

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）
（総合）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 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。調べた対象は乳癌細胞の MCF7 と高転移性をもつ乳癌細胞の MCF7/ADR である。その結果、様々な既知の転移能に関連した miRNA の転写調節領域の DNA のメチル化が MCF7 と MCF7/ADR で異なっていることがわかった。このことから今回みつかった DNA メチル化が異なる miRNA の中に未知の転移能と関連をもったものが含まれていることが示唆される。さらに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ことが知られているが、その網羅的な解析はこれまであまりおこなわれていない。

一方、細胞が分泌するエクソ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常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。またがん細胞は、比較的たくさんのエクソソームを分泌する性質をもつ傾向にあり、転移とも密接にかかわっていることがわかってきている。

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？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

本研究では乳癌細胞の MCF7 と高転移性をもつ乳癌細胞の MCF7/ADR を用いて網羅的な DNA メチル化解析をおこなった。方法としては今回我々が開発した MBD1-DIP Seq 法を用いた。この方法ではメチル化された DNA に結合するたんぱく質である MBD1 のメチル化結合ドメインをクローニングして HisTag に融合したたんぱく質がメチル化 DNA に結合することを利用してメチル化 DNA を濃縮する。そして回収したメチル化された DNA からライブラリーを作成し次世代シーケンサー (Illumina) で解析した。ゲノムにマップされたリードの数がメチル化量を表す。今回の目的では miRNA をコードする遺伝子の転写開始点近傍の DNA メチル化の解析をおこなった。

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

解析の結果、様々な miRNA において DNA のメチル化がみられた。また DNA のメチル化は発現量と逆相関していることもわかった。さらに個々の miRNA について bisulfite sequencing 法で次世代シーケンスの結果が正しいことも立証された。

さて乳癌細胞の MCF7 と高転移性をもつ乳癌細胞の MCF7/ADR の DNA メチル化の違いをみていくと多くの miRNA において差が見られることがわかった。またそれらは発現の違いとも逆相関していた。これらの中にはこれまで転移能と関係しているものも含まれていた。例えば miR-10b は今回、MCF7/ADR で脱メチル化され発現が上昇していることがわかったが、この miRNA は乳癌の転移能と関係していることが報告されている。また転移の見られる乳癌患者の血清中で miR-10b の量が増えていることも知られている。miR-222 も上皮間葉移行(EMT)や転移に関与することが知られている miRNA であるが、MCF7/ADR で脱メチル化され発現が上昇していることがわかった。miR-222 も乳癌患者の血清中で量が増えていることが報告されている。

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 があつた。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

今回の結果から次世代シーケンサーを用いたメチル化解析法である MBD1-DIP Seq 法で miRNA 遺伝子のメチル化が良好に解析できることがわかった。さらにこの方法により高転移能を持つ乳癌細胞でメチル化と発現が変化している遺伝子を多数みつけることができた。これらの中には転移に関与して乳癌患者の血清中で量が変化しているものも存在し、新たな転移能に関係したエクソソーム miRNA の発見につながることを期待される。

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

転移性乳癌細胞の網羅的 DNA メチル化解析を MBD1-DIP Seq 法を用いておこない、転移に関連する miRNA の候補をみつけた。また 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Morita S, Takahashi RU, Yamashita R, Toyoda A, Horii T, Kimura M, Fujiyama A, Nakai K, Tajima S, Matoba R, Ochiya T, Hatada I. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation and Expression of MicroRNAs in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 13:8259-8272, 2012
2. 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. Morita S, Takahashi RU, Yamashita R, Toyoda A, Horii T, Kimura M, Fujiyama A, Nakai K, Tajima S, Matoba R, Ochiya T, Hatada I. Epigenetic similarity and difference of microRNA and protein-coding genes: Analysis by next-generation sequencing. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 14 日, 福岡
2. 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。

