

High throughput sequencer による癌のエピゲノム解析

Analysis of Methyloome of Cancer by high throughput sequencer

西川 伸一 (NISHIKAWA SHINICHI)

独立行政法人理化学研究所・幹細胞研究グループ・グループディレクター



研究の概要

基礎・臨床が協力して骨髄異形成症候群 (MDS) および悪性黒色腫のメチル化DNA部位を全ゲノムレベル (メチローム) で解析し、MDS発生過程でメチル化によりサイレンシングされ、また治療により脱メチル化される遺伝子をリストし、治療の困難なMDSの発症過程を明らかにする。現在、ヒトMDS細胞株を用いたモデル治療実験の解析が終わり、選択的に脱メチル化される120種類の遺伝子のリストを作成したところである。今後、脱メチル化剤が著効を示した患者さんのMDS細胞を対象を広げてメチローム解析を行い、MDS発症にかかわる分子を明らかにする。

研究分野：血液内科

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：MDS、メチローム、ゲノムワイド、メチル化阻害剤

1. 研究開始当初の背景

最近になって、遺伝子配列の変異以外に伝達可能な遺伝子上の修飾 (エピゲノム) を科学的に、しかも全ゲノムにわたって調べる様々な方法が開発された。これまで断片的にしか窺い知ることのできなかった染色体上の変化が科学的に検出可能になったことは、エキサイティングな新しい時代の幕開きといえる。特に、ガンを初めとする多くの疾患の根底には、各細胞レベルでのエピジェネティックな変化が寄与していることは間違いない。事実、様々な腫瘍に対して、遺伝子のメチル化阻害剤や、ヒストンアセチル化阻害剤が一定の効果をもつことが報告され、がんのエピゲノム解析に期待が集まっている。なかでも、骨髄異形成症候群 (MDS) の脱メチル化剤による治療が大成功を収めており、なぜこの疾患に効果があるかを解明することは臨床と基礎が共同して進める研究として極めて重要な課題であると考え申請に至った。

2. 研究の目的

基礎・臨床が協力して骨髄異形成症候群 (MDS) および悪性黒色腫のメチル化DNA部位を全ゲノムレベル (メチローム) で解析し、MDS発生過程でメチル化によりサイレ

ンシングされ、また治療により脱メチル化される遺伝子をリストし、治療の困難なMDSの発症過程を明らかにする。

3. 研究の方法

当初メチロームの解析には、次世代シーケンサーを用いる予定であったが、初年度での方法の検討を経て、よりインフォマティクス解析の容易な、CHARM法を用いて解析している。

モデル実験では、ヒトMDS細胞株をアザシチジン (AZ)、デシタピン (DC) の脱メチル化剤を低濃度長期間処理し、処理前後のメチロームを解析し、脱メチル化処理に感受性の遺伝子リストを作成する。その中から、MDSに関わる遺伝子を明らかにする。

この方法で見つかる候補遺伝子のメチル化状態を実際のMDS細胞で解析する。また、患者さん由来のMDSメチロームを解析し、モデル細胞での結果と比較し、MDS発症の分子機構を明らかにする。

4. これまでの成果

モデルとして利用したヒトMDS細胞株をAZ, DCなど脱メチル化剤で処理すると、約120遺伝子が両剤共通に処理によりメチル化が外れ、その結果として、遺伝子発現が上昇した。このような挙動を示す遺伝子の中に、MDSの発症にかかわる遺伝子が存在すると考

えられる。次に、薬剤処理にも関わらずメチル化パターンに全く変化がない遺伝子群が存在する。これらは、生殖細胞での未発現される Nanog, Oct などの遺伝子、インプリンティング遺伝子などが含まれる。即ち、これらの遺伝子は脱メチル化剤でメチル基が失われてもすぐに de novo のメチル化により元に戻される遺伝子と考えている。これら以外に、メチル基が外れるものの転写が上昇しない遺伝子、或いは転写は上昇するが、メチル化されたままの遺伝子も多く存在する。なぜこのような遺伝子群が存在するのかについては、ここで示した解析が high density CpG island に限られているためと考えられる。この問題に何らかの回答を得るためには、全ゲノムタイリングアレーを用いた解析が必要で、現在分析を進めている。

脱メチル化され、発現も上昇する遺伝子の代表 30 についてリストすると、TNF, JUN, CXCR4, IMAGE:3838859, CLC, CCL4, TyroBP, APOC2, HLA-DPA, HLA-DRA, HLA-DPB, MTAP44, TRPM4, SERPINA1, IL1B, S100P, SGK, BTG2, CRIP1, UCHL1, IFI6, γ cc13, LGALS3 β , IFIT2, IFITM1, AF1q, IL8, IFIT1, KLHDC7B, MX1 となった。

5. 今後の計画

DNA メチル化の基礎研究としてはいくつかの興味ある結果を示すことが出来た。また、モデル実験ではあるが、低濃度長期間の脱メチル化剤の処理により、脱メチル化される感受性の高い遺伝子と、そうでない脱メチル化剤抵抗性の遺伝子に分かれることを示すことが出来た。この結果を、実際の患者さん由来の MD S 細胞の解析と比べ、MD S 発症にかかわる遺伝子を明らかにすることがこれからの最も重要な研究計画になる。現在患者さんのリクルートを始めたところで、アザシチジンに良く反応した患者さんからの MD S 細胞の提供を待っている段階である。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Egawa G, Osawa M, Uemura A, Miyachi Y, Nishikawa S. 2009. Transient expression of ephrin b2 in perinatal skin is required for maintenance of keratinocyte homeostasis. *J Invest Dermatol* 129: 2386-95
2. Eilken HM, Nishikawa S, Schroeder T. 2009. Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature* 457: 896-900
3. Kinoshita M, Era T, Jakt LM, Nishikawa S. 2009. The novel protein kinase Vlk is essential for stromal function of mesenchymal cells. *Development* 136: 2069-79

4. Kondo N, Ogawa M, Wada H, Nishikawa S. 2009. Thrombin induces rapid disassembly of claudin-5 from the tight junction of endothelial cells. *Exp Cell Res* 315: 2879-87
5. Kubota Y, Osawa M, Jakt LM, Yoshikawa K, Nishikawa S. 2009. Necdin restricts proliferation of hematopoietic stem cells during hematopoietic regeneration. *Blood* 114: 4383-92
6. Nishikawa S. 2009. Gray zone prompting new imagination. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 521-3
7. Onimaru M, Yonemitsu Y, Fujii T, Tanii M, Nakano T, Nakagawa K, Kohno R, Hasegawa M, Nishikawa S, Sueishi K. 2009. VEGF-C regulates lymphangiogenesis and capillary stability by regulation of PDGF-B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1685-96
8. Elmi M, Matsumoto Y, Zeng ZJ, Lakshminarasimhan P, Yang W, Uemura A, Nishikawa S, Moshiri A, Tajima N, Agren H, Funa K. 2010. TLX activates MASH1 for induction of neuronal lineage commitment of adult hippocampal neuroprogenitors. *Mol Cell Neurosci* 45: 121-31
9. Freter R, Osawa M, Nishikawa S. 2010. Adult stem cells exhibit global suppression of RNA polymerase II serine-2 phosphorylation. *Stem Cells* 28: 1571-80
10. Kamei N, Kwon SM, Alev C, Ishikawa M, Yokoyama A, Nakanishi K, Yamada K, Horii M, Nishimura H, Takaki S, Kawamoto A, Ii M, Akimaru H, Tanaka N, Nishikawa S, Ochi M, Asahara T. 2010. Lnk deletion reinforces the function of bone marrow progenitors in promoting neovascularization and astroglialosis following spinal cord injury. *Stem Cells* 28: 365-75
11. Kamiya D, Banno S, Sasai N, Ohgushi M, Inomata H, Watanabe K, Kawada M, Yakura R, Kiyonari H, Nakao K, Jakt LM, Nishikawa S, Sasai Y. 2011. Intrinsic transition of embryonic stem-cell differentiation into neural progenitors. *Nature* 470: 503-9

2011 年度国際色素細胞学会

Myron Gordon 賞

ZA Malek & R. Halaban と共同受賞。