

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430139

研究課題名(和文) 高栄養摂取による肥満環境がDNAメチル化などのエピゲノム変動にもたらす影響の解析

研究課題名(英文) Analyses of epigenomic variation such as DNA methylation due to obesity conditions by high nutrient intake.

研究代表者

藤井 元 (FUJII, GEN)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：90321877

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)：がんは遺伝子の病気であると共に環境からの強い影響をうけて起こる疾患である。近年肥満状態は穏やかな慢性炎症というべき環境を形成しており、そこからがんが発生してくる機序が注目されている。そこで本研究では、高栄養培地での培養を行った培養細胞や、高栄養摂取により肥満状態にしたマウスで、DNAメチル化などのエピゲノム変化が発がん過程を説明する様な頻度で起こりうるかの検証を行った。その結果、培養細胞レベルの実験で高糖質培地/高脂質培地での長期間培養により、その栄養条件によってDNAメチル化状態に変化が起きることを明らかにした。動物個体レベルでも同様の実験と測定を現在も継続して行っている。

研究成果の概要(英文)：Cancer is a disease of genes, and also is a disease strongly influenced from the environment. In recent years, obesity has formed an environment called mild chronic inflammation, and the mechanism by which cancer develops from it has drawn attention. Therefore, in this study, we verified high nutrient intake in cultured cells or in mice brought into obesity conditions can evoke epigenomic changes such as DNA methylation occur at such frequencies as to explain the carcinogenic processes. As a result, it was revealed that the DNA methylation state could be changed depending on the nutrient condition by long-term cultivation in the sugar-rich medium / lipid-rich medium in the experiment on the cultured cell level. We continue to conduct similar experiments and measurements also at the animal individual level.

研究分野：発がん予防

キーワード：遺伝子環境交互作用 肥満 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

発がんの一義的原因は遺伝子の変異であるが、その変異を引き起こす基盤は遺伝的要因より環境からの影響が大きい事が報告されている (Harvard Report on Cancer Prevention, 1996) 発がんの環境要因として最大のもはタバコである事は広報活動などによっても充分認識されていると言えるが、次に大きな原因が食物であることは、実はまだ一般市民に充分周知ではない。大腸がんや乳がんといったいくつかのがん種において最も重要なものは、食物の種類よりも、過食/飽食といった高栄養摂取からくる肥満であることが我々の研究グループを含めた複数の研究室から報告されている。

肥満は心疾患や循環器疾患のリスク要因として認識され、近年メタボリック症候群として検診における大きな注意対象とされており、その症状から全身が慢性炎症類似の環境におかれている状態と考える事が出来る。特定部位における、この緩やかな慢性炎症状態の持続こそが発がんの原因として、近年着目されている。

一方、親の栄養状態や胎児期/乳児期の栄養状態が、生体になってからの疾患や生理状態に影響を及ぼす事がかなり以前から疫学的調査や観察研究として報告されていた。栄養状態などがその時点での遺伝子発現変化を引き起こすのではなく、時間的経過を経た後の遺伝子発現に影響を及ぼすには、塩基配列レベルではない場合、別のメカニズムに依ってこの情報の維持/伝達が行われる必要が有るが、根本的原因は不明であった。近年エピゲノム研究が進むにつれて、このような事象はおそらくエピゲノム機構に依存した事象であろう、と考えられる様になっている。

しかしこれまでそれぞれの現象を演繹的にむすびつける報告はあっても、実験的に栄養環境情報が直接的にエピゲノムレベルの変動を引き起こす、という報告は行われていない。

そこで当研究計画では、実験的に高栄養状態(個体レベルでは高栄養摂取による肥満、細胞レベルでは高栄養培地での培養)を設定し、その環境変異が実際エピゲノム変化を引き起こしうるのか、そしてそれは時間経過の中では遺伝的変異を引き起こせるレベルの変動と解釈しうるのか、を高精度に検討することを主眼に計画した。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで遺伝子と環境の相互作用に関する研究を一貫して行ってきた。その中で環境要因が遺伝子発現変動に大きな影響を与える事を見いだしてきたが、発現

変動を時間軸の中で固定化させる機構については変化難度が高くなる遺伝子構造の一次の変異より、やはり比較的フレキシブルなエピゲノム機構が適当であると判断し、研究の軸足をその方面に延ばしてきた。

研究代表者ががん予防研究に取り組み始め、特に高栄養摂取からの肥満といった慢性炎症類似状態がこのメカニズムの検証に最適なものであるとの考えに至ったことから、本研究課題を立案した。研究代表者が所属する研究グループは肥満を始めとした高栄養状態からの発がん、およびその予防を長期間にわたり詳細に解析してきており、ノウハウや研究支援の観点からまさに今研究計画を行うのに最適の環境が整っていた為である。

そこで研究期間内の目標は<高栄養摂取といった環境要因は、エピゲノム変化を引き起こせるか、否か?>という、ある意味単純かつ明白な主題を設定した。発がんという事象において、環境要因がどのように実際の発がんメカニズムに寄与しうるかを説明するメカニズムは、ある意味環境と遺伝子という発がんにおける二大要因を結ぶミッシングリンクであった。もちろんその媒介としてエピゲノム機構の介入を想定している研究者は多数いたが、実際にそれを実験レベルで明らかにしたものは少なく、中でもタバコ喫煙が減少している現代、次の最大のターゲットというべき高栄養摂取からの肥満という要素からの検証実験は重要性が高いにも関わらず、殆ど存在していない。そこでこの大きな課題を、比較的簡便な系を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究は培養細胞、及び実験動物個体を高栄養状態下(細胞レベルでは高栄養培地を用いた培養、個体レベルでは高栄養摂取による人為的肥満)に長期間置き、その環境変異が実際のエピゲノム変化を引き起こしうるのか、そしてその変化は発がんを含めた遺伝的変異類似の現象を引き起こせるレベルの変動であると解釈しうるのか、を高精度に検討するというものである。

研究遂行上最も困難であると推測された<遺伝的変異類似の現象を引き起こせるレベルのエピゲノム変動の精密な測定>に関しては、比較的高精度測定を行える目処が出来ていた、というのも、DNA修飾レベルでの主な解析対象であるDNAメチル化に関して、従来手法を改良した精密な解析定量法を既に開発しており、実験対象となるサンプルさえ準備出来ればすぐに計測可能な段階に達していたためである(2013年第20回がん予防学会にて発表済み)。さらにDNAレベルのエピゲノム修飾の前段階として機能している可能性が高いヒストン修飾レベルの

測定もヒストン修飾特異的抗体を用いての定量的解析が可能であり、必要に応じて ChIP-on-Chip といった遺伝子領域全体に渡る解析も可能であった。

そこで具体的には以下の様な手法を用いての研究を行った：

高栄養状態（細胞レベルでは高栄養培地での培養、個体レベルでは高栄養摂取による肥満）におかれた標品でのエピゲノム変化を、対象正常標品と比較、遺伝子全領域での変動を捉える事を主眼において実験を行う。

1) 独自に改良した測定法に基づく遺伝子全体に起こる DNA メチル化レベルの定量測定

2) 修飾種特異的な抗体を利用した遺伝子全領域でのヒストン修飾の定量測定

である。これにより高栄養という環境変異が誘引するゲノム全体でのエピゲノム変動スペクトラムの確認を行う事が出来る。必要に応じて遺伝子座特異的な変化（DNA メチル化に関してはメチル化特異的 PCR を、ヒストン修飾に関してはクロマチン共沈法からの DNA チップ解析（ChIP-on-Chip 法）を利用した。

4. 研究成果

研究はまず比較的短時間で予備的結果を得られると考えられた培養細胞レベルの実験から開始した。しかし研究遂行上幾つか困難な事が生じ、当初想定していた研究計通りには進まなかった点も多かった。例えばまず、栄養条件の異なる培地（高栄養培地）で細胞培養を行った時に、対照標品である低栄養状態培養条件下での培養において細胞が上手く増殖を行えなかった。更に高栄養条件下での培養では細胞老化が頻繁に起こり、長期間の細胞培養が困難である、といったトラブルも続発した。最終的には細胞が無事増殖できる様な最低/至適培養栄養条件の微細な条件検討を行い、低栄養培地や高栄養培地の成分などに関しても細かく調整を行って、その後主に DNA メチル化レベルの高精度の測定を行った。

具体的には、糖質（主としてグルコースを利用）や脂質といった栄養素成分濃度が異なる種々の培地で、大腸がん由来の培養細胞や初代培養細胞に比較的近いと考えられる培養細胞などを数ヶ月以上長期間培養し、数世代毎にサンプリングして、その全体的 DNA メチル化レベルに関して独自に工夫した高精度 DNA メチル化定量法にて経時的な測定を行った。

その結果、高栄養条件培地での培養下では DNA メチル化が継代時間に応じて漸次低減すること、そしてその低減パターンは栄養素の種類（高糖や高脂質）の組み合わせによって異なってくる事を見出した。また栄養条件の異なった環境で長時間培養を行った細胞におけるクロマチンレベルでのエピゲノム

変化測定（細胞標品蛋白試料の核画分に対し、各種ヒストン修飾特異的抗体を用いたウェスタンブロットングを行って、該当ヒストン蛋白種の定量を行うことに加えて、同じく各種ヒストン修飾特異的抗体を用いての免疫沈降産物の定量、もしくはクロマチン沈降を用いた DNA からの間接定量など）も予定していたが、鍵となるアミノ酸残基修飾特異的ヒストン抗体が海外輸入品で欠品しており、そのため本国での再生産と輸入を研究期間内待機せざるを得なかった。修飾特異的ヒストン抗体も、研究最終年度ようやく輸入されて入手出来たので、こちらのクロマチンレベルでのエピゲノム解析に関しては今後継続して行っていく事を予定している。

このように上記細胞レベルの試験が予想以上に時間がかかったため、個体レベルでの検証も並行して行った。

個体レベルの実験は、栄養状態が異なる給餌条件下でマウスを長期飼育し、実験個体の栄養状態とエピゲノム変化の相関の解析を目指した実験プランである。具体的には標準的マウス（B6 や Bulb）に加え、肥満マウス（KK マウスや KK-Ay マウス）に、普通食、もしくは高栄養食（高脂肪食）を給餌し、その後経時的に屠殺、高栄養の影響が大きそうな臓器や肥満関連がんの標的臓器となっている各種の臓器や対象となりそうな臓器（肝臓/筋肉/消化管/乳腺/脳/生殖腺など）を摘出/冷凍保存後、DNA もしくは蛋白の粗精製を行う。そして各臓器からのサンプルにおいて、DNA 修飾レベル（主に DNA メチル化レベル）・ヒストン修飾レベルの定量解析を行い、各修飾レベルの変動を栄養状態と相関させて精度良く測定することを予定していた。研究期間内では、標準的マウス（B6 系）に培養細胞と同じく栄養状態が異なる給餌（高糖餌、または高脂肪餌条件下）を行う実験を施行した。特殊な餌の入手と、個体条件に差異が確認出来る迄の飼育時間が予想より長く成ったため、飼育とサンプル採取を行った時点で研究期間が終了してしまっただが、こちらも今後継続して栄養状態とエピゲノム変化の相関について測定することを予定している。

細胞レベル/個体レベルのエピゲノム変化に関する実験的な解析に加え、1) 運動介試験サンプルでのエピゲノム変動、2) 個別の遺伝子座におけるエピゲノム変動の解析、を行う事も予定していたが、実験全体のプランの遅れから全ては履行出来なかった。ただ運動介試験サンプルでのエピゲノム変動解析に関しては DNA メチル化レベルの測定を行い、培養細胞、及び個体でのプレリミナリーなデータに反しない結果を得る事に成功している。

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 9 件)

Hamoya T, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Totsuka Y, Wakabayashi K, Toshima J, Mutoh M.
Effects of NSAIDs on the risk factors of colorectal cancer: a mini review.
Genes Environ. 2016 Apr 1;38:6 査読有り doi: 10.1186/s41021-016-0033-0.

Ishikawa H, Mutoh M, Iwama T, Suzuki S, Abe T, Takeuchi Y, Nakamura T, Ezoe Y, Fujii G, Wakabayashi K, Nakajima T, Sakai T.
Endoscopic management of familial adenomatous polyposis in patients refusing colectomy.
Endoscopy. 2016 Jan;48(1):51-5. 査読有り doi: 10.1055/s-0034-1392774.

Onuma W, Tomono S, Miyamoto S, Fujii G, Hamoya T, Fujimoto K, Miyoshi N, Fukai F, Wakabayashi K, Mutoh M.
Irsogladine maleate, a gastric mucosal protectant, suppresses intestinal polyp development in Apc-mutant mice.
Oncotarget. 2016 Feb 23;7(8):8640-52. 査読有り doi: 10.18632/oncotarget.7082.

Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M.
Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-A(y) and Apc mutant Min mice.
Cancer Sci. 2015 Nov;106(11):1499-505. 査読有り doi: 10.1111/cas.12801.

Fujimoto K, Fujii G, Taguchi K, Yasuda K, Matsuo Y, Hashiyama A, Mutoh M, Tanaka H, Wada M.
Involvement of trefoil factor family 2 in the enlargement of intestinal tumors in Apc(Min/+) mice.
Biochem Biophys Res Commun. 2015 Aug 7;463(4):859-63. 査読有り doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.025.

Shimizu S, Miyamoto S, Fujii G, Nakanishi R, Onuma W, Ozaki Y, Fujimoto K, Yano T, Mutoh M.
Suppression of intestinal carcinogenesis in Apc-mutant mice by limonin.
J Clin Biochem Nutr. 2015 Jul;57(1):39-43.

査読有り doi: 10.3164/jcfn.15-28.

Shimizu S, Ishigamori R, Fujii G, Takahashi M, Onuma W, Terasaki M, Yano T, Mutoh M.
Involvement of NADPH oxidases in suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activities by sesamol.
J Clin Biochem Nutr. 2015 Mar;56(2):118-22. 査読有り doi: 10.3164/jcfn.14-89.

Fujimoto K, Fujii G, Sakurai H, Yoshitome H, Mutoh M, Wada M.
Intestinal Peyer's patches prevent tumorigenesis in Apc (Min/+) mice.
J Clin Biochem Nutr. 2015 Jan;56(1):43-8. 査読有り doi: 10.3164/jcfn.14-115.

Shimizu S, Fujii G, Takahashi M, Nakanishi R, Komiya M, Shimura M, Noma N, Onuma W, Terasaki M, Yano T, Mutoh M.
Sesamol suppresses cyclooxygenase-2 transcriptional activity in colon cancer cells and modifies intestinal polyp development in Apc (Min/+) mice.
J Clin Biochem Nutr. 2014 Mar;54(2):95-101. 査読有り doi: 10.3164/jcfn.13-91.

〔学会発表〕(計 25 件)

今井俊夫、藤井 元、武藤倫弘、高橋真美。
高脂肪食による発育期ラット乳腺における平面極性関連遺伝子のメチル化異常。がん予防学術大会 2016 名古屋、名古屋大学 (2016 年 7 月 1-2 日)

Mami Takahashi, Rikako Ishigamori, Michihiro Mutoh, Gen Fujii, Shinngo Miyamoto, Takuji Tanaka, Tishio Imai, Increase of pancreatic cancer development in pancreas-specific K-ras mutant mice by mating with obesity A^y mice and involvement of M-CSF. Tenth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, Feb. 16-20, 2016. Maui, Hawaii, USA

藤本京子、藤井元、桜井瞳、吉留弘子、小宮 雅美、和田守、武藤倫弘。パイエル板数の増加が腸管腫瘍発生数の減少をもたらす。第 32 回発癌病理研究会、長野 (2016 年 8 月 23-25 日)

武藤倫弘、藤井 元、宮本真吾、高山哲治。分子推論により得られる新規がん化学予防剤の候補。第 75 回日本癌学会総会、横浜 (2016 年 10 月 6-8 日)

今井俊夫、打屋 尚章、藤井 元、武藤倫弘、高橋真美。ラット若齢乳腺に対する高脂肪食の影響と発がん促進。第 61 回日本実験動物学会 2014 札幌、札幌コンベンションセンター（2014 年 5 月 14-17 日）

* 他 20 回分に関しては詳細省略

〔図書〕(計 0 件)

無し

〔産業財産権〕

特に無し

〔その他〕

研究内容等を一部総説等で紹介

例：武藤倫弘、宮本真吾、鱧屋隆博、田村秀哉、藤井 元
大腸がんの化学予防
臨床消化器内科、2017

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤井 元 (FUJII, Gen)
国立がん研究センター・研究所
発がん予防研究分野 (RI 実験施設)
主任研究員
研究者番号 : 9 0 3 2 1 8 7 7

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

特に無し