

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790682

研究課題名(和文) 消化器がんにおける TET1 の機能解析～治療標的の可能性の探求～

研究課題名(英文) Contribution of TET1 to malignant characteristics in digestive cancer cells.

研究代表者

工藤 洋太郎 (Kudo, Yotaro)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：90608358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：DNAの脱メチル化反応がTET分子により触媒されることが近年明らかになったことを踏まえ、消化器がんにおけるDNA脱メチル化経路とTET分子の意義をあきらかとするべく研究を進めてきた。ヒドロキシメチル化シトシンはTETにより合成される脱メチル化反応の中間体であるが、様々な臓器の腫瘍において低下していることを見出して成果は論文にて発表した。この知見はゲノム上の脱メチル化状態の変化と腫瘍発生との関連を示唆するものである。次にTET1ノックダウンがん細胞株を用いて表現型解析、網羅的遺伝子発現解析、ゲノムワイドなメチル化解析をおこない、TET1の標的遺伝子を同定し、成果は現在論文作成中である。

研究成果の概要(英文)：Ten-Eleven-Translocation (TET) proteins mediate the conversion from 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC), which is an intermediate of DNA demethylation. We aim to elucidate whether TET-mediated DNA demethylation is involved in biological properties in solid cancers. We have reported a loss of global 5-hmC level in a broad spectrum of human tumors. These findings suggest critical roles of abnormal DNA demethylation for oncogenic processes in solid tissues. Next, we focus on the role of TET1 protein in cancers, especially gastrointestinal and hepatic cancers. We found that TET1-depletion suppressed cell proliferation in various cell lines, and gene expression array analysis was carried out to validate responsible genes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化異常とそれに付随する遺伝子発現異常はがんにおけるエピジェネティックな特徴のひとつである。DNA のメチル化反応を触媒する DNA メチル基転移酵素群 (DNMTs) の発現増加は種々のがんで報告され、さらには近年 *DNMT3A* 遺伝子の体細胞変異が急性骨髄性白血病で報告された (Ley TJ. *N Engl J Med.* 2010)。このように DNA のメチル化異常とがんとの関わりが研究されてきた一方で、哺乳細胞において脱メチル化を司るタンパクが同定されなかったこともあり、DNA の脱メチル化機構とがんとの関わりについては長い間研究の進展が見られていなかった。

ところが、近年、メチル化シトシン (mC) をヒドロキシメチル化シトシン (hmC) に変換する TET タンパク群 (TET1~3) が見付き (Tahiliani M. *Science* 2009, Ito S. *Nature* 2010)、さらに hmC が mC からシトシン (C) への脱メチル化反応の中間体であることも示された (Ito S. *Science* 2011, He YF. *Science* 2011) ことから、DNA の脱メチル化機構の生物学的意義が注目を集めている。

hmC が ES 細胞や神経細胞のゲノム DNA に比較的豊富に存在することもあり、TET と hmC の意義については、ES 細胞の多分化能や自己複製能維持における役割の報告が相次ぐ一方で (Ficz G. *Nature* 2011, Ito S. *Nature* 2010)、がんにおける TET と hmC の意義については血液腫瘍を除くとほとんど報告がない。

血液腫瘍では *TET2* 遺伝子の活性低下型変異とゲノム DNA 中の hmC の低下が報告され (Delhommeau F. *N Engl J Med.* 2009, Ko M. *Nature* 2010)、*TET2* 欠損による血液細胞の形質転換が報告されたが (Moran-Crusio K. *Cancer Cell* 2011)、固形腫瘍では TET の発現異常および hmC 量に関する報告がなかった。

2. 研究の目的

消化器がんを中心とした固形腫瘍における TET と hmC の意義について解明する。

3. 研究の方法

(1) 抗 hmC 抗体を用いた免疫組織学的検討およびドットプロット解析法により臨床がん組織の hmC 量を測定し、正常組織と比較する。

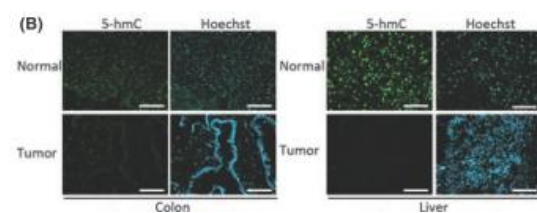
(2) TET1 の消化器がんにおける意義を検討するために、TET1 ノックダウンがん細胞株を樹立し、その表現型を調べる。

(3) TET1 ノックダウンがん細胞をサンプルとして、網羅的遺伝子発現アレイ解析ならびに (H)MeDIP-sequencing 解析をおこない、TET1 ノックダウンによる影響を網羅的に評価する。上記結果から絞り込んだ TET1 の標的候補遺伝子については、TET1 抗体をもちいたクロマチン免疫沈降法により TET1 の直接的な標的遺伝子かどうか検討する。

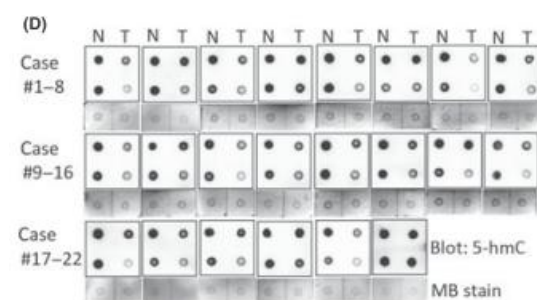
(4) 以上培養細胞で得られた知見をもとに、臨床データを見直し、TET1 の発現量による症例の層別化、あるいは治療への可能性について考察を加える。

4. 研究成果

(1) ヒトの様々な臓器由来の固形腫瘍組織において正常組織と比較して hmC 量は明らかに低下していた。



ドットプロット法により胃がんおよび大腸がんの多数例で解析をおこなったところ、いずれも 70%超の症例で hmC は低下していた。



がん遺伝子導入により悪性形質転換した線維芽細胞においても同様に hmC は形質転換前よりも低下しており、がんにおける hmC 低下が非常に普遍性の高い事象であることがわかった。

(2) 次に TET1 のがんにおける意義を検討するために消化器がん細胞株において TET1 遺伝子のノックダウン(KD)実験をおこなった。TET1-KD 細胞は増殖速度が低下していた。KD による遺伝子発現への影響を検討するために発現マイクロアレイ解析をおこない、同時にゲノムワイドな DNA のメチル化状態の変化を照合するために、(ヒドロキシ)メチル化 DNA 免疫沈降シーケンシング解析をおこなった。KD により発現が変化する遺伝子群が存在し、一部は DNA のメチル化が変化していることがわかった。TET1 の標的遺伝子候補と考えられる遺伝子に対しては、TET1 分子に対する抗体をもちいたクロマチン免疫沈降法をもちいて TET1 分子が結合していることが確認できた。

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)

(1) Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Science*. 査読有, 103 巻, 2012, p670-676, DOI:

10.1111/j.1349-7006.2012.02213.x.

[学会発表] (計 5 件)

(1) 工藤洋太郎、立石敬介、山本恵介、山本信三、浅岡良成、伊地知秀明、永江玄太、油谷浩幸、小池和彦. 悪性形質転換におけるヒドロキシメチル化シトシンの低下. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2012 年 5 月 14-15 日. 学術総合センター, 東京

(2) Yotaro Kudo, Keisuke Tateishi, Yoshinari Asaoka, Hideaki Ijichi, Genta Nagae, Hiroyuki Aburatani, Kazuhiko Koike. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. 第 71 回日本癌学会学術総会. 2012 年 9 月 19-21 日. ニューオータニイン札幌, 札幌

(3) 工藤洋太郎、立石敬介、山本恵介、山本信三、浅岡良成、伊地知秀明、池上恒雄、白井聖一、永江玄太、吉田晴彦、油谷浩幸、小池和彦. 消化器がんにおけるヒドロキシメチル化シトシンおよび DNA 脱メチル化酵素 TET1 の役割の検討. 第 20 回浜名湖シンポジウム. 2012 年 12 月 22-23 日. アクトシティ浜松コンgresセンター, 浜松

(4) 工藤洋太郎、立石敬介、山本恵介、山本信三、浅岡良成、伊地知秀明、池上恒雄、白井聖一、永江玄太、吉田晴彦、油谷浩幸、小池和彦. 悪性形質転換における DNA 脱メチル化反応中間体ヒドロキシメチル化シトシンの検討. 第 50 回日本臨床分子医学会学術総会. 2013 年 4 月 12-13 日. 東京国際フォーラム, 東京

(5) Yotaro Kudo, Keisuke Tateishi, Tsuneo Ikenoue, Keisuke Yamamoto, Shinzo Yamamoto, Yoshinari Asaoka, Hideaki Ijichi, Genta Nagae, Masato Yonezawa, Motoaki Seki, Kiyokazu Shirai, Haruhiko Yoshida, Hiroyuki Aburatani, Kazuhiko Koike. Contribution of TET1 to malignant characteristics in digestive cancer cells. *Cell Symposia: Cancer Epigenomics*. 2013 年 10 月 6-8 日. Sitges, Spain

[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：
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

工藤 洋太郎 (KUDO, Yotaro)

東京大学医学部附属病院

研究者番号：90608358