

## 論 文 要 旨

**DNA methylation and histone H3-K9 modifications contribute to MUC17 expression**

癌細胞において MUC17 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

北 本 祥

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず 2 頁で記載する)

ムチン糖タンパクは、様々なヒト組織 (呼吸器官・消化器官等) の上皮細胞表面に広く分布し、上皮組織を外部刺激から保護し、上皮の微小環境の維持を通して組織の恒常性の維持に重要な役割を担う多機能な高分子タンパク質として知られている。一方で、癌化に伴ってムチンファミリー遺伝子の異常発現が報告されており、ムチン分子が癌の病態形成 (増殖・浸潤転移等) の過程で機能的役割をもつことが明らかにされている。これまで我々の研究室では、膵胆管系腫瘍を中心に「一連のムチン遺伝子発現の臨床病理学的意義」とその「発現制御メカニズム」の解明を通して、早期かつ質的診断を目的とした膵胆管系腫瘍の診断システム構築を目指し研究を進めてきた。このような背景の中、本研究では、近年、新たに膵臓癌組織 (特にリンパ節転移を伴う症例) において発現の上昇が見られ、独立した予後不良因子になりうることを示されている膜型ムチン分子 MUC17 に関して、エピジェネティックな観点からその癌における発現制御機構の解明を試みた。

【材料および方法】

固形癌 (膵臓癌、乳癌、大腸癌、肺癌) 由来の癌細胞株の中から、MUC17 陽性・陰性細胞株を選出し、MUC17 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、MUC17 mRNA の回復をリアルタイム RT-PCR により検討した。また、各々の細胞株に対する MUC17 遺伝子プロモーター全領域の CpG DNA のメチル化状態を、DNA メチル化定量解析システム MassARRAY<sup>®</sup> を用いて網羅的に定量した。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 MUC17 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 MUC17 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。そして、MUC17 陽性・陰性細胞株において DNA メチル化状態に有意な差のみられる領域を探索し、遺伝子発現に関与する CpG DNA のメチル化領域の同定を試みた。次に、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

MUC17 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、上述で遺伝子発現に関与することが強く示唆される領域近傍に ChIP 用のプライマーを作製し、ヒストン H3 や H4 のリジン残基に対する抗体を用いて、MUC17 遺伝子発現に関与する可能性のある領域のヒストンの化学修飾状態を調べた。さらに、MUC17 の発現に関与する可能性のあるマイクロ RNA(miRNA) についても、癌細胞株を対象に行った miRNA 発現プロファイルと MUC17 の mRNA 発現量を比較して、相関のある miRNA を絞りこみ、miRNA の標的遺伝子の予測プログラムである TargetScan を用いて MUC17 の 3'-UTR と相互作用しうる候補 miRNA の選定を行った。

### 【結果】

MassARRAY®を用いた MUC17 のプロモーター領域におけるメチル化解析の結果、転写開始点近傍 (-179/+52) の CpG DNA のメチル化が MUC17 陽性細胞では有意に低メチル化状態にあり、MUC17 陰性細胞においては高メチル化状態にあることが明らかとなった。さらに、同領域を対象に行った ChIP 解析の結果、MUC1 陽性細胞ではヒストン H3K9 がアセチル化 (ユークロマチンの指標として知られる化学修飾) されており、対して MUC17 陰性細胞においてはジメチル化 (ヘテロクロマチンの指標として知られる化学修飾) されていることが分かった。さらに、これら MUC17 の陰性細胞を対象に、5-azadC および TSA 処理を施すと MUC17 の転写が顕著に促進されることが確認された。一方、膵癌組織検体中の MUC17 の当該プロモーター領域のメチル化状態を Methylation Specific PCR により調べた結果、腫瘍部位では、正常部位と比べて低メチル化状態にある傾向が確認された。さらに miRNA マイクロアレイより得られた各種癌細胞株における miRNA 発現プロファイル、MUC17 発現パターン及び MUC17 の 3'UTR への miRNA 結合予測解析により MUC17 を標的とする miRNA の絞り込みを行った結果、5種類の miRNA (miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-30c, miR-30e) が候補として同定された。

### 【結論及び考察】

本研究では、7番染色体上に位置する MUC17 遺伝子の発現機構をエピジェネティックな観点から解析を進めた。その結果、MUC17 が 1) プロモーターの転写開始点近傍 (-179/+52) の CpG DNA のメチル化と 2) 同領域に存在するヒストン H3 の 9 番目のリジン残基における化学修飾が、その転写段階での遺伝子発現を厳密に制御することを明らかにした。さらに、3) 5つの miRNA (miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-30c, miR-30e) に関しても MUC17 の転写後制御に関わっている可能性を見いだした。

膵臓がんは癌の中でも極めて悪性度が高く、PET-CT 等の最新の機器を用いても、いまだに早期発見どころか、治癒を望める段階での診断は不可能であることが多く、それゆえ、手遅れになる可能性の高い最も難治性の癌である。このような現状を打破するために、現在、膵胆管系腫瘍の「早期診断法の確立」あるいは「悪性度を規定する分子標的の同定」が望まれている。特に、本研究で同定された DNA メチル化制御機構は、臨床検体においても MUC17 の発現を反映している可能性を示唆する結果が得られているため、今後、PCR を基盤とした高感度なメチル化検出法を用いて、膵癌における悪性度診断のバイオマーカーとしての有用性に関して解析を進める必要がある。並行して、膜型ムチン MUC17 の癌における機能的意義についても詳細な検討を進め、癌治療の標的分子としての有用性の評価も必要である。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 191 号	学位申請者	北本 祥
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位 博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	小澤 政之	副査 谷本 昭英
	副査	中川 昌之	副査 古川 龍彦

**DNA methylation and histone H3-K9 modifications contribute to MUC17 expression**

(癌細胞において MUC17 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) *Glycobiology*, 21(2) : 247-256, 2011

MUC17 (膜結合型ムチン) は、十二指腸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。これまでに、膵癌において MUC17 の発現が予後不良因子であることが報告されているが、その発現制御機構については不明であった。そこで申請者らは MUC17 の発現機構の解明を目的として、MUC17 陽性・陰性細胞株 (計 10 細胞株) を用いて、エピジェネティックな観点から解析を進め、MUC17 プロモーター領域における DNA メチル化、ヒストン修飾状態および関連するマイクロ RNA のスクリーニングを行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

1. MUC17 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酵素 (HDAC) 阻害剤である Trichostatin A (TSA) を用いて処理を行った結果、MUC17 mRNA 量の顕著な回復が確認された。
2. MUC17 陽性・陰性細胞株における MUC17 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>®</sup>を用いて検討した結果、転写開始付近(-179 bp/+52 bp)における CpG のメチル化状態が MUC17 の発現状態に相関していた。膵癌検体においても、非腫瘍部と腫瘍部では当該プロモーター領域における DNA メチル化の状態の変化が確認された。
3. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) を用いて転写開始点近傍の MUC17 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、MUC17 陽性細胞ではヒストン H3-K9 がアセチル化 (ユークロマチンの指標として知られる化学修飾) されており、対して MUC17 陰性細胞においてはジメチル化 (ヘテロクロマチンの指標として知られる化学修飾) されていることが確認された。
4. マイクロ RNA マイクロアレイを用いて、MUC17 を標的とするマイクロ RNA のスクリーニングを行った結果、MUC17 の発現様式と MUC17 の 3'UTR と相互作用しうる 5 種類のマイクロ RNA 候補が同定された。

本研究は、ヒト癌細胞株における MUC17 発現制御に、MUC17 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。MUC17 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 191 号	学位申請者	北本 祥
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位 博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	小澤 政之	副査 谷本 昭英
	副査	中川 昌之	副査 古川 龍彦

主査および副査の5名は、平成24年4月17日、学位申請者 北本 祥 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)** 今回の研究では、DNA メチル化とヒストンの化学修飾の状況が MUC17 の発現と良く相関していたが、この現象については何か上流に両者を制御する機構などが存在するのでしょうか。それとも偶然なのでしょうか。

(回答) 上流の制御因子については、現時点では詳細は分かりません。今後の検討課題です。

**質問 2)** なぜ MUC17 を数あるムチンの中から選ばれたのでしょうか。

(回答) 当研究室では、主に膵胆管系腫瘍におけるムチン発現の臨床病理学的意義と、その発現機構の解明を行ってきております。その経緯から、最近の研究より MUC17 が膵癌で特異的に発現上昇が見られ、独立した予後因子であることが報告されておりましたので研究の対象に選びました。

**質問 3)** TSA と 5Azad-C で MUC17 の発現上昇が見られていますが、細胞株の中 (A427 など) には TSA と 5Azad-C との同時処理によって相乗効果がみられるどころか単剤処理に比べて発現量が減少しているものがありますが、これは何故なのでしょうか。

(回答) 現時点では、詳細は不明です。しかし、今回実験に用いた薬剤濃度の条件では細胞の増殖や形態変化を引き起こすような毒性は確認されませんでした。一つ考えられることとしては、TSA や 5Azad-C 処理は様々な遺伝子を動かす可能性のある薬剤なので、併用することで間接的に誘導された未知遺伝子同士が相互作用しあい、単剤処理の場合より発現量が減ってしまう可能性は考えられます。

**質問 4)** 今回同定されたプロモーター領域 (-179bp/+52bp) に実際メチル化感受性の転写因子が作用するという報告はあるのでしょうか。

(回答) 最近の私どもの行った実験により、Hypoxia-Inducible Factor 1  $\alpha$  (HIF1  $\alpha$ ) という低酸素応答性の転写因子が MUC17 のプロモーター領域に存在する Hypoxia-Responsible Element (HRE) に結合して、MUC17 の発現を誘導することを確認しております。HRE は CpG サイトを含み、そのメチル化の有無が MUC17 の低酸素誘導性の有無に影響を与えることも実験的に確かめております。詳細については、現在論文として投稿中です。

**質問 5)** 膵癌組織で HIF1  $\alpha$  の発現は高いレベルで見られるのでしょうか。また、低酸素環境にない状況下での MUC17 の発現機構に関してはどう理解すればよいのでしょうか。

(回答) HIF1  $\alpha$  に関しては、その高発現が膵癌の予後不良因子であるという報告がすでにされています。生理的な条件下での MUC17 の発現機構に関しては、まだ報告はなく、私ども色々と検索はいたしましたが詳細は不明です。

**質問 6)** 通常、TargetScan などの絞り込みだけでは多数のマイクロ RNA が候補としてあがってくると思いますが、今回どのように 5 種類のマイクロ RNA 候補まで絞りこまれたのでしょうか。

(回答) 今回の研究では TargetScan による解析を行う前に、11 癌細胞株から得られたマイクロ RNA の発現パターンと MUC17 の発現パターンとを比較して、「MUC17 陽性株で低発現なマイクロ RNA である、かつ MUC17 陰性株で高発現なマイクロ RNA」を条件に一段階目のスクリーニングを行いました。この一次選抜されたマイクロ RNA (102 種類) から、TargetScan により、MUC17 の 3'UTR と相互作用しうるマイクロ RNA 5 種類を絞り込みました。

**質問 7)** 一連のムチンのメチル化異常を臨床診断応用へ展開されているとお話でしたが、例えば IPMN でも adenoma と carcinoma がありますが、どこまで見分けることが可能なのでしょうか。

(回答) 現在、症例数を蓄積している段階ですが、少なくとも腸型と胃型の IPMN の判別は膵液を用いたメチル化解析によりできる可能性があることが分かっています。その他の腫瘍タイプに関しては、今後検討していく予定です。

**質問 8)** NCI-H292 では TSA 処理後も MUC17 の発現が上昇しないことから、すでにヒストンはアセチル化されている状態であると考えられることもできますが、ChIP の結果ではヒストンはアセチル化ではなくメチル化されています。これはどう解釈すれば良いのでしょうか。

(回答) ChIP の結果でメチル化されていることが分かっていますので、可能性としてはある種の癌細胞は TSA のような薬剤に対して耐性をもっているのかもしれませんが。

**質問 9)** 膜型ムチンである MUC17 の染色が細胞内に見られますが、これは何故ですか。

(回答) 合成途中の MUC17 を検出している可能性が考えられます。あと、MUC17 とよく似たドメイン構造を有する MUC1 の一部が膜から細胞内に移行して、 $\beta$ -catenin や ER $\alpha$  など様々な分子と複合体を形成し、核への移行を経て遺伝子発現を制御することが知られていますので、もしかすると、MUC17 も同様の機能的特徴を有しているため細胞質に染色性が確認されたのかもしれませんが。

**質問 10)** 虚血(低酸素状況)など場合を含め MUC17 の生理的な機能はどう考えれば良いのでしょうか。

(回答) 低酸素における MUC17 の機能的意義に関しては、分かっておりません。しかし、近年低酸素応答性のムチンであることの明らかとなった MUC1 は、低酸素による細胞死への抵抗性の獲得に関与しているとの報告があるので、同様の機能的特徴をもつ可能性も考えられます。

**質問 11)** 今回 3 種類のエピジェネティクスの解析結果から、結局どのエピジェネティクス機構が中心となって MUC17 の発現を制御しているのでしょうか。

(回答) 今回の結果からは、マイクロ RNA に関してはまだスクリーニングの段階なので関与しているかどうかはわかりません。DNA メチル化とヒストン修飾についても、どちらが優位なのかはわかりません。

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。