおいてジアシルグリセロールキナーゼ (DGKG) がエピジェネティックに発現抑制されている事実を明らかにした。すなわち、DGKGのプロモーター領域が高度にメチル化されていること、およびDGKGのmRNA発現量も極めて低レベルであることを、大腸がん細胞株と正常大腸細胞、あるいは大腸がん検体のがん部と背景粘膜部位との比較により明らかにした。DGKGを発現していない大腸がん細胞株HCT116にDGK (野生型)を過剰発現させてフェノタイプの変化を観察したところ、増殖速度に影響は見られなかったが、浸潤能や遊走性が有意に減少した。DGKの発現抑制と大腸がんの悪性化との間の関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In attempt to search the genes repressed in colorectal cancer-derived cell lines, we found that DGKG expression is strongly suppressed in the cancer cells from both of cell lines and primary tumors. Because DGKG contains a CpG island in the region around its transcription start site, we carried out bisulfite pyrosequencing analysis, resulting that DGKG is strongly methylated in colorectal cancer cells. These findings confirmed the presence of high levels of methylation in most of the cells in which DGKG expression was silenced. The overexpression of DGKG in a DGKG-silenced colorectal cancer cell line, HCT116 decreased the migration and invasion activities of the cells significantly. In addition, DGKG activity modified the activation levels of Rac1 and Rho small GTPase proteins. These results suggested that DGKG regulated cell migration via Rho-family small GTPases. The epigenetic silencing of DGKG may correlate with the cancer malignancy in colorectal cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：大腸がん エピジェネティクス ジアシルグリセロールキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は、細胞内でジアシルグリセロール(DG)をリン酸化してホスファチジン酸(PA)を産生する脂質代謝酵素である。少なくとも10のアイソフォームからなるDGKスーパーファミリーを形成しており、各アイソフォームがそれぞれ異なる生理機能を持っていると考えられている。DGやPAが細胞内シグナル伝達物質であることが明らかにされた1980年代以降、プロテインキナーゼCなどと同様にDGKの機能に多くの興味が集まっていたが、なかなか機能解明までは至らなかった。近年、ようやくその生理機能が明らかになり始めた。筆者自身、メラノーマにおけるNFκB活性化にDGKαアイソフォームが関与していることを明らかにした(Kai M et al 2009 FEBS Lett, Yanagisawa K et al 2007 Biochim Biophys Acta)。DGKγ(DGKG)の生理機能についても多くの知見が明らかにされている。筆者の前所属研究室でも、cDNAクローニング(Kai M et al 1994 J Biol Chem)や、HL60細胞の分化制御(Yamada K et al 2003 Biochem Biophys Res Commun)、Rac1特異的GTPase-activating proteinであるβ2カドヘリンを介したアクチン再構成系の制御(Yasuda S et al 2008 Biochem J, Kai M et al 2007 Biochim Biophys Acta, Tsushima S et al 2004 J Biol Chem)などの事実を報告してきた。しかし他のDGKアイソフォームと同様、不明な点はまだ多い。

現所属研究室では、がん組織におけるエピジェネティック異常をゲノムワイドに解析しているが、そのプロジェクトの中で一つの興味深い知見、すなわちDGKGが大腸がん・胃がんで高度にメチル化され、発現が抑制されている可能性が示唆された。そこでDGKGと大腸がんの関連を詳細に検証することを目的として本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、大腸がんにおけるDGKG遺伝子のエピジェネティック発現抑制を詳細に検討し、これを足がかりにして大腸組織におけるDGKGの生理機能を明らかにすることを目的として行う。具体的には、正常大腸組織、大腸がん細胞株、様々なステージにあるがん検体などを用い、どのサンプルでどの程度までDGKGがエピジェネティックに発現抑制されているのか、その詳細なプロファイルを作成する。一方で、がん細胞株を用いてDGKGの過剰発現やノックダウンが細胞に与える影響を検討する。最後にこれらの結果を総括し、大腸がんにおけるDGKG発現抑制とがん化との関連について考察する。

3. 研究の方法

[概要]

大腸がん細胞におけるDGKGのDNAメチル化および発現抑制について詳細に解析する。次に発現が抑制されている細胞株にアデノウイルスを用いてDGKGを発現させて細胞増殖、細胞形態、細胞移動、細胞浸潤など、主にアクチン再構成系に関連する細胞機能についてフェノタイプの変化を観察する。またマイクロアレイ解析法により、DGKG発現抑制が影響を与える遺伝子群を調べる。

[DGKGのDNAメチル化解析]

様々な大腸がん細胞株・大腸がん検体からDNA、RNAを抽出し：

- ・RNAを用いてRT-PCRを行う DGKG発現レベルの解析(大腸がん細胞株を用いて、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤により発現が回復するかどうかを確認する)

- ・DNAを用いてMethylated-specific PCRおよびBisulfite処理DNAのパイロシーケンシングを行う DNAメチル化レベルの定量

[DGKG発現による細胞のフェノタイプ変化解析]

DGKGがエピジェネティックに発現抑制されている大腸がん細胞株に、アデノウイルスを用いてDGKG発現ベクターを導入し、どのようなフェノタイプ変化が起こるか観察する。発現ベクターは野生型DGKG、および変異型DGKG(不活性化型と常時活性化型)とを合わせて調製した。

[細胞レベル]

- ・DGKGの発現により、細胞の形は変化するかどうか。 蛍光ファロイジンを用いてFアクチンを標識、蛍光顕微鏡を用いて細胞の形を詳細に観察する。

- ・DGKGの発現により細胞増殖に影響はあるか。 Cell Counting kit-8を用いて細胞の増殖速度を調べる。

- ・DGKGの発現により、細胞の移動度は変化するかどうか。 Wound Healing Assayを用いて検討する。(必要に応じてBoyden chamber法も行う)

- ・DGKGの発現により、細胞の浸潤能が変化するかどうか。 Boyden chamberおよびマトリゲルを用いて検討する。

[分子レベル]

DGKGの発現により、Rhoファミリー低分子量Gタンパク質の活性化状態に変化がどうかを調べる。GST-PAK-PBDによりRac1およびCdc42を、GST-Rhotekin-RBDによりRhoを、それぞれGTP結合型分子をプルダウン法により回収し、ウェスタンブロット法によって変化を定量する。

[ゲノムワイド]

マイクロアレイ解析により、DGKG発現抑制

細胞、およびこれに DGKG を過剰発現させた細胞との間で発現に差の出る遺伝子群を抽出し、詳細な解析を行う。

4. 研究成果

(1) 大腸がん細胞における DGKG の DNA メチル化と発現抑制

大腸がん由来細胞株 9 種を用いて DGKG の発現を RT-PCR 法で調べたところ、8 種の細胞株では発現が検出できなかった。一方、市販の正常大腸細胞 RNA を用いた実験では DGKG は十分発現していた (GAPDH 発現の約 100 分の 1)。そこで、これら細胞の DNA を用いて DGKG プロモーター領域のメチル化を解析した。Methylated-specific PCR を行ったところ、DGKG が発現していない細胞ではメチル化検出プライマーセットでの増幅がより強く表れた。正常大腸細胞では非メチル化検出プライマーセットでの増幅のみが観察された。バイサルファイトパイロシーケンス法を用いて各 DNA のメチル化レベルを定量したところ、正常大腸 DNA ではメチル化は 10%未満という低レベルであったが、大腸がん細胞では 20%~80%という高レベルのメチル化が示された。特に 9 種の細胞株のうち 6 種はメチル化率 60%以上と非常に高い値を示した。以上の結果より大腸がんでは、正常細胞に比べて DGKG の DNA が強くメチル化されており、発現もまた抑制されていることが示唆された。

(2) 大腸がん検体を用いた DNA メチル化レベルの検討

次に大腸がん検体を用いて、細胞株の場合と同様に DNA のメチル化レベルを定量した。その結果、大腸がん検体の半数以上がメチル化率 20%を超えた。その一方、非がん部検体の DNA は全てメチル化率 10%以下であり、有意に差があることが示された。したがって、細胞株ばかりではなく、実際の腫瘍においても多くのがん細胞で DGKG がメチル化により発現抑制されていることが示唆された。

(3) DGKG 過剰発現細胞を用いた機能解析

次に DGKG 発現抑制と大腸がんの関連を明らかにするために、DGKG を発現していない大腸がん細胞株に DGKG を過剰発現させて細胞のフェノタイプの変化を観察した。遺伝子導入にはアデノウイルスを利用し、またフェノタイプ変化と DGKG 酵素活性との関係を知るために、発現ベクターには野生型 (WT) の他に、不活性化型 (KD)、常時活性化型 (CA) の DGKG を用意し、コントロールには LacZ 遺伝子を用いた。

HCT116、DLD1、RKO 細胞にこれら DGKG を発現させて、細胞の増殖速度の違いを観察したところ、WT の発現では増殖速度に変化は無かったが、KD と CA の発現により有意に増殖速度が減少した (コントロールの 60~80%)。酵素活性が抑制されても活性化されていても

増殖速度を低下させるというこの結果は、おそらくそれぞれ異なるメカニズムによるものと考えられ、WT 発現が増殖に影響しないのは、細胞内で厳密な制御を受けているためと予想できる。

HCT116 細胞を用いた細胞遊走・細胞浸潤アッセイでは、WT、KD を発現したときに約 50%、CA を発現したときに約 80%、それぞれ細胞応答が阻害された。この変化には Rho ファミリー低分子量 G タンパク質が関与している可能性があるため、これらの細胞を用いて EGF 刺激時の RhoA、Rac1 の活性化レベルの変化を観察した。その結果、CA を発現した場合のみ活性化 Rac1 レベルがやや減少し、活性化 RhoA レベルがやや増大した。

これらの結果より、DGKG の酵素活性が大腸がん細胞の遊走・浸潤を阻害している可能性が示唆された。DGKG の大腸がんにおける発現抑制はがんの悪性化と関連している可能性が興味深い。

(4) マイクロアレイによる DGKG 発現抑制を通じた遺伝子発現パターン変化の解析

DGKG 発現抑制により、大腸がん細胞で様々な遺伝子の発現量に変化が生じる可能性をマイクロアレイ法により検討した。すなわち、DGKG-KD あるいは CA を発現した細胞から RNA を抽出し、LacZ 発現細胞の RNA と比較して発現量が変化した遺伝子をスクリーニングした。だがしかし、今回の実験では様々な条件にわたり有意に発現が変化するような遺伝子は同定できなかった。

(5) 総括

本研究により、大腸がんにおいて DGKG がエピジェネティックに発現抑制を受けていることが示された。しかし DGKG の生理機能や、その発現抑制とがん化との関連について明確な結論が得られず、当初の目的を達成できなかったことが残念である。マイクロアレイ解析が空振りに終わったことが想定外であった。今後のための反省点としたい。

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 4 件)

甲斐正広, 山本英一郎, 丸山玲緒, 佐藤亜紀子, 新沼猛, 津矢田明泰, 鈴木拓. 大腸がんにおける DGKG エピジェネティック発現抑制とがん細胞表現系の関連. 第 73 回日本癌学会学術総会: 2014 年 9 月 25-27 日: パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市).

甲斐正広, 丸山玲緒, 山本英一郎, 新沼猛, 佐藤亜紀子, 津矢田明泰, 鈴木拓. 大腸がんにおける DGKG のエピジェネティックな抑制とその機能的意義. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会: 2014 年 6 月 19-20 日: 北海道大学(北海道、札幌市).

甲斐正広, 山本英一郎, 丸山玲緒, 佐藤亜紀子, 新沼猛, 津矢田明泰, 鈴木拓. DGKG は大腸がん細胞の増殖・浸潤・遊走をその酵素活性によらず抑制する. 第 72 回日本癌学会学術総会: 2013 年 10 月 3-5 日: パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市).

甲斐正広, 山本英一郎, 丸山玲緒, 佐藤亜紀子, 新沼猛, 津矢田明泰, 鈴木拓. DGK のエピジェネティック発現抑制による大腸がん細胞の形質変化. 第 86 回日本生化学会大会: 2013 年 9 月 12-14 日: パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 正広 (Kai, Masahiro)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80260777