

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658265

研究課題名(和文) エピジェネティック解析による動物の腫瘍性疾患の病態

研究課題名(英文) Studies on the epigenetic regulations in neoplastic diseases of animals

研究代表者

辻本 元 (Tsuji moto, Hajime)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：60163804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：犬のリンパ腫細胞において、CDKインヒビター(細胞周期を調節する蛋白質)をコードするp16, p15, p14遺伝子およびABCDトランスポーター(細胞から薬剤等を排出する蛋白質)をコードするABCB1遺伝子の発現を解析した。DNAメチル化やヒストンH3脱アセチル化といったエピジェネティック制御によってこれら遺伝子の発現が減少している例が見いだされた。さらに、その制御を阻害するエピジェネティック医薬品によって遺伝子発現量が回復した。本研究により、動物の腫瘍性疾患の病態におけるエピジェネティクス的重要性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Expressions of p16, p15, and p14 genes encoding CDK inhibitors (proteins that regulate cell cycle) and ABCB1 gene encoding one of the ABCD transporters (proteins that efflux drugs etc. from cells) were examined in canine lymphoma cells. Suppression of the expression of these genes via epigenetic regulations such as DNA methylation and histone H3 deacetylation was detected in a proportion of canine lymphoma cases. Moreover, treatment with epigenetic drugs to inhibit such regulations could restore their gene expression levels. The present study disclosed an important role of epigenetic regulation on the pathobiology of neoplastic diseases in animals.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：獣医学 腫瘍 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクス(epigenetics)は、ギリシャ語の”epi”(後の)と英語の”genesis”(創造)を組み合わせた語であり、「ゲノム塩基配列の変化を伴うことなく、遺伝子発現を制御する現象の総称およびその学問領域」を指す。1980年代になってエピジェネティクスに関連する多くの分子群が同定され、これらがDNAメチル化やヒストン脱アセチル化を介して遺伝子発現を抑制し、エピジェネティックな変化に寄与することが明らかになってきた。

1993年、ヒトの腫瘍においてRB遺伝子のDNAメチル化により不活化が見いだされて以来、ヒトに発生する多くの腫瘍性疾患においてエピジェネティックな変化が見出されるようになり、腫瘍発生に関わる分子機構研究の様相が一変した。さらに2004年になって、エピジェネティック治療薬として、DNAメチル化阻害薬がヒトの骨髄異形成症候群の治療薬として米国FDAによって認可された。一方、獣医学領域では、腫瘍におけるエピジェネティックな変化は具体的に実証されていない。そこで、最近になって利用可能となったエピジェネティクス研究用Toolを用いることにより、動物における腫瘍性疾患の病態に関する研究が飛躍的に進歩するものと考え、本研究を企画することとした。

2. 研究の目的

ヒトおよび動物の腫瘍性疾患に関しては、長年の間ジェネティックな変化によってその病態を説明しようとする研究が進められてきた。しかし、発生・分化のメカニズムにおいて働いているエピジェネティクスによる制御の破綻が腫瘍の病態に密接に関与するものと考えられた。本研究においては、動物の腫瘍、とくに犬のリンパ系腫瘍を対象として、癌遺伝子および薬剤耐性関連遺伝子のエピジェネティックな変化を明らかにするとともに、エピジェネティック治療薬の効果を検討したいと考えた。本研究の成果は、動物における腫瘍の分子機構に全く新しい展開をもたらすとともに、ヒトの臨床医学の発展に貢献するものと考え

られる。

3. 研究の方法

(1) 犬のリンパ系腫瘍細胞における *p16*, *p15*, *p14* 遺伝子の不活化: イヌ *p16* 遺伝子に関してはその一部の配列が知られていたが、*p15* 遺伝子との高い相同性および *p14* 遺伝子との exon 共有のため、これら3遺伝子を区別して解析するためにその全長を同定する必要がある。本研究において、イヌ *p16* 遺伝子の全長 cDNA の配列を同定し、*p16*, *p15*, *p14* のそれぞれに特異的なプライマーを作製した。*p16* 遺伝子に関しては real-time PCR によってその発現量を定量し、*p15* 遺伝子および *p14* 遺伝子に関しては半定量的な RT-PCR を行った。ゲノム DNA の解析においては、*p16*, *p15*, *p14* 遺伝子が座位する 11 番染色体の領域にそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR を行った。はじめに、6 種類の犬のリンパ系腫瘍細胞株 (CLBL-1, GL-1, UL-1, CL-1, Nody-1, Ema) について解析し、次にリンパ系腫瘍を発症した犬の 28 症例 (B 細胞性 14 例, T 細胞性 14 例) から採取した腫瘍サンプルを用いて解析を行った。

(2) 犬のリンパ系腫瘍細胞における *p16* 遺伝子 CpG island の DNA メチル化: *p16* 遺伝子の発現制御に関わる機構として、DNA メチル化によるエピジェネティックな制御について検討した。*p16* 遺伝子の発現低下が認められた細胞株およびその発現量の増加が認められた細胞株を用い、bisulfite sequence 法によって *p16* 遺伝子 CpG island のメチル化を解析した。さらに、メチル化阻害薬である 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 添加による *p16* 遺伝子の発現量の変化を検討した。

(3) 犬の高悪性度リンパ腫症例における *p16*, *p15*, *p14* 遺伝子の発現およびその予後との関連: 細胞株を用いた研究成果に基づき、高悪性度リンパ腫の症例から採取した腫瘍サンプルにおける *p16*, *p15*, *p14* 遺伝子の発現量を解析し、

その予後への影響を検討した。犬の高悪性度リンパ腫症例 71 例(B 細胞型 58 例、T 細胞型 13 例)を対象とした。p16 遺伝子の上流に存在する CpG island のメチル化の解析には、3 組のプライマーを用いたメチル化特異的 PCR を行った。予後に関しては Kaplan-Meier 法による総生存期間の解析を行った。p16, p15, p14 の各遺伝子の発現量および p16 CpG island のメチル化の他、一般的な臨床的および病理学的な因子について、その予後への影響を解析した。

(4) 犬のリンパ系腫瘍細胞におけるヒストン H3 脱アセチル化による p16 遺伝子の発現制御: 4 種類の犬リンパ系腫瘍細胞株(CLBL-1, GL-1, UL-1, CL-1)を用い、DNA メチル化以外のエピジェネティックな機構を検討するため、ヒストン H3 脱アセチル化による不活化機構について検討した。ヒストン H3 のアセチル化レベルの検討にはクロマチン免疫沈降法を用いた。また、ヒストン脱アセチル化阻害薬である trichostatin A (TSA) 存在下で培養し、その前後における p16 遺伝子発現量の変化を検討した。

(5) 犬のリンパ系腫瘍細胞における ABCB1 遺伝子のエピジェネティック発現制御: 犬のリンパ系腫瘍細胞株のうち、ピンクリスチン感受性株 2 株(GL-1, CLBL-1)とピンクリスチン耐性株 2 株(UL-1, Ema)を用い、ABCB1 遺伝子の CpG motif における DNA メチル化をバイサルファイトシーケンスとリアルタイムメチル化特異的 PCR によって解析した。次に、同遺伝子領域のヒストン H3 アセチル化に関して、クロマチン免疫沈降法を用いて解析した。さらに、高悪性度多中心型リンパ腫に罹患した犬 27 頭から採取した腫瘍細胞サンプルに関して、同様の方法で ABCB1 遺伝子の DNA メチル化解析を行った。

4. 研究成果

(1) 犬のリンパ系腫瘍細胞における p16, p15, p14 遺伝子の不活化: 定量的 PCR によって遺

伝子発現量を解析したところ、2 種類の T リンパ系腫瘍細胞株(Nody-1, Ema)においては、p16, p15, p14 のいずれの遺伝子に関しても発現がほぼ完全に消失していた。また 3 種類の細胞株(CLBL-1, GL-1, UL-1)においては、正常リンパ節に比べて p16 遺伝子の発現量が少なかった。p16, p15, p14 遺伝子の発現が消失していた 2 細胞株においては、当該領域のゲノム PCR でまったく増幅が認められず、これら遺伝子領域の欠失が示唆された。同様の異常が 14 例の T 細胞性リンパ系腫瘍症例のうちの 2 例で認められたが、B 細胞系リンパ系腫瘍症例では認められなかった。以上の所見から、p16, p15, p14 遺伝子の同時欠失は犬のリンパ系腫瘍において認められる分子生物学的な異常の一つであると考えられた。

(2) 犬リンパ系腫瘍細胞における p16 遺伝子 CpG island のメチル化: エピジェネティック制御に関する解析の結果、p16 mRNA の発現が低下していた 3 株のいずれにおいても、その CpG island は高メチル化状態であり、5-aza-dC の存在下での培養によって p16 発現量が上昇した。一方、p16 発現量が増加していた CL-1 においては、CpG island は非メチル化状態であり、5-aza-dC 処理による発現量の増加は認められなかった。以上の結果から、DNA メチル化を介したエピジェネティックな制御による p16 遺伝子の不活化は犬のリンパ腫細胞における分子学的異常の一つであることが示された。

(3) 犬の高悪性度リンパ腫症例における p16, p15, p14 遺伝子の発現およびその予後との関連: 犬のリンパ腫症例から採取した腫瘍細胞における p16 mRNA 量を正常リンパ節におけるものと比較したところ、p16 mRNA の発現は、62 例中 53 例で低下(うち 21 例で検出限界未満)しており、9 症例で上昇していた。この 62 例のうち、18 例で p15 mRNA が検出限界未満であり、10 例で p14 mRNA が検出限界未満であった。また、

検討可能であった 68 例中 20 例において、*p16* 遺伝子 CpG island のメチル化が検出された。単変量解析では、*p16* 発現レベル、WHO 臨床サブステージ、免疫学的細胞系統、および解剖学的発生部位が予後に影響を与える因子であることが示された。多変量解析の結果、*p16* 発現レベル(上昇)および免疫学的細胞系統(T 細胞系由来)の2因子が負の予後因子として抽出された。しかし、*p16* CpG island のメチル化および *p15*, *p14* 遺伝子の発現量は生存期間に影響していなかった。また、*p16* 遺伝子の発現低下と同遺伝子 CpG island のメチル化との間には関連が認められず、その発現には DNA メチル化以外のエピジェネティック制御機構の関与が想定された。

(4) 犬リンパ系腫瘍細胞におけるヒストン H3 アセチル化による *p16* 遺伝子の発現制御: エピジェネティックな制御機構の一つであるヒストン H3 アセチル化を解析したところ、*p16* mRNA の発現量の少ない 3 株 (CLBL-1, GL-1, UL-1) では、*p16* mRNA の発現量の多い細胞株 (CL-1) に比べて、*p16* 遺伝子 exon 1 ゲノム領域が低アセチル化状態にあることが示された。TSA 存在下で培養したところ、2 種の細胞株 (GL-1, UL-1) では *p16* mRNA 発現量の有意な増加が認められ、いずれの細胞株においても当該ゲノム領域のアセチル化レベルの上昇が観察された。本研究において認められたヒストン H3 の低アセチル化による *p16* 遺伝子の不活化は、犬のリンパ系腫瘍におけるエピジェネティック制御の一つと考えられた。

(5) 犬のリンパ系腫瘍細胞における *ABCB1* 遺伝子のエピジェネティック発現制御: *ABCB1* 遺伝子の発現量を比較したところ、リンパ系腫瘍細胞株のうち、感受性株では耐性株に比べ *ABCB1* 遺伝子の発現量が著しく低く、*ABCB1* 遺伝子 CpG motif の DNA 高メチル化状態およびヒストン H3 の低アセチル化状態が認められた。さらに、感受性細胞株の培養液に DNA

脱メチル化薬 (5-aza-dC) およびヒストンアセチル化薬 (Trichostatin A) を添加したところ、いずれにおいても *ABCB1* 遺伝子の発現量が著しく増加した。しかしながら、症例由来の腫瘍細胞においては、化学療法感受性群と耐性群との間に明らかな差異は認められず、両群のほとんどの症例で *ABCB1* 遺伝子 CpG motif は低メチル化状態であった。これらの実験結果から、犬のリンパ系腫瘍細胞株では、DNA メチル化およびヒストン H3 アセチル化といったエピジェネティック発現制御が犬の *ABCB1* 遺伝子の発現量制御に関わっていることが示された。しかし、犬の症例由来リンパ腫細胞では、化学療法感受性期と耐性期のいずれにおいても *ABCB1* 遺伝子は DNA 低メチル化状態であり、その過剰発現には発現促進経路による活性化が必要であることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Fujiwara-Igarashi, A., Goto-Koshino, Y., Mochizuki, H., Sato, M., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Inhibition of *p16* tumor suppressor gene expression via promoter hypermethylation in canine lymphoid tumor cells. *Res. Vet. Sci.*, Epub ahead of print (2014).

doi:10.1016/j.rvsc.2014.04.008

Tomiyasu, H., Goto-Koshino Y., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Epigenetic regulation of the *ABCB1* gene in drug-sensitive and drug-resistant lymphoid tumor cell lines obtained from canine patients. *Vet. J.* 199:103-109 (2014).

doi:10.1016/j.tvjl.2013.10.022

Fujiwara-Igarashi, A., Goto-Koshino, Y., Sato, M., Maeda, S., Igarashi, H., Takahashi, M., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Prognostic significance of the expression levels of the *p16*, *p15*, and *p14* genes in

dogs with high-grade lymphoma. *Vet. J.* 199:236-244 (2014).

doi:10.1016/j.tvjl.2013.11.004

Fujiwara-Igarashi, A., Goto-Koshino, Y., Mochizuki, H., Maeda, S., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Simultaneous inactivation of the *p16*, *p15*, and *p14* genes encoding cyclin-dependent kinase inhibitors in canine T-lymphoid tumor cells. *J. Vet. Med. Sci.* 75:733-742 (2013).

doi:10.1292/jvms.12-0351

Tomiyasu, H., Watanabe, M., Goto-Koshino, Y., Fujino, Y., Ohno, K., Sugano, S. and Tsujimoto, H. Regulation of the expression of *ABCB1* and *LRP* genes by MAPK/ERK pathway and its role in the generation of side population cells in canine lymphoma cell lines. *Leuk. Lymphoma* 54:1309-1315 (2013).

doi:10.3109/10428194.2012.751529

Umeki, S., Ema, Y., Suzuki, R., Kubo, M., Hayashi, T., Okamura, Y., Yamazaki, J., Tsujimoto, H., Tani, K., Hiraoka, H., Okuda, M. and Mizuno, T. Establishment of five canine lymphoma cell lines and tumor formation in a xenotransplantation model.

J. Vet. Med. Sci. 75:467-474 (2013).

doi:10.1292/jvms.12-0448

〔学会発表〕(計5件)

Hiyoshi, S., Uchida, K., Nakashima, K., Fukushima, K., Kanemoto, H., Goto, Y., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. GeneScanning analysis of antigen receptor gene rearrangement in the intestinal endoscopic biopsy specimens and its application to the diagnosis of small cell lymphoma in dogs. The Asian Meeting of Animal Medicine Specialties (AMAMS) 2013, 2013年12月14日, ボゴール, インドネシア

Tomiyasu, H., Goto-Koshino, Y., Fujino, Y., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Modulation of the expression of *ABCB1* and *LRP* genes by perifosine in canine lymphoma cell lines.

Veterinary Cancer Society (VCS) Annual Meeting 2013, 2013年10月19日, ミネアポリス, 米国

藤原亜紀、水谷格之、五十嵐寛高、後藤裕子、高橋雅、藤野泰人、大野耕一、佐々木典康、辻本元: 犬リンパ腫症例において発現変動を示す血清中microRNAの同定、第9回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2013年2月23日、横浜

富安博隆、後藤裕子、藤野泰人、大野耕一、辻本元: 犬のリンパ系腫瘍細胞株における*ABCB1*遺伝子のDNAメチル化およびヒストンアセチル化による発現制御に関する検討、第9回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2013年2月23日、横浜

富安博隆、後藤裕子、藤野泰人、大野耕一、辻本元: 犬の多中心型高悪性度リンパ腫症例における*ABCB1*遺伝子のDNAメチル化状態の解析、第9回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2013年2月23日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻本元 (TSUJIMOTO, Hajime)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 60163804

(2) 連携研究者

塩田 邦郎 (SHIOTA, Kunio)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 80196352