

## 論 文 要 旨

***MUC1* expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells**

〔 癌細胞において *MUC1* 遺伝子は DNA メチル化とヒストン H3 リジン 9 の修飾により制御されている 〕

山田 宗茂

## 【序論および目的】

我々は、これまで様々なヒト癌における一連のムチン抗原発現の研究において、癌の生物学的悪性度とムチン抗原の発現の関連性について詳細な分析を行ってきており、浸潤性膵管癌や腫瘍形成型胆管細胞癌における *MUC1* (膜結合ムチン) の発現が予後不良因子であることを見出した。*MUC1* 遺伝子プロモーター領域 (約 3,000bp) には、メチル化し得る数多くの CpG 部位が存在しているが、現在までに *MUC1* 遺伝子がエピジェネティックな制御機構により調節されているという報告はない。

本研究の目的は、*MUC1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化とヒストン修飾状態を検討することにより、*MUC1* 遺伝子の発現機構の解明に迫ることである。

## 【材料および方法】

膵臓癌、乳癌、大腸癌細胞株の中から、*MUC1* 陽性・陰性細胞株を選出し、*MUC1* 陰性細胞株に対しては、DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC) と、ヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害剤である Trichostatin A (TSA) を用いて処理を行い、*MUC1* mRNA の回復を RT-PCR により検討した。また、各々の細胞株に対する *MUC1* 遺伝子プロモーター全領域の DNA メチル化状態を、DNA メチル化定量解析システム MassARRAY<sup>®</sup> 「EpiTYPER<sup>™</sup>」を用いて検討した。具体的には、各細胞株から抽出した DNA に対してバイサルファイト処理を行い、アンチセンス側に T7 プロモーター配列を加えた *MUC1* 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR 増幅した。増幅した産物を RNA に In vitro 転写した後、酵素を用いてウラシルを特異的に切断した。これにより生じた DNA メチル化に依存した分子量の異なる断片の質量を、MALDI-TOF MS を用いて分析し、各々の細胞株における *MUC1* 遺伝子プロモーター領域の定量的 DNA メチル化解析を行った。

また、*MUC1* 陽性・陰性細胞株において DNA メチル化状態に有意な差がある領域をターゲットにして、Methylation Specific PCR (MSP) 用のプライマーを作製し、*MUC1* 遺伝子プロモーター領域の中においてもさらに遺伝子発現に関与する可能性のある領域の同定を試みた。

次に、DNA のメチル化に加えて、ヒストンの修飾状態も重要なエピジェネティック要因の一つであることから、クロマチン免疫沈降法 : Chromatin immunoprecipitation

(ChIP) assays を用いて MUC1 プロモーター領域におけるヒストン修飾状態を検討した。具体的には、MSP で使用したプライマーとほぼ同じ領域に ChIP 用のプライマーを製し、抗ヒストン H3 リジン 9 (H3-K9)ジメチル化抗体、抗ヒストン H3-K9 アセチル化抗体を用いて、MUC1 遺伝子発現に関与する可能性のある領域のヒストン H3-K9 の修飾状態を確認した。

#### 【結果】

膵臓癌・乳癌・大腸癌細胞株の中から、MUC1 陽性 4 株・陰性 4 株を選出し、陰性 4 株に対して 5-azadC、TSA 処理を行った結果、5-azadC 及び 5azadC+TSA 処理において、MUC1 mRNA 量の大幅な回復が確認された。次に、全 8 種類の細胞株に対する MUC1 プロモーター領域の DNA メチル化状態を、DNA メチル化定量解析システム MassARRAY<sup>(R)</sup> 「EpiTYPER<sup>TM</sup>」を用いて検討した結果、転写開始付近における CpG のメチル化状態が MUC1 発現状態に相関していた。また、特に MUC1 発現状態に相関していた 4 箇所の CpG サイトにおいては、MSP により MassARRAY の結果と一致していることを確認した。更に、クロマチン免疫沈降法を用いた MUC1 プロモーターにおけるヒストン H3-K9 修飾状態の検討においても、MUC1 発現への関与が示唆される結果が得られた。

#### 【結論及び考察】

今回得られた結果により、転写開始付近における DNA メチル化とヒストン H3-K9 修飾の双方が、MUC1 発現制御に影響している可能性が明らかとなった。今後、ヒト癌細胞株で示された MUC1 遺伝子のエピジェネティックな制御機構が、生体の組織においても成り立っているのかを明らかにすることにより、発癌リスクや予後の予測への応用が期待される。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 55 号	学位申請者	山田 宗茂
審査委員	主査	小澤 政之	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	宮田 篤郎	副査 中川 昌之
	副査	古川 龍彦	副査 梅北 善久

*MUC1* expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells.

(癌細胞において *MUC1* 遺伝子は DNA メチル化とヒストン H3 リジン 9 の修飾により制御されている)

*MUC1* (膜結合型ムチン)は、乳腺や膵をはじめとする消化管などの正常上皮に発現しているが、癌化に伴い過剰発現を示すことが明らかになっている。現在までに学位申請者らは、ヒト癌における一連のムチン抗原発現の研究において、*MUC1* の発現が予後不良因子であることを見出してきた。*MUC1* の発現調節に関する報告は、Sp1 や GATA-3 などの転写因子によるものをはじめ多数あるが、*MUC1* プロモーター上 (約 3,000 bp) に数多くの CpG が存在しているにも関わらず、これまで *MUC1* がエピジェネティックな制御機構により調節されているという報告はなかった。そこで学位申請者らは、エピジェネティックな観点から *MUC1* の発現機構を解明することを目的として、*MUC1* 陽性・陰性細胞株 (計 8 細胞株) を用いて、*MUC1* プロモーター領域における DNA メチル化とヒストン修飾状態の検討を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

1. *MUC1* 陰性細胞株に対し、DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC)と、ヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害剤である Trichostatin A (TSA)を用いて処理を行った結果、5-azadC 及び 5azadC+TSA 処理において、*MUC1* mRNA 量の大幅な回復が確認された。
2. *MUC1* 陽性・陰性細胞株における *MUC1* プロモーター領域の DNA メチル化状態を、DNA メチル化定量解析システム MassARRAY<sup>(R)</sup> 「EpiTYPER<sup>TM</sup>」を用いて検討した結果、転写開始付近における CpG のメチル化状態が *MUC1* の発現状態に相関していた。
3. 特に *MUC1* の発現状態に相関していた 4 箇所の CpG サイトにおいては、Methylation Specific PCR (MSP) により MassARRAY の結果と一致していることを確認した。
4. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays を用いて *MUC1* プロモーター領域におけるヒストン修飾状態を検討した結果、転写開始付近におけるヒストン H3-K9 の修飾状態が、*MUC1* 発現状態と一致していた。

本研究は、ヒト癌細胞株における *MUC1* 発現制御に、*MUC1* 転写開始付近における DNA メチル化とヒストン H3-K9 修飾の双方が関与している可能性を初めて明らかにした。*MUC1* のエピジェネティックな変化を調べることにより、発癌リスクや予後を予測しうる可能性を示した点で興味深く、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 55 号	学位申請者	山田 宗茂
審査委員	主査	小澤 政之	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	宮田 篤郎	副査 中川 昌之
	副査	古川 龍彦	副査 梅北 善久

主査および副査の5名は、平成21年1月20日、学位申請者 山田 宗茂 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) DNA メチル化情報は遺伝的なものであるか、あるいは後生的なものであるか。

(回答) 哺乳類におけるゲノム DNA のメチル化状態は、受精から着床に至るまでの間に一度完全に脱メチル化し、領域特異的・時期特異的な新規 DNA メチル化パターンが確立される。基本的には DNA メチル化やヒストン化学修飾は後生的な情報であるが、ゲノムインプリンティングがおこる領域も存在する。

質問2) 今回の MUC1 遺伝子においては、約 3,000 bp のプロモーター領域内に 184 個の CpG サイトがあるが、CpG サイトの数としては多い方か。

(回答) MUC1 遺伝子プロモーター上には、GC 含有量が 50%以上で CpG サイトが高頻度にみられる CpG アイランドと呼ばれる領域が多数存在するので、一般的には多い方であると考えられる。

質問3) MUC1 低発現細胞株に対して、5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC)、Trichostatin A (TSA)処理を行った場合、一定の mRNA の回復がみられるものの、MUC1 高発現細胞株並みには回復してこないことの理由として考えられることは何か。

(回答) 5-azadC は、DNA 複製の際のメチル化維持機構を阻害し、TSA はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)を阻害する。薬剤処理を行った5日間において、各細胞株は2-3回しかダブリングしていないことが予想されることから、処理後においても DNA レベルではヘミメチル化状態であり、ヒストンレベルでもまだ多くがヘテロクロマチン様の修飾状態である可能性が高い。

質問4) MUC1 低発現大腸癌細胞株 LS174T をはじめ、5-azadC、又は TSA 処理において MUC1 mRNA が回復していない細胞については、そもそも薬剤自体が効いていないという可能性についてはどうか。

(回答) 5-azadC や TSA が効いていないことにより、MUC1 mRNA が回復してこない可能性も考えられる。薬剤処理後に mRNA が回復してこない場合、エピジェネティックに制御されていないのか、もしくは薬剤が効いていないのかの判断が困難であるため、今回の各細胞株における薬剤濃度設定においては、薬剤処理中の5日間細胞が生存できる濃度を採用した。特に今回 TSA のみの処理に関しては、処理した4細胞株中3細胞株において MUC1 mRNA の回復がみられなかった。原因は明らかではないが、エピジェネティックに制御されている他の遺伝子 *p16* に関しても、TSA のみでは mRNA の回復が見られないという報告がある (Kondo et al. : Mol Cell Biol; 23: 206-15, 2003)。

質問5) SNP は、現在 1 kb に少なくとも 1 つは存在すると考えられているが、今回 MUC1 遺伝子プロモーター領域の約 2.8 kb の分析を行って、7細胞株の間で、その配列が全て一致したことについてどう考えるか。

(回答) 今回シーケンシングを行った領域が、由来の異なる7細胞株間において約 2.8 kb 全ての配列が一致していた理由は明らかではないが、MUC1 遺伝子発現を制御する重要な領域であることも理由の一つとして考えられる。しかしながら、ムチンファミリーで同じ膜結合型の MUC4 遺伝子プロモーター領域約 3.0 kb に関しては、10細胞株間で多くの配列の違いを確認している。今回メチル化解析のために行った質量分析は、我々がシーケンシングした配列情報から算出した質量を基に実際の質量と比較して結果を出している。1塩基でも実際の配列と異なると結果が出ないことから、今回シーケンシングした配列は正しいと考えられる。

質問6) 質量分析において、バイサルファイト後の DNA を in vitro 転写し、RNase A を用いて U (ウラシル) 特異的に切断するとの説明に関して、RNase A は、実際には U と C (シトシン) を切断するはずであるが、どのようにして U のみを特異的に切断させているのか。

(回答) RNase A を用いて U のみを特異的に切断する場合、in vitro 転写を行う際に dCTP を用いる。そのことにより、C のみ DNA となる DNA/RNA モザイク構造で合成することが出来る。RNase A は dCMP の部位では切断することが出来ないことから、U のみが切断される。

質問 7) エピジェネティクスにより制御されている遺伝子全般において、遺伝子発現に関与する重要な領域というのはあるのか。

(回答) 一般的には、遺伝子転写開始点から上流の約 100 bp 内における DNA メチル化と、ヒストン修飾状態が特に重要とされている。

質問 8) MUC1 低発現大腸癌細胞株 Caco2 において、質量分析の結果、MUC1 遺伝子プロモーター上流-2.7 kb 付近においても高メチル化状態であるが、この領域における転写因子などによる発現制御の可能性はあるか。

(回答) MUC1 遺伝子の発現制御に GATA が関与しているという報告がある (Abba et al., Breast Cancer Res; 8: R64, 2006)。特に、今回 Caco2 でメチル化が確認された上流付近には、GATA3 をはじめとする GATA ファミリーの結合領域が 3 箇所存在している。GATA の結合領域に CpG サイトは含まれていないが、GATA 結合サイト付近の DNA がメチル化し、メチル化結合タンパク (MBP) により GATA の結合が阻害されている可能性も考えられる。Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays などを用いて、今後検討したい。

質問 9) 遺伝子プロモーター上において、転写因子が結合する配列を保持したままで、CpG サイトの C を別の塩基に変えた配列を作製して細胞に導入した場合、遺伝子発現状態がどのようになるのかという検討を行っているところはあるか。

(回答) 現時点においては、そのような検討を行っているという報告はない。

質問 10) MSP の結果において、U と M の両方のバンドが確認される細胞株もあるが、このことについてはどのように考えられるか。

(回答) プライマーがミスプライムしていることも考えられるが、細胞株であっても、個々の細胞において MSP により確認した 4 つの CpG サイトのメチル化状態の全てが異なっている可能性が高い。細胞株の継代を重ねることによって、メチル化状態が変化するという報告もある (Vincent et al., Oncogene; 26: 6566-76, 2007)。

質問 11) 今回、ヒストンの修飾状態は、ヒストン H3 リジン 9 について検討しているが、ヒストン H3 リジン 27 の修飾状態については確認したか。

(回答) 今回は検討していない。ヒストン H3 リジン 27 は、遺伝子発現に影響する重要な箇所であるため、今後その領域状態についても検討したい。

質問 12) MUC1 高発現乳癌細胞株 MCF-7 は比較的悪性度の低い部類の細胞であるが、MUC1 低発現乳癌細胞株 MDA-MB-453 は悪性度・転移能が高い細胞である。MUC1 の発現からみた悪性度とは反対であることについてはどのように考えるか。

(回答) MCF-7 は ER 陽性である一方、MDA-MB-453 は FGF レセプターが高発現している。癌の悪性度においては、MUC1 だけではなく様々な因子が複雑に影響し合っているため、MUC1 の発現状態のみで悪性度を判断することは困難と考えられる。胃癌をはじめ、MUC1 の発現と分化度との関係においては、未分化な細胞よりも高分化な細胞の方が MUC1 の発現量が高いケースも報告されている。

質問 13) LS174T に関しては、DNA のメチル化よりもヒストンの修飾状態によって制御されていると考えて良いか。

(回答) LS174T は、MUC1 遺伝子転写開始付近におけるヒストン H3 リジン 9 の修飾はメチル化を示していたが、TSA のみの薬剤処理においては MUC1 mRNA の回復がみられなかった。5-azadC と TSA を同時に加える場合のみ mRNA が回復してくる理由も明らかではない。LS174T に関しては、MUC1 の発現にエピジェネティクス以外の制御機構が働いている可能性も考えられる。

質問 14) 現在、5-azadC や TSA の臨床応用が試みられているが、今回薬剤処理した細胞株においては、薬剤を加えることによってどのような変化がみられたか。

(回答) 5-azadC、TSA 共に、全てのゲノム領域に反応する薬剤であるため、低濃度においても細胞形態が変化し、高濃度においては致死性である。

質問 15) 今回の研究成果を踏まえて、今後臨床応用を行う場合について、具体的にはどのように考えているか。

(回答) 現在、細胞株において示された MUC1 遺伝子のエピジェネティックな制御機構が、生体組織においても成り立っているのかを確認している。同時に、すでに予後等が明らかであるパラフィン包埋組織や、生検で得られた正常・腫瘍部の凍結切片、また、唾液・胆汁などを用いてメチル化を解析するなど、あらゆる方面から生体材料を用いた検討を行っている。今後、MUC1 のみならず、我々がエピジェネティクスにより制御されていると報告してきた MUC2 や MUC4 など、他のムチン遺伝子のメチル化状態を総合して、将来の発癌リスクや予後予測への応用の可能性を探る。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。