

「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

H25 年度
実績報告

金田 篤志

千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍学
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

- ・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. 研究実施の概要

本研究はエピゲノム変異を2つのモデルで解析します。1つは正常細胞が癌遺伝子活性化に際し生理的にエピゲノム変化し細胞増殖を停止する早期細胞老化のモデルです。この研究によりエピゲノム変化の調整機構や癌遺伝子変異(+)¹癌の発癌機構を理解します。1つはウイルス感染がエピゲノム異常を誘導するモデルで、外的因子のエピゲノム変異誘導による発癌機構を理解します。

・癌遺伝子活性化による早期細胞老化モデルと癌遺伝子変異(+)¹発癌

これまで大腸進行癌で、癌遺伝子 **RAF** 変異(+)¹症例は高メチル化、**RAS** 変異(+)¹症例は中メチル化、など独特のエピゲノム異常が存在することを同定していますが、他に **RAF** や **RAS** の変異が多い甲状腺乳頭癌でも、変異(+)¹症例は高頻度の DNA メチル化異常を認めました⁽¹⁾。

大腸癌では、平坦に広がった **LST** と呼ばれる早期病変を解析しました。**RAS** 変異(+)¹症例は中メチル化を示し、顆粒状の肉眼形態でした。**RAS** 変異(-)¹症例は低メチル化を示し、高頻度に **CTNNB1** 蓄積が陽性で、無顆粒状の肉眼形態でした⁽²⁾。**RAF** 変異および高メチル化は鋸歯状腺腫と呼ばれる早期病変の特徴です。**RAF** 変異(+)¹、**RAS** 変異(+)¹、変異(-)¹症例は、癌化のために随伴する異常が異なり、全く異なる発癌経路で癌化することを示唆しました。

これは **RAF** 変異、**RAS** 変異の早期細胞老化機構が異なり、破綻して癌化の原因となる因子が異なる可能性を示唆します。細胞老化のモデルを用いて発現変化解析、及び **shRNA** ライブラリーを用いた網羅的ノックダウンを行い、細胞老化に必須であり、不活化により細胞老化を回避させる遺伝子を探索しています。既知の細胞老化必須因子を含め候補因子が抽出されており、それら因子の機能を解析し、またその破綻による癌化を解析します。

・ウイルス感染による異常エピゲノム誘導モデルと **EB** ウィルス(+)¹胃癌

これまで我々は **EB** ウィルス陽性胃癌が独特な高メチル化状態を示し、実際に **EB** ウィルス感染により低メチル化胃癌細胞株にこの独特な高メチル化状態を誘導することに成功してきました。低メチル化胃癌細胞株だけでなく正常胃粘膜上皮細胞を不死化した細胞にも **EB** ウィルスを感染させ、やはり同様に DNA 高メチル化が誘導されることを時系列的に明らかにしています。現在、このメチル化誘導が起きる細胞と起きない細胞を樹立中であり、これらの比較解析を通して異常メチル化誘導の原因因子を探索します。

DNA メチル化誘導の原因として、**LMP2A** などのウィルス蛋白の発現が一部の遺伝子のメチル化異常を引き起こしうることをこれまで報告しています。そこでレトロウイルスベクターを用いて **LMP2A** を **NIH3T3** 細胞に発現導入しました。軟寒天培地でのコロニー形成の増加、ヌードマウス皮下注による腫瘍の増大、**Side Population(SP)**分画の増加が認められました(図 1)⁽³⁾。ウィルス蛋白発現による幹細胞性の亢進とエピゲノム変異誘導の関与について今後胃上皮細胞においても解析します。

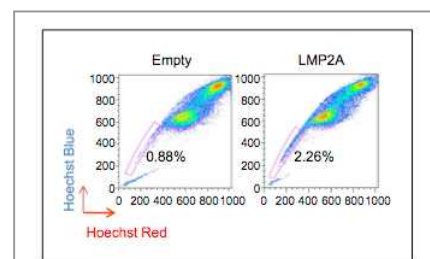


図 1. **LMP2A** 発現による **SP** 分画の増加

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

- 1 Kikuchi Y, Tsuji E, Yagi K, Matsusaka K, Tsuji S, Kurebayashi J, Ogawa T, Aburatani H, Kaneda A. Aberrantly methylated genes in human papillary thyroid cancer and their association with BRAF/RAS mutation. *Front Genet*, 4:271, 2013 (doi: 10.3389/fgene.2013.00271)
- 2 Sakai E, Ohata K, Chiba H, Matsushashi N, Doi N, Fukushima J, Endo H, Takahashi H, Tsuji S, Yagi K, Matsusaka K, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. Methylation epigenotypes and genetic features in colorectal laterally spreading tumors. *Int J Cancer*, 2014 Mar 3 epub ahead of print (doi: 10.1002/ijc.28814)
- 3 Nakaya T, Kikuchi Y, Kunita A, Ishikawa S, Matsusaka K, Hino R, Aburatani H, Fukayama M. Enrichment of stem-like cell population comprises transformation ability of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A for non-transformed cells. *Virus Res*. 174:108-15, 2013 (doi: 10.1016/j.virusres.2013.03.009)
- 4 Sato T, Kaneda A, Tsuji S, Isagawa T, Yamamoto S, Fujita T, Yamanaka R, Tanaka Y, Nukiwa T, Marquez VE, Ishikawa Y, Ichinose M, Aburatani H. PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer. *Sci Rep*, 3:1911, 2013 (doi: 10.1038/srep01911)