

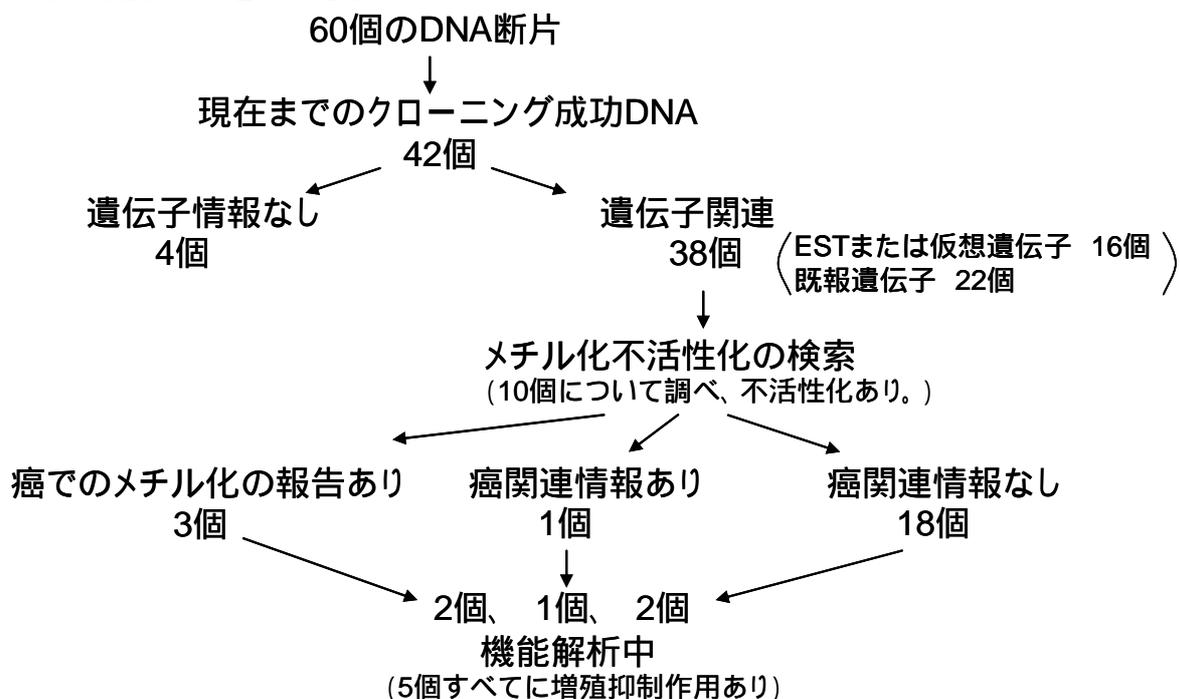
平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな		よしかわ ひろひで					
研究代表者氏名		吉川 浩英		所属研究機関・部局・職		(財)癌研究会・癌研究所エピジェネシス発がん研究部・部長	
研究課題名	和文	DNA メチル化による不活性化遺伝子群の解析（ヒト癌細胞ゲノムでの研究）					
	英文	Analysis of genes silenced by DNA methylation: An exploration in human cancer genome					
研究経費		平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位：千円		27,400	14,600	14,600	14,600	14,600	85,800
研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）	
吉川 浩英		(財)癌研究会・癌研究所エピジェネシス発がん研究部・部長		分子生物学		研究全般	
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>癌細胞は、その形質が娘細胞に体細胞遺伝するために無制限に増殖することが特色である。成人の癌において、DNA メチル化がこの体細胞遺伝の重要な要素として深く関わっていると考えられる。また、生体で生ずる大規模な DNA メチル化の変化を解明する上で、癌は適した研究対象である。本研究においては、ゲノム DNA の網羅的な解析法である restriction landmark genomic scanning (RLGS) によって同定された 60 個の癌特異的变化を示す DNA 断片について解析を行う。これらのうち 11 個についてはすでにクローン化している。うち 3 個は既存の遺伝子であり、申請者が細胞増殖について解析したところ 3 個すべてが細胞増殖抑制作用を有することが明らかとなっている。また、残りの 8 個のうち 7 個についても近傍に遺伝子の断片である EST を有していることが判明しており、これらからプロモーターのメチル化不活性化を受ける機能的に重要な遺伝子が同定されることが大いに期待される。実際には EST を利用して、まず遺伝子の全長をクローニングする。次にプロモーターのメチル化を検索し、さらに遺伝子の発現を調べることによってメチル化と遺伝子不活性化の関連を確かめる。さらに、メチル化不活性化を受けている癌細胞株に遺伝子を導入することによってそれらの遺伝子の機能を明らかにするとともに、遺伝子不活性化の発がんに対する意義を検討する。また、60 個の癌で特異的に変化を示す DNA 断片のうち 49 個についてはクローン化されていないので、申請者が確立した方法によって新たにクローニングする。以下、同様に精力的に解析することによって癌細胞における DNA メチル化と遺伝子異常についての知見が大幅に増加すると考えられる。このように癌特異的なメチル化によって不活性化される遺伝子を逐一単離し、その機能を解析することによって、体細胞における DNA メチル化の広汎な変化が細胞の遺伝情報に与える重要性を示すことができると考える。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

本研究はRLGS法で検出された60個の癌特異的な異常DNA断片について解析を行うものである。これらのDNA断片のクローニングを集中的に行った結果、平成14年度に15個、平成15年度に16個の同定に成功した。平成14年度以前の11個を加えて、計42個のDNA断片のクローニングに成功しており、これは全体の70%である。この42個のDNA断片について、正常肝臓サンプルと10個の肝細胞癌細胞株とを用いてメチレーションスペシフィックPCRを行った結果、すべてのDNA断片において癌特異的なメチル化が明らかとなった。ジェンバンクサーチによる検索では、42個のうち遺伝子に関連した情報（ESTや仮想遺伝子を含む）のあるものが38個であった。このうち16個がESTあるいは仮想遺伝子(hypothetical protein)であり、残りの22個は何らかの論文報告が存在する遺伝子であった。38個の遺伝子の中で、EST2個と既報遺伝子8個について発現を解析したところ、全てに癌特異的な遺伝子不活性化が存在した。さらに、22個の既報遺伝子についてジェンバンクサーチ結果と文献検索からの情報を合わせて検討したところ、癌に関連した報告があるものは4個であり、そのうち3個はメチル化不活性化が報告されていた（以前に報告したSOCS-1を含む）。もう1個は癌に関連した遺伝子WNT10Bであるが、メチル化不活性化の報告はなされていない。残りの18個については癌に関連した報告が存在せず、発がんにおいて未知の機能を有すると考えられる既報の遺伝子であった。さらに進んで、平成14年度にクローニングした新規遺伝子1個と、癌でのメチル不活性化が知られていない既報遺伝子4個の計5個について集中的に機能解析を行った。ASCLと名づけた新規遺伝子は、肝細胞癌細胞株で高頻度にメチル化不活性化を受けており、肝細胞癌切除標本においても異常なメチル化が認められた。また、ASCLタンパクの機能解析を行ったところASCLは細胞増殖抑制作用とアポトーシス誘導能を有していることが明らかとなった。新規の癌抑制遺伝子としてCancer Researchに掲載予定である。さらにyeast 2 hybrid法にて結合タンパクを検索した結果、ASCLは細胞分裂期に重要な働きをするanaphase promoting complexに関連したタンパク質と相互作用することが示唆されており、現在詳しく解析中である。既報の4個の遺伝子はSOCS-3、WNT10B、cell cycleに関するタンパク質、機能不明の膜輸送体である。この4個についても2人以上で増殖アッセイを行った結果、細胞増殖抑制作用が明らかとなっている。（前ページの「当初の研究目的」に示した3個の増殖抑制作用を有す遺伝子の1個はWNT10Bであるため、計7個について増殖抑制作用が明らかとなっている。）また、SOCS-3とWNT10Bについてはそのタンパク質が関与する発がん経路での役割についても実験的に解析が終了しており、論文作成中である。

本研究の現在までの進行状況を下図に示す。



特記事項（これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。）

- 癌細胞で変化する 42 個の DNA 断片をクローニングしたところ、そのすべてで癌特異的な DNA メチル化の変化を認め、そのうち 39 個が異常 DNA メチル化として新規であった。また、38 個より遺伝子が見出された。このことより、クローニングした DNA 断片が癌特異的变化を示す DNA として正確なものであり、またそれらが遺伝子の活性に直結した部分であることが示されている。
- 同定した 38 個の遺伝子のうち 16 個が新規遺伝子であった。
- また、5 個の遺伝子について全長遺伝子をクローニングして機能解析を進めたところ、5 個すべてで細胞増殖抑制作用を認めた。このことより、本研究で同定している遺伝子が癌を理解する上で極めて有意義な対象であると考えられる。すなわち、仮説として、それらの遺伝子の DNA メチル化による変化は単に癌でランダムに生じてそのまま細胞に記録されているのではなく、増殖に有利に働く変化が生じた細胞が選択的に残って癌を形成していると考えられる。
- 上述の 3 項目については、掲載予定の遺伝子 ASCL で具体的にみることができる。すなわち、ASCL は遺伝子として新規であり、癌でメチル化不活性化を受けることも初めての知見であった。さらにアポトーシスに関連した細胞増殖抑制作用も新たな遺伝子機能である。また、ASCL が参加している癌抑制経路の解析が現在進行しており、一個の遺伝子に留まらず細胞の変化を生ぜしめる機能的なユニットとしての知見となることが期待される。さらに本研究の進行により、数十個の単位でこの新たな知見が得られることとなり、体細胞における DNA メチル化の広汎な変化が細胞の遺伝情報に与える重要性を示すことができると考える。
- 最後に、本研究で同定した DNA 断片は DNA メチル化を利用した臨床診断にも利用可能であり、計画中である。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文 (発表予定のものを記入することも可能。) の全著者名、論文名、学協会誌名、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年 (西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

ASC-Like, a highly homologous protein to ASC in the pyrin domain, is silenced by DNA methylation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma, Takahiko Kubo, Junji Yamamoto, Yuko Shikauchi, Yasuharu Niwa, Kenichi Matsubara and Hirohide Yoshikawa. Cancer Research, Acceptable on 2004/04/20.