

## 92. がんのシグナル脂質変換酵素遺伝子異常とその臨床応用

鈴木 拓

札幌医科大学 医学部 分子生物学講座

Key words : 大腸がん, ジアシルグリセロールキナーゼ, DNA メチル化, がん抑制遺伝子

### 緒 言

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、ジアシルグリセロール (DG) とホスファチジン酸 (PA) の2つの脂質間の均衡を調節する酵素であり、細胞内情報伝達において重要な役割を担っている<sup>1)</sup>。DG はホスホリパーゼ C (PLC) により、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP<sub>2</sub>) から産生され、DGK により PA にリン酸化される。DG はプロテインキナーゼ C (PKC) と結合して活性化するセカンドメッセンジャーとして知られる。さらに DGK は、PA を介した Raf kinase や mTOR などの活性調節にも関与すると考えられており、広範囲で多彩な生理機能制御に関与するとされる。いくつかの DGK ファミリーとがんとの関連も知られており、例えば DGK  $\alpha$  は乳がん、肝がん、グリオーマなどにおいてがん遺伝子的に機能することが報告されている<sup>2-4)</sup>。しかしそれ以外の DGK ファミリーとがんとの関わりはあまり知られておらず、DGK ファミリー遺伝子の変異やメチル化異常はこれまで報告がない。これまで我々は大腸がんにおけるエピジェネティクス異常を解析し、多くのがん関連遺伝子の DNA メチル化異常を明らかにしてきた<sup>5,6)</sup>。今回我々は、DGK ファミリー遺伝子の DNA メチル化異常を明らかにすることを目的とした。

### 方 法

#### 1. 大腸がん細胞株及び臨床検体

大腸がん細胞株 (CaCO<sub>2</sub>, Colo320, DLD1, HCT116, HT29, LoVo, RKO, SW48, SW480) からゲノム DNA および RNA を抽出した。DNA 脱メチル化による遺伝子発現回復を検証する目的で、大腸がん細胞株を 2  $\mu$ M の DNA メチル化酵素阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) で 72 時間処理した。大腸腺腫 177 検体、大腸がん 141 検体、非がん部正常大腸組織 97 検体よりゲノム DNA を抽出した。臨床検体の解析については札幌医科大学の承認を得ている。

#### 2. DNA メチル化および発現解析

DGK ファミリー遺伝子のプロモーター CpG アイランドのメチル化を、メチル化特異的 PCR (MSP) 法、バイサルファイト・パイロシーケンス法、バイサルファイト・シーケンス法により解析した。DGKG 遺伝子発現を、TaqMan プローブを用いた定量 RT-PCR 法によって解析した。

#### 3. DGK $\gamma$ の機能解析

野生型 DGK  $\gamma$  および constitutively-active (CA) 型、kinase-dead (KD) 型の DGK  $\gamma$  を発現するアデノウイルスベクターを構築した。大腸がん細胞株にこれらのアデノウイルスベクターを感染後、MTT アッセイ、細胞遊走アッセイ、マトリゲル浸潤アッセイを行った。また RhoA および Rac1 活性を G-LISA アッセイキットを用いて測定した。

### 結 果

#### 1. DGK ファミリー遺伝子の DNA メチル化解析

10 種類ある DGK ファミリー遺伝子のうち、プロモーター領域に CpG アイランドがある 8 遺伝子 (DGKA, DGKE, DGKG, DGKH, DGKI, DGKK, DGKQ, DGKZ) の DNA メチル化を、MSP 法により解析した。その結果、5 遺伝

子 (*DGKA*, *DGKG*, *DGKI*, *DGKK*, *DGKZ*) が複数の大腸がん細胞においてメチル化していた。中でも *DGKG* と *DGKZ* は全ての大腸がん細胞株でメチル化していたが、正常大腸組織でのメチル化はごくわずかであることから、がん特異的なメチル化であると推測された。

## 2. *DGKG* 遺伝子のメチル化と発現解析

*DGKG* 遺伝子がコードする DGK $\zeta$  は転移性大腸がん細胞において高発現し、浸潤を促進するという結果が最近報告されている。そこで我々は、癌との関係がほとんど知られていない *DGKG* (*DGK* $\gamma$ ) に着目し、解析を進めた。*DGKG* は正常大腸組織では発現しているが、大腸がん細胞株ではいずれも発現が消失あるいは低下していることが定量 RT-PCR 解析から明らかとなった。また大腸がん細胞を DNA メチル化酵素阻害剤 5-aza-dC で処理することにより、*DGKG* 発現が回復することから、DNA メチル化が発現抑制に関わっていると考えられた。臨床検体を用いた解析では、*DGKG* メチル化は大腸がんの 51.8%、大腸腺腫の 50.3% に認められたが、正常大腸組織からは検出されなかった。これらのことから、*DGKG* 遺伝子は、大腸がんにおいて高頻度にメチル化によって転写抑制されており、かつ *DGKG* のメチル化は大腸発癌過程の早期に起きることが示された。

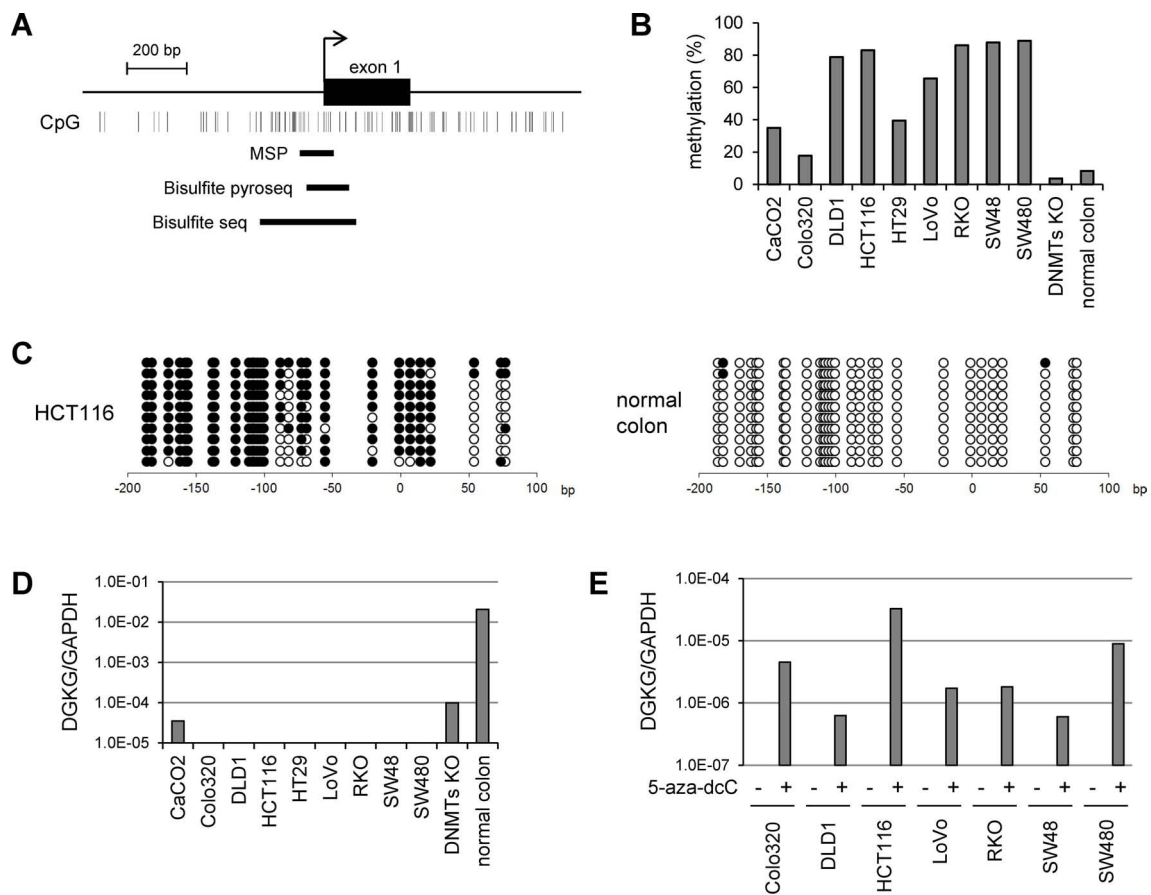


図1. 大腸がん細胞株における *DGKG* メチル化および発現解析

(A) *DGKG* 遺伝子の転写開始点領域の模式図。MSP、バイサルファイト・シーケンス、パイロシーケンスで解析した範囲を併せて示している。(B) 大腸がん細胞株および正常大腸組織における *DGKG* 遺伝子メチル化をバイサルファイト・パイロシーケンスで解析した結果。DNA メチル化酵素をノックアウトした大腸がん細胞 (DNMTs KO) を非メチル化のコントロールとして併せて示している。(C) 大腸がん細胞 HCT116 と正常大腸をバイサルファイト・シーケンスで解析した結果。(D) 大腸がん細胞株および正常大腸における *DGKG* 発現の定量 RT-PCR 解析。(E) DNMT 阻害剤 5-aza-dC 処理による発現回復を定量 RT-PCR 解析した結果。

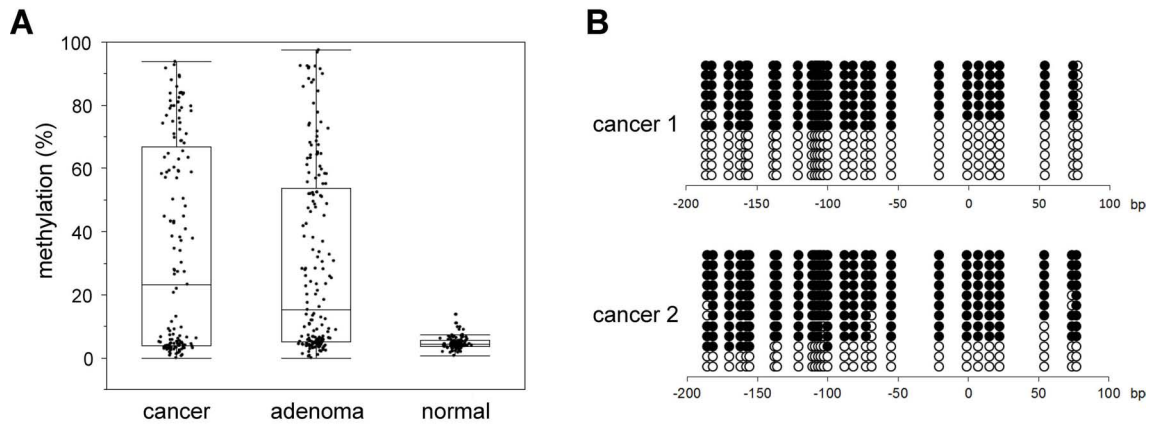


図2. 臨床検体における *DGKG* メチル化解析

(A) 大腸がん (141 検体)、大腸腺腫 (177 検体)、正常大腸 (97 検体) における *DGKG* 遺伝子メチル化をバイサルファイト・パイロシーケンス解析した結果。(B) 代表的な大腸癌検体におけるバイサルファイト・シーケンス解析結果。

### 3. *DGK $\gamma$* の機能解析

*DGK $\gamma$*  の大腸がんにおける役割を明らかにするため、野生型 *DGK $\gamma$*  ならびに CA 型と KD 型の 2 種類の変異型 *DGK $\gamma$*  を発現するアデノウイルスベクターを大腸がん細胞株 (HCT116, DLD1, RKO) に感染させ、細胞増殖を MTT アッセイにより解析した。その結果、野生型 *DGK $\gamma$*  の過剰発現は大腸がん細胞の増殖に影響を与えなかったが、CA 型および KD 型 *DGK $\gamma$*  による増殖抑制効果が確認された。遊走アッセイおよびマトリゲル浸潤アッセイの結果、野生型および 2 つの変異型 *DGK $\gamma$*  により、大腸がん細胞の遊走・浸潤が抑制されることが示され、特に CA 型 *DGK $\gamma$*  が最も高い抑制効果を示した。

細胞の遊走および浸潤には Rho ファミリー small G 蛋白の活性化が関与していることが知られている。また *DGK $\gamma$*  が GTPase-activating protein (GAP) である  $\beta 2$ -chimaerin を活性化することで Rac1 を抑制することが報告されている。そこで大腸がん細胞において *DGK $\gamma$*  が Rac1 と RhoA の活性に与える影響を解析した結果、野生型および CA 型 *DGK $\gamma$*  が Rac1 活性を抑制することを明らかにした。

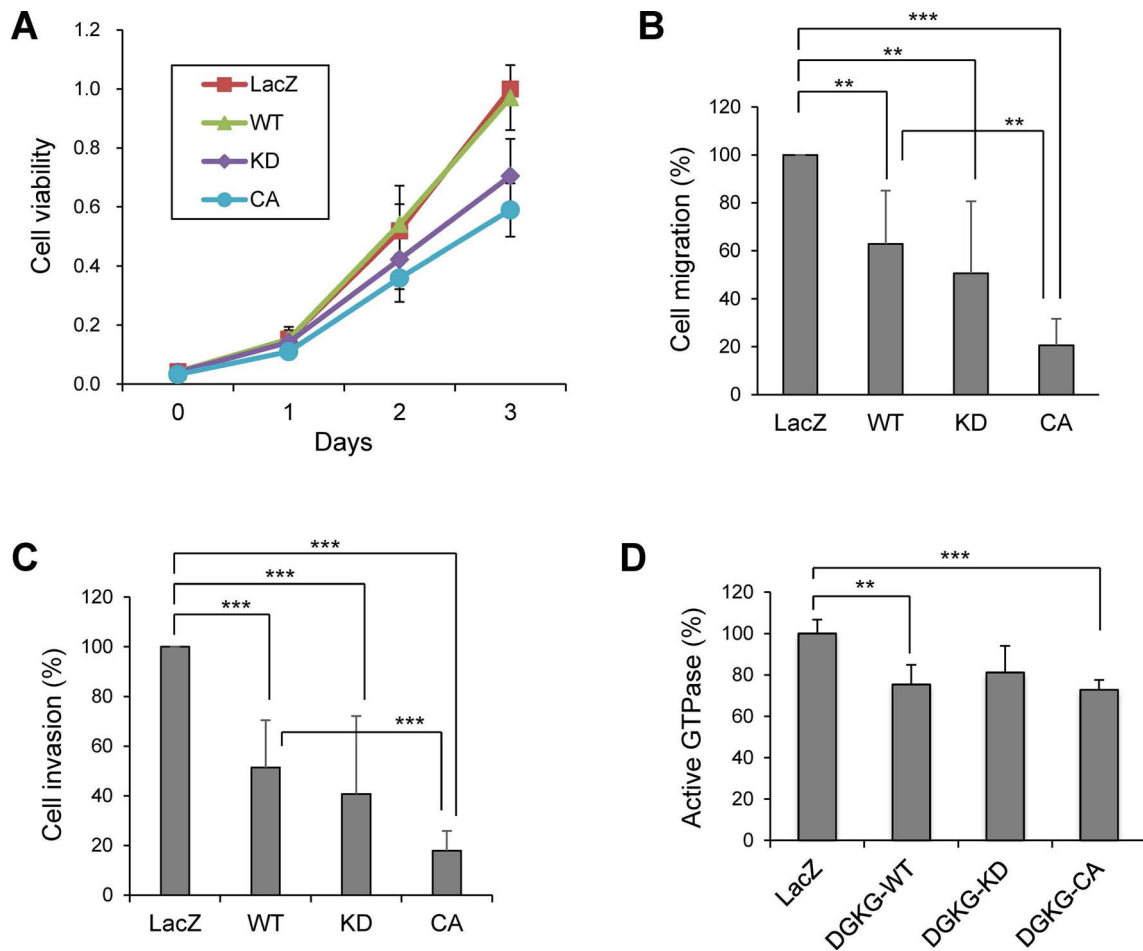


図3. 大腸がん細胞における DGK  $\gamma$  の機能解析

(A) 大腸がん細胞 HCT116 に野生型 (WT)、kinase-dead (KD) 型、constitutively-active (CA) 型 DGK  $\gamma$  を過剰発現させ、細胞増殖への影響を MTT アッセイで解析した結果。コントロールとして LacZ を用いた。(B) 遊走能への影響を解析した結果。\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 、統計解析は t 検定を用いた。(C) マトリゲル浸潤アッセイの結果。\*\*\* $P < 0.001$ 、統計解析は t 検定を用いた。(D) Rac1 活性への影響を G-LISA アッセイキットで解析した結果。\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 、統計解析は t 検定を用いた。

## 考 察

DGK ファミリーの中で、これまでがんとの関わりが報告されているのは DGK  $\alpha$ 、DGK  $\eta$ 、DGK  $\zeta$  が挙げられるが、いずれもがんにおいて高発現し、がん遺伝子として機能するという報告が多い<sup>4,7,8)</sup>。今回我々は、DGK  $\gamma$  をコードする *DGKG* 遺伝子が、大腸がんにおいて高頻度にエピジェネティックに不活性化されていることを明らかにした。*DGKG* のメチル化は大腸腫瘍においても高頻度に認められることから、大腸がんのリスク診断や早期診断マーカーとして有用と考えられる。また DGK  $\gamma$  の過剰発現が大腸がん細胞の増殖、遊走、浸潤を抑制したことから、がん抑制遺伝子として機能することが示唆された。増殖、遊走、浸潤の抑制効果は CA 型 DGK  $\gamma$  が最も高いことから、キナーゼ活性がこれらの腫瘍抑制効果に関わっていることが示唆される。しかし一方、KD 型 DGK  $\gamma$  も類似の効果を示したことから、キナーゼ活性とは別の分子機能が腫瘍抑制に関わっている可能性も示唆された。がんにおける DGK  $\gamma$  の機能をさらに明らかにすることで、新たな治療法開発につながる事が期待される。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、札幌医科大学医学部分子生物学講座の甲斐正広である。本研究を援助いただいた上原記念生命科学財団に深く感謝する。

## 文 献

- 1) Shulga YV, Topham MK, Epand RM. Regulation and functions of diacylglycerol kinases. *Chem Rev.* 2011 Oct 12;111(10):6186-208. doi: 10.1021/cr1004106. PMID: 21800853
- 2) Torres-Ayuso P, Tello-Lafoz M, Merida I, Avila-Flores A. Diacylglycerol kinase-zeta regulates mTORC1 and lipogenic metabolism in cancer cells through SREBP-1. *Oncogenesis.* 2015 Aug 24;4:e164. doi: 10.1038/oncsis.2015.22. PMID: 26302180
- 3) Takeishi K, Taketomi A, Shirabe K, Toshima T, Motomura T, Ikegami T, Yoshizumi T, Sakane F, Maehara Y. Diacylglycerol kinase alpha enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J Hepatol.* 2012 Jul;57(1):77-83. doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.026. PMID: 22425622
- 4) Dominguez CL, Floyd DH, Xiao A, Mullins GR, Kefas BA, Xin W, Yacur MN, Abounader R, Lee JK, Wilson GM, Harris TE, Purow BW. Diacylglycerol kinase  $\alpha$  is a critical signaling node and novel therapeutic target in glioblastoma and other cancers. *Cancer Discov.* 2013 Jul;3(7):782-97. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0215. PMID: 23558954
- 5) Suzuki H, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. DNA methylation and cancer pathways in gastrointestinal tumors. *Pharmacogenomics.* 2008 Dec;9(12):1917-28. doi: 10.2217/14622416.9.12.1917. PMID: 19072648
- 6) Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer. *Mol Oncol.* 2012 Dec;6(6):567-78. doi: 10.1016/j.molonc.2012.07.007. PMID: 22902148
- 7) Nakano T, Iravani A, Kim M, Hozumi Y, Lohse M, Reichert E, Crotty TM, Stafforini DM, Topham MK. Diacylglycerol kinase  $\eta$  modulates oncogenic properties of lung cancer cells. *Clin Transl Oncol.* 2014 Jan; 16(1):29-35. doi: 10.1007/s12094-013-1036-y. PMID: 23572183
- 8) Cai K, Mulatz K, Ard R, Nguyen T, Gee SH. Increased diacylglycerol kinase  $\zeta$  expression in human metastatic colon cancer cells augments Rho GTPase activity and contributes to enhanced invasion. *BMC Cancer.* 2014 Mar 19;14:208. doi: 10.1186/1471-2407-14-208. PMID: 24646293