

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591637

研究課題名(和文) ヒト有棘細胞癌におけるゲノムメチル化変異の解析

研究課題名(英文) Analysis of the alteration of genome methylation level in human skin squamous cell carcinoma

研究代表者

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：40595708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト皮膚有棘細胞癌(SCC)の発生・進展に関するepigenetic変異の探索を目的として、マウス皮膚腫瘍の網羅的ゲノムメチル化解析にて絞り込まれた遺伝子・領域について解析を行った。ヒトSCC検体27例および正常皮膚22例の解析の結果、癌部と非癌部で有意な発現の差を示す遺伝子が15個あり、そのうちゲノムメチル化解析が可能であった遺伝子のいずれにおいても、メチル化と発現のレベルに相関が見られなかった。従って、これらの発現変異はゲノムメチル化変異以外の機序で誘発されていると考えられた。一方、発現変異を示した遺伝子の中に、SCCの増殖や分化能に関する新規の遺伝子が発見できた。

研究成果の概要(英文)：To find epigenetic alteration involved in the development and/or progression of skin squamous cell carcinoma, we examined genome methylation level and expression level of the candidate genes, which were screened by the analysis of chemically induced mouse skin tumors, in human skin SCC. In the analysis of the methylation level of CpG islands located near 15 genes, which showed aberrant expression level in human SCC, however, no clear difference was found between SCC and normal skins. This result indicated that aberrant expression of the 15 genes in SCC was not caused by altered genome methylation level in SCC cells. In the analysis to elucidate the role of those genes in the development of SCC, it was found that the gene encoding ephrin receptor, which showed higher expression level in SCC, affects cell proliferation and differentiation of SCC cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：ゲノムメチル化 皮膚有棘細胞癌 マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚腫瘍のうち有棘細胞癌(SCC)は比較的発生頻度の高い悪性腫瘍であり、日本における年間の発生数は10万人あたり2.5人とされる。欧米においても年々増加傾向にあり、有効な治療、診断法の確立が急がれる。体表部に発生する腫瘍であることから、より低侵襲な治療法が求められ、そのためには早期診断、良性疾患との鑑別を容易にするマーカーの開発が必要となる。

SCCの発生にかかわる変異として p53、H-ras の点突然変異や c-Myc の増幅など DNA の配列情報の変異等が多数報告されているが<sup>1)</sup>、それらは SCC の一部の原因を説明するに過ぎず、DNA のメチル化やヒストン修飾など epigenetic な変異も SCC の発生に関与していることが近年明らかになってきた。しかしながら、従来の研究では既知の癌関連遺伝子の解析が中心であり、網羅的に SCC の epigenetic 変異を解析した報告はなく知見が限られていた。

これまでに我々は、SCC の発生・進展に関連する新規のゲノムメチル化変異領域のスクリーニングを行うために、マウス SCC モデルを用いた研究を進めてきた。7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) と 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を用いた 2 段階化学発癌プロトコールにより誘導した SCC において、正常皮膚と比較してゲノムメチル化レベルが変化している領域を、メチル化 DNA 免疫沈降法 (MeDIP 法) および NimbleGen promoter plus CpG island array の組み合わせにより網羅的に調べた。さらに Agilent whole genome microarray にて遺伝子発現を網羅的に解析し、発現とメチル化レベルが腫瘍において変化している遺伝子を 91 カ所見つけた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト SCC の発生・進展に関するゲノムメチル化変異を探索するために、

これらの候補遺伝子のヒト相同領域について、ヒト SCC および正常皮膚での発現・メチル化レベルの解析を行った。この解析によりヒト SCC において重要な役割を果たす遺伝子を探索し、SCC の発生・進展のメカニズムの解明を目指した。加えて SCC の新規マーカーを開発することを試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 検体からの DNA および RNA 抽出; 日本大学板橋病院にて得られた SCC 手術検体 27 例および正常皮膚検体 22 例の凍結検体を解析対象とした。凍結組織 3~4 mm 角を Trizol<sup>®</sup> 溶液中でホモジナイズし、RNA 及び DNA を抽出した。

(2) 発現の解析; 各検体の RNA より cDNA を作成し、候補遺伝子の発現量を real time PCR により解析した。有意な差が見られた遺伝子のうち、特に詳細な機能解析に進むものについては、western blotting および組織の免疫染色により蛋白レベルでの発現解析も行った。

(3) ゲノムメチル化の解析; マウスの解析より絞り込んだ候補領域の CpG サイトについて、そのヒト相同領域の構造を調べ、Methprimer ソフトを用いてプライマーを設計した。検体ゲノム DNA 500ng を bisulfite 処理し、PCR により対象の CpG を含む領域を増幅した。この PCR 産物を鋳型として in vitro 転写により RNA を増幅後、Sequenom epityper で解析し、メチル化レベルの定量を行った。

(4) 機能解析; ヒト SCC 培養細胞株 A431 における候補遺伝子の発現量を siRNA で抑制し、細胞の増殖能を MTT assay により、浸潤能を Matrigel invasion assay により解析した。

## 4. 研究成果

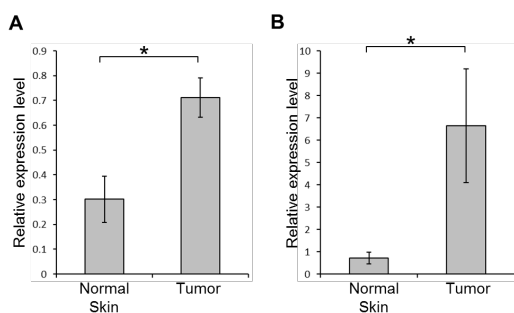
(1) 遺伝子発現レベルの解析

ヒト SCC 検体 27 例、および正常皮膚 22 例

より RNA を抽出し、マウスでスクリーニングした候補遺伝子について real time PCR により発現解析を行ったところ、SCC と正常皮膚との間で発現量に差のあった遺伝子が 15 個絞り込まれた。

### (2) ゲノムメチル化レベルの検討

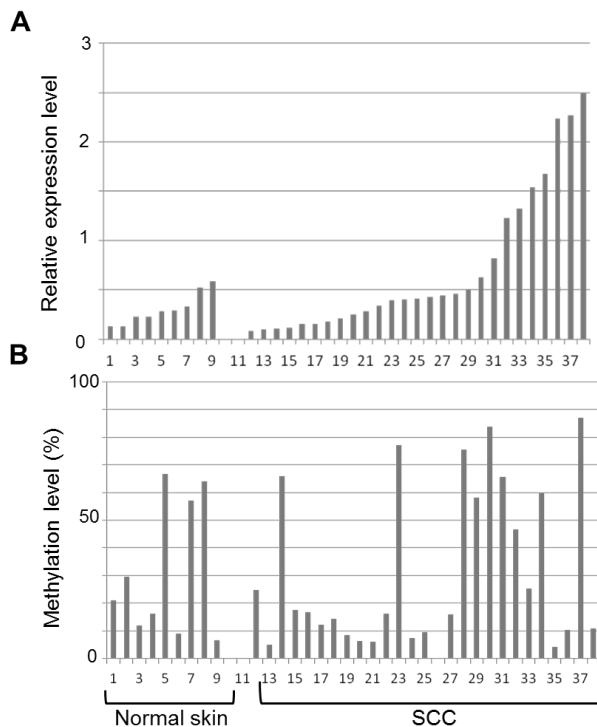
発現に差のあった 15 個の遺伝子について、ゲノムメチル化レベルを解析したが、発現量とメチル化レベルに明確な関連の見られた遺伝子・領域は見つからなかった。例えば、WNK lysine deficient protein kinase 1 (WNK1) は腫瘍において有意な発現上昇を示したが(図 1B)、マウス SCC でメチル化変異の見られた領域と相同の exon9 のメチル化状態は SCC と正常皮膚で差が見られず、発現量とゲノムメチル化レベルの相関も見られなかった(図 2)。マウスと異なり、ヒト WNK1 のプロモーター領域には CpG サイトが密集した CpG island が存在するため、この領域についても検討したが、同様の結果であった。以下(3) で機能解析の結果を示している Ephrin type-B receptor 2 (EPHB2) もまた、腫瘍で有意な発現上昇を示したが(図 1B)、ゲノムメチル化レベルは腫瘍と正常皮膚間で差が無く、発現量とメチル化レベルの相関も見られなかった。



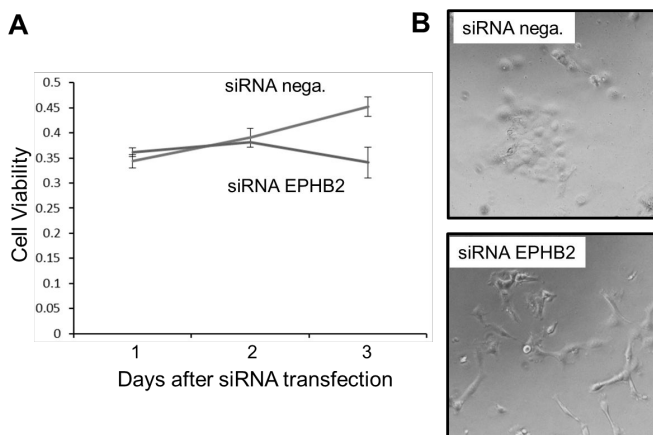
**図 1** ヒト SCC と正常皮膚における候補遺伝子の発現量 (A.WNK1, B. EPHB2 )

### (3) 遺伝子の機能解析

ゲノムメチル化の変異は見つからなかったが、発現の変化していた遺伝子の多くは有棘



**図 2** 各検体における WNK1 の発現量(A) と、ゲノムメチル化レベル(B)の比較



**図 3** ヒト SCC 細胞株 A431 における EPHB2 のノックダウン効果  
A.細胞増殖率 (WST8 アッセイ)  
B.細胞の形態 (siRNA 投与後 3 日め)

細胞癌における変異の報告のないものであるため、そのいくつかについて機能解析を行い、腫瘍の増殖能や分化能に与える役割について検討を行った。一例を挙げると、上皮細胞間の相互作用を制御し、組織の形態形成に参与しているエフリン受容体の一つ EPHB2 は、siRNA により発現を抑制すると、ヒト

SCC細胞株 A431 の細胞増殖能を有意に低下させた(図 3A)。またこの時、細胞の形態は大きく変化し、コントロール siRNA を投与した群と比較して細長く伸長した形態を示し、細胞間の接着状態が失われていた(図 3B)。また EPHB2 の発現抑制により、細胞分化に関連するマーカーの発現量が変化しており、SCC における EPHB2 の発現上昇が SCC の悪性化に関連している可能性が示唆された。EPHB2 自体は大腸癌<sup>2)</sup>や膀胱癌<sup>3)</sup>等では寧ろ発現が低下しており、腫瘍抑制性に働くと考えられていることから、今回得られた結果が SCC 特異的なものなのかどうか、更に検討を続けていく。その他、SCC で発現が変化していた候補遺伝子のいくつかについても、新規の SCC 関連遺伝子である可能性があることから詳細な検討を続けていく。

#### <引用文献>

Boukamp P. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis*. 2005 Oct;26(10):1657-67

Batlle E1, et al. EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature*. 2005, 435(7045):1126-30.

Li X et al. The differential expression of EphB2 and EphB4 receptor kinases in normal bladder and in transitional cell carcinoma of the bladder. *PLoS One*. 2014, 9(8):e105326.

#### 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 1 件)

Fujiwara K, Ghosh S, Liang P, Morien E, Soma M, Nagase H. Genome-wide screening of aberrant DNA methylation which associated with gene expression in mouse skin cancers. *Molecular Carcinogenesis* 2015, 54(3):178-88 (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

藤原 恭子、相馬 正義、永瀬 浩喜 : Genome-wide screening of aberrant DNA methylation which associated with gene expression in skin cancers. 第 36 回日本分

子生物学会年会, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市), 2013.12.3-6

藤原 恭子、秦由美、相馬 正義、永瀬 浩喜 : 皮膚腫瘍における発現変化を伴うゲノム DNA メチル化変異の網羅的スクリーニング. 第 71 回日本癌学会学術総会, ロイトン札幌(北海道・札幌市), 2012.9.19-21

〔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

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号 : 40595708

##### (2) 研究分担者

照井 正 (TERUI, Tadashi)  
日本大学・医学部・教授  
研究者番号 : 30172109

##### (3) 連携研究者

永瀬 浩喜 (NAGASE, Hiroki)  
千葉県がんセンター・研究局・研究所長  
研究者番号 : 90322073