

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590759

研究課題名(和文)胎児期のエピジェネティクスの変化がもたらす炎症発がん感受性を規定する因子の解明

研究課題名(英文)Congenital epigenetic factors to determine susceptibility for inflammation related cancer

研究代表者

立道 昌幸 (TATEMACHI, Masayuki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：00318263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：炎症発がんの感受性を示すバイオマーカーを末梢血で見出すことを目的とした。Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)の概念を利用し、母体に葉酸含有の異なる餌をとらせメチル化の程度の異なる仔マウス(P53ヘテロ欠損)を作成した。この仔マウスの皮下に異物による慢性炎症を惹起させると線維肉腫が形成された。早期に発がんが認められた群と遅延した群の両群間でその仔体の末梢血DNAのメチル化や遺伝子発現の差異を網羅的に探索した結果、いくつかの遺伝子でメチル化の差異を認め、炎症発がんの感受性に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to find the biomarker, using DNA and RNA extracted from peripheral blood, which can suppose susceptibility for the inflammation related carcinogenesis. According to the concept of Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), P53 +/- mother mice was fed with different concentration of folic acid- containing bait between the fetus periods to make different degrees status of the DNA methylation among those offspring. Chronic inflammation by subcutaneously inserting plastic plate was made to develop fibrosarcoma, resulting in different time-course of carcinogenesis. In order to determine the factors related to the susceptibility for carcinogenesis, we comprehensively examined the differences in levels of DNA methylation and RNA expression between mice with hypo-and hyper-susceptibility. The results showed that some genes were found to possibly be candidate as the biomarker.

研究分野：分子環境予防医学

キーワード：炎症発がん 感受性 エピジェネティクス DOHaD バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症が、がんの発生母地となるいわゆる炎症関連がん(炎症発がん)は、胃がん、肝がん、大腸がん、悪性中皮腫などが代表的であり、日本人の全がんの20%以上を占める。しかし慢性炎症が、発がん促進作用を持つことは明らかであるものの、慢性炎症を持つ人の中で、実際「がん」が発症するのは、その集団のごく一部である。

がん予防の観点からは、慢性炎症をコントロールすることにより発がんを予防し得ると考える。しかしながら、全てのヒトに対して炎症を除去することは困難である。例えば、ヘリコバクターピロリ菌の感染による慢性胃炎が胃がんの発生母地となるが、5千万人と言われている感染者全てに除菌療法を行うことは、耐性菌の出現や抗生物質による副作用の問題もあり公衆衛生学的な施策としてすすめるには解決すべき課題がある。これらの観点から、慢性炎症を持つ集団において、がんになり易い体質(発がん感受性)を規定する因子を見つけ出すことは、予防医学上極めて重要な意義を持つ。

これまで、発がん感受性を規定する因子として炎症性サイトカインや酸化ストレスに対する耐性遺伝子などの遺伝子多型の研究が精力的に進められてきたが、未だ感受性を全て説明するまでには至っていない。

炎症発がんの機序としては、炎症によって生じる各種ラジカルによるDNA障害(変異)に加え、DNAの変異を伴わないエピジェネティクスの異常の集積が発がんに関与することが示されている。特に炎症により、DNAのメチル化が促進され、がん抑制遺伝子の発現低下や遺伝子不安定性を起こすことで発がんに関与すると考えられている。そして、メチル化亢進の引き金としては、既に存在するメチル化の異常が重要であり、これが新たなメチル化異常を連鎖的に惹起する可能性が考えられている。

近年 Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) の概念が注目されており、胎児期における栄養環境がエピジェネティクスの異常に関連し、糖尿病、動脈硬化性疾患などの生活習慣病の一因となっていることが示されている。今回、胎児期に惹起されたメチル化異常がベースとなり、炎症によりメチル化異常が亢進され、炎症発がんに関与する重要な役割を持つ可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、炎症発がんに対する感受性を推測しうるバイオマーカーを末梢血から得られるDNAやRNAを用いて見出すことにある。DOHaDの仮説を用いて、ゲノムにメチル化の差異を引き起こした仔マウスを作成し、生まれ持ったメチル化の差異が炎症発がんに対してどのような影響を及ぼすか検討することによって、がん感

受性と関連するメチル化異常を特定することを目的とする。すなわち、本研究は、炎症発がんの感受性と関連する生まれ持ったメチル化の異常を探索する基盤研究である。具体的には、妊娠母体に対して、メチル化促進飼料や低葉酸飼料で飼育することによって、生まれてくる仔体にゲノムのメチル化に差が生ずることが先行研究で明らかにされている。そこでメチル化の程度を操作した仔体を作成し、我々が考案した炎症発がん動物モデル(1)を用いて、がん感受性を観察し、生まれ持ったいかなる遺伝子あるいはゲノムのメチル化の変化が炎症発がんの感受性に影響を及ぼすのかを検討することにある。

3. 研究の方法

p53ヘテロ欠損マウスの全妊娠期間において、メチル化促進飼料(高葉酸飼料)、通常飼料、低葉酸飼料にて飼育し、メチル化の程度の異なる仔マウス(p53ヘテロ欠損)を作成した。4週齢の離乳までこれら特殊飼料を与え、それ以降は普通飼料にて飼育した。8週齢時にエーテル軽麻酔下にて右後脚皮下に直径1cmのプラスチックプレートを挿入し、慢性炎症を惹起させた。この操作によりp53ヘテロ欠損マウスは炎症部位に一致して繊維肉腫が発祥する(1)。本研究では、腫瘍の直径が1cmの大きさから増大傾向を示した時点を腫瘍発祥時期とした。その結果、30週より早期に線維肉腫が確認できた仔体を高感受性群、それ以降に発祥した仔体を低感受性群とした。

炎症惹起前に、尾から末梢血500ulを採取し、-80度にて冷凍保存した。後日この全血からDNAとRNAを抽出した。

抽出したDNAを用いて、ゲノムワイドでメチル化のプロファイリングを行った。すなわちDNAメチル化部位をメチル化DNA結合蛋白であるMBD2bにて濃縮した後、次世代シーケンサーを用い高感受性群と低感受性群間においてメチル化パターンの相違を検出した。

また、RNAについてはアジレント社のマイクロアレイを用いてRNA発現を半定量化し、pathway解析、Gene Ontology解析を行った。

4. 研究成果

1)メチル化飼料、低葉酸飼料による発がん性の差異の検討

各飼料における平均腫瘍形成期間は、それぞれ、普通飼料170.3日(95%CI=149.5-191.2, n=6)、低葉酸飼料246.1日(95%CI=204.6-287.7, n=11)高葉酸飼料233.3日(95%CI=190.2-276.3, n=12)と、普通飼料に比して、低葉酸、高葉酸飼料ではともに平均発がん期間が遅延する傾向が認められた。これらの結果について図1に累積腫瘍形成率を示す。

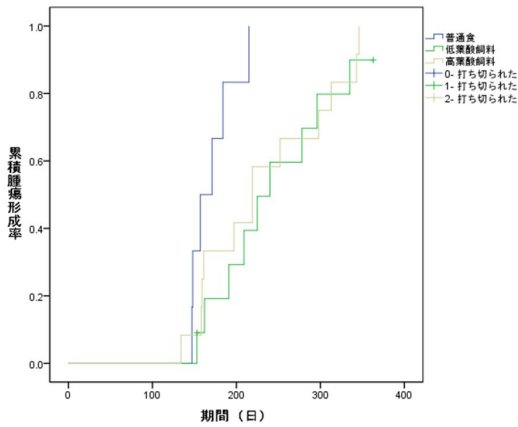


図 1 累積腫瘍形成率

このように、普通飼料においては腫瘍形成期間については大きなばらつきは認められなかった。一方で胎児期に高葉酸飼料と低葉酸飼料が投与された仔体では共に腫瘍発生時期が遅延する結果であり、普通飼料より早期に発がん促進作用を示す仔体は認めなかった。また、高葉酸、低葉酸飼料群とも特に腫瘍性状に変化はなかった。これらの結果から、炎症発がんにおいて、ゲノムワイドでの高メチル化あるいは低メチル化の状態が発がん感受性に関与するということではなく、特定の部位（遺伝子）におけるエピジェネティクスの変化が発がん感受性に関与すると思われる。

そこで、母体に高葉酸あるいは低葉酸飼料が投与された仔体において共に早期に発がんする仔体と、遅延する仔体が出現したため、早期のものを高感受性群、遅延したものを低感受性群として、両群間における DNA メチル化のプロファイリングを検討した。

2) 高感受性群と低感受性群における DNA メチル化の差異についての網羅的検討
高感受性、低感受性両群間においてメチル化の差異についてメチル化結合蛋白で濃縮後に次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、母体が高葉酸飼料にて飼育された仔体においては、TOP3A, Mpp7, Pnck, Hivep1, Gm608, Gm8116 に、低葉酸飼料にて飼育された仔体においては、Erdr1, Rn45s, Esp38, Arhgap23, Ak5 などにメチル化の差異が認められた。さらに、高葉酸飼料 高感受性群と低葉酸飼料 低感受性群の群間においては、Zxda, Nudt10, Nudt11, L1Md-Gf21, LOC101055746, Mpp7, Pabpc112b-ps, Mtap7d2, Ngfrap1, Zfx が、低葉酸 高感受性群、高葉酸 低感受性の群間では、Hoxa5, Arhgap21, Hoxa3, 2700086A05Rik, Gm7120, Mid1, Zfpm1, Coro2b, Gm18832, Bcl11b, Shank3, Lmbrd1,

Grm4 などに有意な差異が認められた。

3) RNA 発現パターンの差異

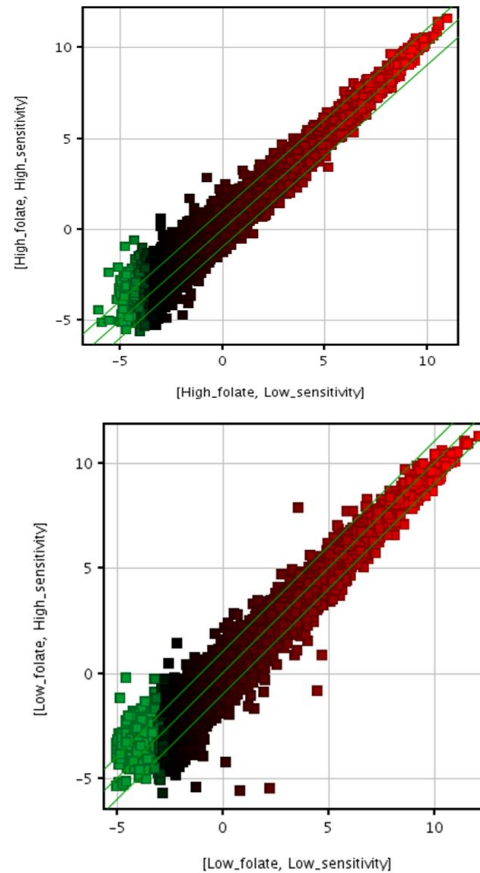


図 2 発現パターンの変化

Clustering by Samples

Clustering algorithm :Hierarchical

Distance metric :Pearson's Centered

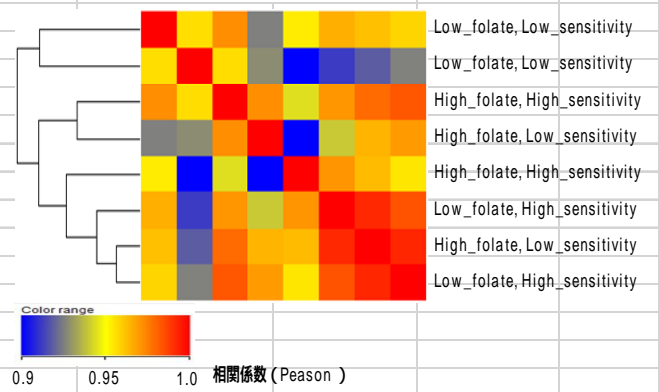


図 3 クラスタ分析図

次に RNA の発現パターンの差異について検討した。その結果を図 1, 2 に示した。高感受性群と低感受性群間の Pathway 解析について、母体が高葉酸飼料で飼育された仔体では Taste transduction, GnRH signaling pathway, Vascular smooth muscle contraction, MAPK signaling

pathway, Complement and coagulation cascades

母体が低葉酸飼料で飼育された仔体では、ECM-receptor interaction, Hematopoietic cell lineage, Focal adhesion, Complement and coagulation cascades, Dilated cardiomyopathy, Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)に高感受性群と低感受性群間に有意な差を認めた。Ontology 解析では、母体が高葉酸飼料で飼育された仔体では、regulation of biomineral formation, regulation of bone mineralization, cell-cell signaling, defense response, regulation of system process, response to abiotic stimulus, protein maturation, sensory organ development, regulation of synaptic transmission, ionotropic glutamate receptor signaling pathway, regulation of synaptic plasticity に、母体が低葉酸飼料で飼育された仔体では、muscle system process, muscle contraction, chloride ion homeostasis, cellular chloride ion homeostasis, localization of cell, cell motility, coagulation, blood coagulation, hemostasis, monovalent inorganic anion homeostasis, cellular monovalent inorganic anion homeostasis, cell motion, cytoskeleton organization, regulation of phagocytosis, regulation of ossification, wound healing, striated muscle cell differentiation, regulation of body fluid levels, muscle cell differentiation, cell adhesion, biological adhesion, central nervous system neuron differentiation, positive regulation of phagocytosis, actin filament-based process, cellular anion homeostasis, anion homeostasis, response to metal ion, response to wounding, actin cytoskeleton organization, chemical homeostasis, regulation of biomineral formation, regulation of bone mineralization, actomyosin structure organization に $p < 0.001$ で有意差を認めた。

遺伝子レベルの発現において、高感受性群で共通して4倍以上発現が変化していた遺伝子は、Crispld2 (cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2)であった。

これらの結果から、TOP3A, MPP7, Pnck, Hivep1, Gm608, Gm8116 のメチル化異常が発がん高感受性に関与する可能性がありバイオマーカーとして用いることができる可能性が示唆された。

一方で、発現に関しては、Complement and coagulation cascades に高感受性群にて、高葉酸、低葉酸飼料の有無にかかわらず共通の変化が認められ、遺伝子レベルでは、

高感受性群において Crispld2 の発現レベルの差が認められた。この遺伝子は、グルココルチコイド受容体としてサイトカインの機能に関係する遺伝子であるためこの遺伝子の増強、減弱が炎症発がんに関係する可能性が示唆された。

参考文献：(1) Tazawa, Tatemichi et. Al Carcinogenesis. 2007 28(1):191-8.

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6件)

1. Hata, H., Tatemichi M, Nakadate T. Annexin A8 Expression As a Determinant of the Properties of Pancreatic Cancer. Molecular Carcinogenesis 53: 181-91, 2014 査読有
2. Tatemichi M, Hata H, Nakadate T. Induction of activation-induced cytidine deaminase by a not-directly mutagenic carcinogen: a novel potential molecular mechanism. Environ Health Prev Med 19:238-44, 2014, 査読有

[学会発表](計7件)

1. 寺山隼人、金沢輝久、田村摩依子、古谷祐生子、遠藤整、内藤宗和、立道昌幸、渡辺哲、坂部貢 アセタミブリド曝露によるマウス精巣及び脳遺伝子への影響 第85回日本衛生学会学術総会 2015.3.27 和歌山県民文化会館(和歌山県、和歌山市)
2. 遠藤整、根津貴洋、渡辺哲、立道昌幸 がん細胞の低栄養環境適応と進展メカニズムの解明 第14回分子環境予防研究会、2015.2.13 大阪市立大学(大阪府、大阪市)
3. 立道昌幸、畑晴実. 非変異原性発がん物質による Activation-induced Cytidine Deaminase の誘導—新規発がんメカニズムの可能性. 第71回日本癌学会学術総会. 2012.9.19 ロイトン札幌(北海道、札幌市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

立道昌幸 (TATEMICHl Masayuki)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：00318263

(2)研究分担者

畑春実 (HATA Harumi)
昭和大学・医学部・助教
研究者番号：00396441

(3)連携研究者：なし