

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

脳転移を規定する non-coding RNA のエピゲノムプロファイリング  
研究分担者 畑田出穂 群馬大学生体調節研究所

### 研究要旨

転移能、薬剤耐性を獲得した癌細胞でのエピゲノムの変化、特に DNA のメチル化の変化は癌細胞の性質を決定づける重要な因子である。脳転移の関連した miRNA の転写調節領域での DNA のメチル化の変化はエクソソーム内での miRNA の量的変化への関連が予想される。本研究では昨年、miRNA の転写調節領域での DNA のメチル化を次世代シーケンサーを用いて調べた。miRNA の転写調節領域の DNA のメチル化が癌における miRNA の転写制御に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。今年度はこのメチル化を制御する因子として miR-29 ファミリーをみいだした。miR-29 はメチル化酵素と脱メチル化酵素の両者を抑制することにより、メチルの変化を抑えエピジェネティック状態を維持して癌化を防いでいることがわかった。

## A. 研究背景、目的 (背景)

癌細胞におけるエピゲノムの変化、特に DNA メチル化の変化は癌化、癌の転移能、薬剤耐性など悪性化に関連した様々な性質において重要な働きをしていることが知られている。小分子 RNA のひとつである miRNA の発現変化は癌化やその悪性化において重要な働きをしていることがわかってきている。これら miRNA をコードする遺伝子においても DNA のメチル化の変化は通常の遺伝子と同様、癌細胞で変化が見られる。

一方、細胞が分泌するエンドソーム由来の小胞顆粒であるエクソソームの中に、miRNA が安定して存在することが発見され、細胞間のメッセンジャーとして機能することが示唆されている。特にがん患者の血清中のエクソソームには健康人と異なる種類と量の miRNA が含まれていることが報告されており、バイオマーカーとしても注目されている。このような変化は癌細胞中における miRNA の発現量の変化とも関係しており、癌細胞におけるエピゲノムの研究が重要であることがわかる。

さて、どのようにしてメチル化は制御されているのだろうか？今回我々は miR-29 がその役割をなしていることを示唆する証拠をえたので報告する。

## B. 研究方法

miR-29 は miR-29a、miR-29b、miR-29c、のファミリーからなるが、癌抑制遺伝子として知られている。すなわちその発現と予後との関係が報告されていたり、癌細胞で強発現をすることで腫瘍形成が抑えられることが報告されているからである。従来 miR-29 は DNA メチル化酵素の DNMT3A、DNMT3B を抑制することでがん抑制遺伝子のメチル化を防ぐ働きがあるといわれているが、本当にそれだけかを検証するためにターゲット抑制ソフトの miRanda などを用いて miR-29 のターゲットの検索

をおこなった。そして候補の遺伝子をレポーター実験などで検証した。

### (倫理面への配慮)

今回の解析では該当しない。

## C. 研究結果

miR-29 のターゲットとして miRanda の候補で多くの候補が上がってきた。その中でヒトでもマウスでも保存されているものを上げると興味深いことに脱メチル化に関与する TET1 と TDG があった。そこでこれらの遺伝子のターゲットを含む配列を用いてレポーター実験をおこなったところ、いずれの遺伝子も miR-29 によって発現が抑制されることがわかった。さらに miR-29 が内在性の TET1 と TDG を抑制できるかを Realtime-PCR やウエスタンブロットで確認することができた。

## D. 考察

miR-29 はがん抑制遺伝子であるが、今回 DNA 脱メチル化に関与する TET1 と TDG を抑制することがわかった。従来 miR-29 はメチル化の酵素 DNMT3A と DNMT3B を抑制することが知られていた。そとことからがん抑制遺伝子のメチル化を防ぐことが miR-29 の働きと考えられていたが、今回脱メチル化も抑制していることがわかり、むしろ miR-29 はメチルの変化を抑えエピジェネティック状態を維持して癌化を防いでいると考えられる。

## E. 結論

miR-29 はメチル化酵素と脱メチル化酵素の両者を抑制することにより、メチルの変化を抑えエピジェネティック状態を維持して癌化を防いでいる。

## **F . 研究発表**

### **1 . 論文発表**

1. Morita S, Horii T, Kimura M, Ochiya T, Tajima S, Hatada I. miR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases. *Int J Mol Sci*. 14: 14647-14658, 2013

### **2 . 学会発表**

1. 森田純代、堀居拓郎、木村美香、落谷孝広、田嶋正二、畑田出穂 miR-29 は DNA メチル化酵素と DNA 脱メチル化酵素を制御する。第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日, 神戸

## **G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)**

- 1.特許取得  
特になし。
- 2.実用新案登録  
特になし。
- 3.その他  
特になし。

