

「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 24 年度採択研究代表者

H24 年度
実績報告

金田 篤志

東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野・特任准教授

エピゲノム変異誘導に対する調整因子・抵抗因子の同定

§1. 研究実施体制

(1)「金田」グループ

① 研究代表者: 金田 篤志 (東京大学先端科学技術研究センター、特任准教授)

② 研究項目

- ・生理的エピゲノム変化の調整因子の同定
網羅的発現解析、エピゲノム解析、調整因子候補の同定
調整因子候補の局在解析、情報解析、機能解析
- ・異常エピゲノム変異における調整因子・抵抗因子の同定
感受性・抵抗性細胞の同定
網羅的発現・エピゲノム解析、調整因子・抵抗因子候補の同定
調整因子・抵抗因子候補の局在解析、情報解析、機能解析

(2)「深山」グループ

① 主たる共同研究者: 深山 正久 (東京大学医学系研究科、教授)

② 研究項目

- ・異常エピゲノム変異における調整因子・抵抗因子の同定
不死化正常細胞サブクローンの樹立
臨床標本の採取・検証
調整因子・抵抗因子の機能解析、発癌機構解析

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

1. 研究の目標・ねらい

エピゲノム変化を正しく誘導する調整因子、またはエピゲノム異常の誘導に対抗する抵抗因子は、生体のエピゲノム制御に重要な役割を果たし、これら因子の破綻は疾患リスクにつながる重大な分子機構と考えるが、特に抵抗因子についてはこれまでほとんど解明されていない。

本研究はエピゲノム変異を2つの *in vitro* モデルで誘導し解析する。1つは正常細胞が癌化を防御するために生理的にヒストン修飾をダイナミックに変化させ不可逆な増殖停止を起こす早期細胞老化において、エピゲノム変化の調整因子を同定する。1つは正常細胞を癌化させる異常エピゲノム変異誘導において正常細胞が持つ抵抗因子を同定する。

2. これまでの研究概要

分子標的薬など個別化医療の開発が進む中で近年の網羅的ゲノム解析技術の進展はめざましく、網羅的ゲノム解析による症例の層別化がグリオーマ (Noushmehr et al. & TCGA, *Cancer Cell* 2010)、卵巣癌 (TCGA, *Nature* 2011)などで報告されている。グリオーマ解析では *IDH1* 変異陽性と相関する G-CIMP と呼ばれる高メチル化群が同定され、*IDH1* 変異は 2-hydroxyglutarate が蓄積することでヒストン H3K9 脱メチル化酵素 KDM4C を阻害し、DNA メチル化に先行する H3K9 メチル化上昇の原因であるとされる (Lu et al, *Nature* 2012; Turcan et al, *Nature* 2012)。胃癌エクソーム解析では、SWI/SNF 因子である ARID1A 不活化がマイクロサテライト不安定胃癌および EB ウィルス陽性胃癌で報告されている (Wang et al, *Nat Genet* 2011)。

申請者らは網羅的 DNA メチル化解析による症例層別化研究を行い、EB ウィルス陽性胃癌が DNA 超高メチル化群を構成し、EB ウィルス *in vitro* 感染により、(i)短期間 (18 週以内) に、(ii)広範囲に、(iii)高再現性で、(iv)高密度に、(v)生理的に、異常 DNA メチル化を誘導できことを証明した (図 1)。

申請者らはまた大腸癌の網羅的解析で癌遺伝子変異と相関する 3 群のエピジェノタイプを同定したことから、癌遺伝子変異による早期細胞老化機構がエピゲノム異常により破綻している発癌機構を考え、次に早期細胞老化機構の解析を行った。マウス線維芽細胞において癌遺伝子を活性化させると、DNA メチル化変化は全く起きず、ヒストン修飾がダイナミックに変化することで分泌蛋白環境を変化させ増殖停止に重要なシグナルを活性化させた (図 2)。つまり癌化を防ぐため細胞が生理的にヒストン修飾変化をしていた。

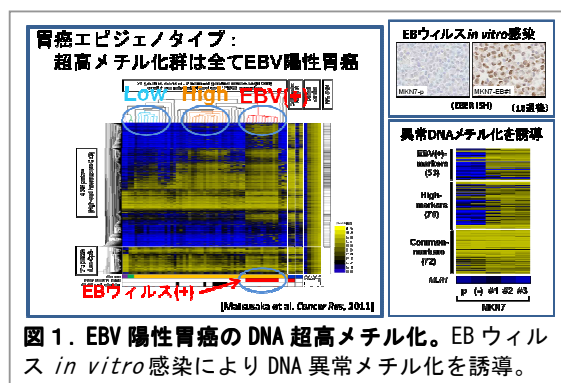


図 1. EBV 陽性胃癌の DNA 超高メチル化。EB ウィルス *in vitro* 感染により DNA 異常メチル化を誘導。

3. 研究進捗状況

(A) 生理的エピゲノム変化の調整因子

マウス線維芽細胞・ヒト線維芽細胞を用い、Ras/Raf誘導性細胞老化を誘導し発現アレイによる網羅的発現解析およびヒストン修飾に対するChIP-seqによりエピゲノム変化解析を行った。それらの情報から細胞老化に重要なエピゲノム変化をさせる候補因子を抽出し、これ

まで候補因子の1つが、ChIP-seq法にて発現上昇遺伝子の5'領域に結合することを確認している。また、候補因子を補完的に同定する目的でshRNAライブラリーを用いた網羅的な遺伝子ノックダウンによるスクリーニングを行い、ヒストンメチル化酵素2個を含む候補因子群を抽出している。

(B) 異常エピゲノム変異の抵抗因子

不死化正常胃粘膜上皮細胞へのEBウィルス感染および異常メチル化誘導に成功した。DNAメチル化誘導感受性細胞と、DNA異常メチル化が全く誘導されない抵抗性細胞の樹立に成功、今後その数を増やす。SWI/SNF因子ARID1AがEBウィルス陽性胃癌において有意に不活化していることを免疫染色により確認したが¹⁾、ARID1Aを含め今後感受性細胞と抵抗性細胞を網羅的比較解析してメチル化誘導の抵抗因子候補を抽出する。EBウィルスは、NIH3T3細胞を形質転換したLMP2A²⁾をコードするなどその癌化機構の解明は複雑であるが、メチル化抵抗因子の不活化による異常メチル化の獲得とそれによる癌化機構を解明する。胃癌・非胃癌患者標本について、250切片の試験的スクリーニングを進行し、EBER-ISHによるEBウィルス感染の有無を解析し、またEBER-ISH後に判明する感染腺管の連続切片を採取・マイクロダイセクションする技術・方法的検証を行っている。

4. 研究の今後見通しと将来展望

生理的エピゲノム変化の調整因子、エピゲノム異常誘導への抵抗因子の同定は、生体のエピゲノムによるロバストネス維持機構の理解に重要な知見をもたらすと考える。早期細胞老化の系においては、引き続き候補因子のスクリーニングを進行し、候補因子の局在解析やノックダウンなど検証を進め細胞がどのような因子により生理的にエピゲノム変化を行うことによって自ら細胞老化し癌化に至るか解明し、その因子の破綻と癌化リスクの上昇について解明する。DNA異常メチル化誘導の系では感受性細胞と抵抗性細胞にDNA異常メチル化誘導し、時系列的に発現解析・DNAメチル比解析を行い、抵抗因子候補を同定する。抵抗因子不活化はエピゲノム異常の誘因に出会わなければ致命的な異常とはならないため疾患の高リスク要因として細胞に潜伏していると考えられ、これを新たな疾患リスクとして同定する。

