

174. 1C metabolism を介するエピゲノム変化と癌進展の関連

大西 紘太郎

岐阜大学 医学部附属病院 生体支援センター

Key words : 癌, epigenome, one carbon metabolism, NGS

緒言

これまで癌研究は遺伝子変異を中心とした研究がなされてきた。昨今の次世代シーケンサーの発達により、癌と genomics の関連性についての研究はさらに進み、あらゆる癌種において網羅的な遺伝子発現解析が行われている。また、癌と epigenome 状態変化についても研究され始めて久しい。筆者は 2014 年に遺伝子変異を認めず epigenome 状態変化のみで腫瘍を生じるマウスモデルを作製し報告している [1]。最近では柴田らが、膀胱癌マウスモデルに体細胞初期化の際に生じる epigenome 状態変化を強制的に引き起こすことで、膀胱癌の発生・進展が促進されることを報告している [2]。この様に、これまで多数の癌の発生や転移に関与する epigenome 状態変化が報告されている。しかしながら、これまで多数の報告にて癌と epigenome 状態変化の関連性が明らかになってきているものの、実際に高い有効性を示す epigenome 関連の癌治療薬やバイオマーカーの報告は少ない。これは、癌における epigenome 状態変化が、その他の要因に影響を受けている可能性を示唆している。

癌細胞の代謝に関しても古くから研究が盛んであるが、近年葉酸とメチオニン代謝を含む代謝経路である「one carbon metabolism (以下 1C metabolism)」に関する研究が注目されている。この 1C metabolism の経路内には DNA などにメチル基を供与する S-アデノシルメチオニン (SAM) が含まれており、1C metabolism と epigenome 状態変化との関連性についても研究が進められている。Filippos らは *Lkb1* 遺伝子及び *Kras* 遺伝子に変異を持つ膀胱癌マウスモデルを作製し、1C metabolism の経路に含まれるセリン代謝が DNA メチル化及び膀胱癌発生の制御に関与していることを明らかにしている [3]。

この様に代謝と癌、epigenome 状態変化の関連性について幾つかの研究がなされているが、その詳細については十分に解明されていない。そこで筆者は、癌の進展・転移と epigenome 状態変化に関与するその他の要因として 1C metabolism を候補とし、「癌の進展・転移」「epigenome 状態変化」「1C metabolism」の関連性を明らかにするため本研究を立案した。本研究の目的は、「癌・代謝・epigenome 状態変化」を結びつける全く新しいメカニズムを明らかにし、新規癌治療薬やバイオマーカーを発見することである。

方法

SAM は、DNA などに対してメチル基を付与する供与体として働くことが知られており、1C metabolism 経路内で生成された SAM が epigenome 状態変化を制御するという報告は以前からあった。しかし、報告のほとんどが培養細胞での評価であり、実際の生体内変化について論じた報告は少ない。そこで本研究ではより生理学的に癌の進展との関連性を評価するため、癌マウスモデルにコリン欠乏食を与えることで癌の進展に 1C metabolism 経路内の SAM を介した epigenome 状態変化が関与しているか検討する。コリンはメチオニン合成経路の上流に存在する物質であり、コリン欠乏食を与えることでその下流に存在するメチオニン濃度も低下し、1C metabolism の活性が低下することが予想される (図 1)。その活性が低下した状態で出現した腫瘍の epigenome 状態変化について WGBS や ChIP-seq により網羅的な解析を行い、腫瘍系性能や転移能と epigenome 状態変化との関連性を明らかにする。また、関連性をより明瞭にするため遺伝子発現の状態も網羅的に解析することが必要と考え、RNA-seq も行う。

本研究の最終目標はヒトの癌新規治療に繋がるメカニズムを同定することであり、上記による変化がヒトの癌でも認められるかを確認する必要がある。そこで筆者はヒト大腸癌細胞株、膵癌細胞株をそれぞれ使用し、1C metabolism 経路内の *MAT2A* 遺伝子を CRISPR/Cas9 の技術にて欠損させ、1C metabolism 活性が低下した癌細胞株を樹立した。これら *MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株と通常癌細胞株を各々免疫不全マウスの皮下に投与して、形成された皮下腫瘍及び転移性腫瘍を解析することで、1C metabolism を介した epigenome 状態変化と癌の進展との関連性を検討する (図 1)。

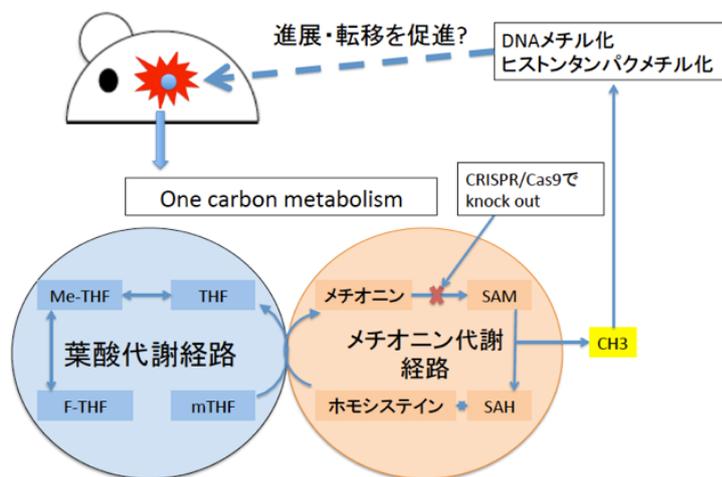


図 1. 本研究のシェーマ的イメージ

結果

まず、ヒト大腸癌細胞株である HCT116 及び膵癌細胞株である PANC1 に対して CRISPR/Cas9 の技術を用いて *MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株を樹立した (図 2)。CRISPR/Cas9 に関しては、Cas9 タンパクと sgRNA を同時に発現させることができる all-in-one plasmid を transfection することによって目的の遺伝子変異癌細胞株を樹立した。All-in-one plasmid は GFP も共発現する様に設計しており、transfection 後は FACS によって GFP 陽性細胞のみを single cell sort で分離し、得られた GFP 陽性細胞株の中からサンガーシーケンスにて変異が認められたものを *MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株とした。*MAT2A* 遺伝子発現は定量的 RT-PCR 及び Western blot 法にて遺伝子発現・タンパク発現が低下していることを確認した。

これら *MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株と通常癌細胞株を各々免疫不全マウスの皮下に投与した。形成された腫瘍を摘出し計測したところ、*MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株由来の腫瘍は通常癌細胞株由来の腫瘍より腫瘍径は大きかった。ホルマリン固定した後 HE 染色にて腫瘍組織を確認したところ、*MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株由来の腫瘍では、N/C 比の大きな未分化な細胞の増殖が認められた (図 3)。通常癌細胞由来の腫瘍では、元の癌種を模倣した組織学的特徴が認められたが、*MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株由来の腫瘍ではその様な組織学的特徴は認めなかった。*MAT2A* 遺伝子の変異により癌細胞の性質が変化していることが示唆されたため、各々の腫瘍細胞における遺伝子発現パターンと epigenome 状態変化を網羅的に解析することとした。腫瘍の遺伝子発現パターンに関しては、RNA-seq を行った。各々の腫瘍から RNA を抽出し RNA-seq を行った。

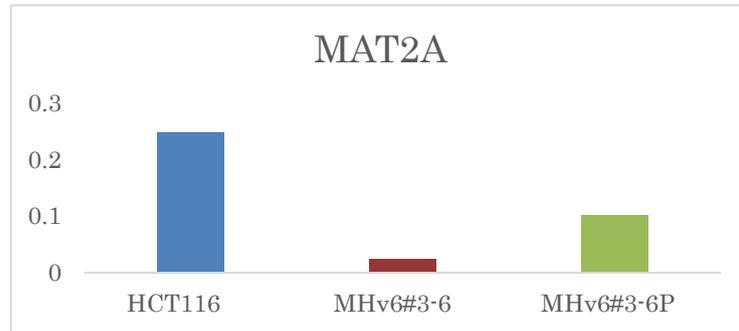


図2. *MAT2A* 遺伝子発現を定量的 RT-PCR にて確認した結果
グラフ内 MHv6 が *MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株。

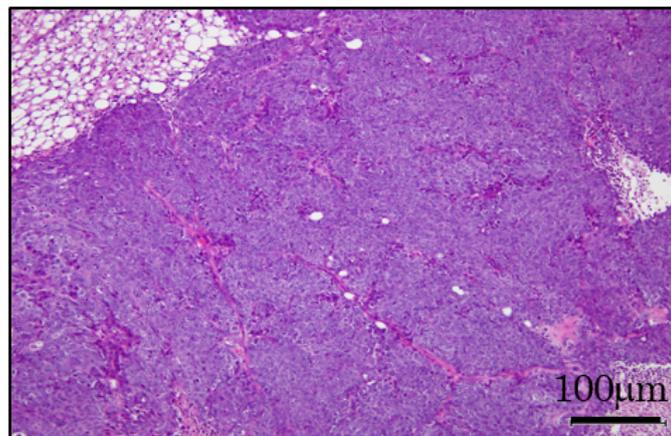


図3. *MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株を免疫不全マウスの皮下に投与し形成した腫瘍の HE 染色像
スケールバーは 100 μ m。

解析するサンプルは、通常癌細胞株・*MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株・通常癌細胞株由来の腫瘍・*MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株由来の腫瘍とし、サンプル数は各々 triplicate をとった。MDS 解析をしたところ、通常癌細胞株と *MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株は区別され、通常癌細胞株由来腫瘍と *MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株由来腫瘍とは区別された。これは *MAT2A* 遺伝子変異単独により癌細胞の性質が大きく変化したことが示唆された (図 4)。Heatmap を作成したところ、やはりこれら 4 群のサンプルは全て発現パターンが分かれており、ここからも *MAT2A* 遺伝子発現変化に伴い癌細胞の性質が大きく変化していることが示唆された。実際にどのような遺伝子群が変化しているのかを GO 解析を行い確認したところ、KDM family の遺伝子発現に有意な差が認められた。KDM family 遺伝子はヒストン修飾、特にヒストンタンパク残基のメチル化に関与する遺伝子群であり、KDM family 遺伝子の発現が変化しているということは、*MAT2A* 遺伝子変異に伴い、epigenome 状態変化が生じている可能性が高いことが示唆された。Epigenome 状態変化の網羅的解析のため、各々の細胞株及び各々の腫瘍細胞を使用して WGBS 及び ChIP-seq を行い、現在解析中である。これら epigenome 状態変化の解析結果と RNA-seq の解析結果を重ね合わせ、新たなメカニズムに関与しているであろう candidate gene や region を探し出していく。

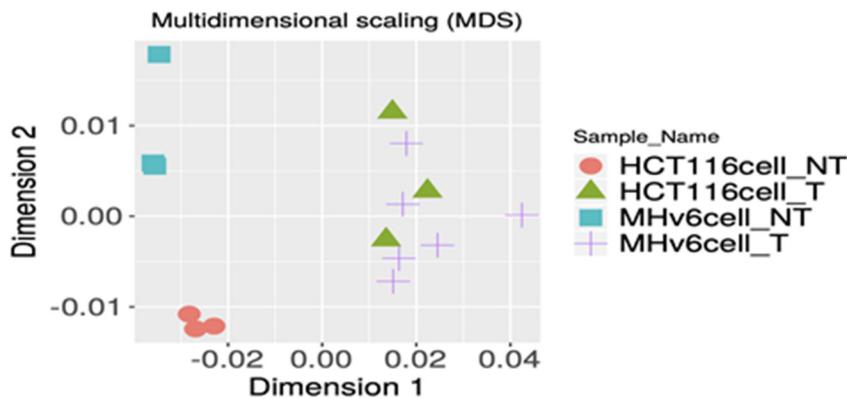


図 4. RNA-seq を行ったサンプルの MDS 解析結果

HCT116cell_NT が通常癌細胞株、HCT116_T が通常癌細胞由来の腫瘍、MHv6cell_NT が *MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株、MHv6cell_T が *MAT2A* 遺伝子変異癌細胞由来の腫瘍。

また同時に、癌マウスモデルを利用した実験も行っている。使用している癌マウスモデルは、大腸癌マウスモデルとして *Apc^{min}* マウス、膵癌マウスモデルとして *LSL-Kras^{G12D/+}*、*Pdx1-Cre*、*p53^{R271H/+}* マウス (以下 KPC マウス) を使用した。これら癌マウスモデルに対するコントロールとして C57BL/6 マウスを使用した。コントロールの C57BL/6 マウスと癌マウスモデルにコリン欠乏食もしくは通常食を与え、コリン欠乏食を与えた影響を観察した上で、癌の発生や転移の有無を観察した。コリンはメチオニン合成経路の上流に位置する物質で、コリン欠乏食を与えたマウスはメチオニン合成が低下し 1C metabolism が低下するため、食餌を変えるのみでその他環境要因を変化させることなく癌マウスモデルにおいて 1C metabolism 活性低下による発癌・癌の進展への影響を観察することができる。現在大腸癌マウスモデルである *Apc^{min}* マウスとコントロール群の C57BL/6 マウスへコリン欠乏食を与えて腫瘍を回収している段階であり、今後腫瘍における遺伝子発現解析や epigenome 状態変化の網羅的解析を行っていく予定である。

考 察

癌の進展と epigenome 状態変化についての研究はこれまで多数報告があり、関連性が明らかになってきているが未だ不透明な部分も大きい。実際、これまで epigenome 領域を標的とした癌治療薬やバイオマーカーは効果的なものが非常に少ない。この両者の関連性をより明確にすることで、より有用な癌治療薬やバイオマーカーの発見につながるのではないかと考えている。筆者は、実際に癌の発生・進展には epigenome 状態変化の他に多数の要因が複雑に関与しているのではないかと考え、その一つの候補として 1C metabolism を挙げた。実際、ヒト癌細胞株で 1C metabolism 経路関連遺伝子の一つである *MAT2A* 遺伝子発現を低下させた *MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株では、通常癌細胞株と比較して、免疫不全マウスの体内で形成する腫瘍が大きく、組織学的検討をすると未分化な細胞集団が増生していた。通常大腸癌細胞株由来の腫瘍が、原発となる腺組織の形状を残しながら腫瘍を形成するのに比べ、*MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株では腺構造を認めることはなかった。これは *MAT2A* 遺伝子変異に伴う発現変化により、癌細胞の性質が変化しより浸潤能や転移能が高い細胞に変化したことを示唆している。*MAT2A* 遺伝子変異により遺伝子発現にどのような変化が生じたかを確認するため RNA-seq にて網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、通常癌細胞株由来の腫瘍と *MAT2A* 遺伝子変異癌細胞株由来の腫瘍では MDS 解析や heatmap 上明らかに遺伝子発現のパターンが変化していた。これは、上述の組織学的変化と同様に、*MAT2A* 遺伝子変異によって癌細胞の性質が遺伝子発現としても大きく変化していることを示唆している。GO 解析により、KDM family 遺伝子群の発現が変化していることがわかった。KDM family 遺伝子群はヒストン修飾を中心とした epigenome 状態変化に関与する遺伝子群であることが知られており、*MAT2A* 遺伝

子変異により 1C metabolism 活性が低下するとともに epigenome 状態変化も変化している可能性が高いことが示唆された。現在 WGBS 及び ChIP-seq により網羅的な epigenome 状態変化の解析を行っているが、これらの解析結果と遺伝子発現の結果を重ね合わせ癌の進展と 1C metabolism を介した epigenome 状態変化の新たな関連性を明らかにしていきたいと考えている。

また、生体内の微小環境が癌細胞の epigenome 状態に影響する可能性があるため、癌マウスモデルを使用し研究を進めている。マウス生体内で 1C metabolism 活性を低下させる手法が問題であったが、コリン欠乏食を与えることで 1C metabolism 活性が低下することが明らかになったため、今回はこの手法を用いた。本手法の利点は食餌を変更するのみで他にマウスの生体内に影響を与える様な手法を用いる必要がないことである。現在コリン欠乏食を与えているマウスの腫瘍摘出から解析を進めている段階であり、こちらでもヒト癌細胞で認められた関係性が認められれば今後の新規癌治療薬や有用なバイオマーカーの発見につながるのではないかと期待している。

共同研究者・謝辞

ご指導いただいている岐阜大学医学系研究科消化器内科学講座清水教授、岐阜大学 医学部動物実験施設所属の方々に心より感謝する。

文 献

- 1) Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Yamanaka S, Woltjen K, Yamada Y et al. Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*. 2014 Feb 13;156(4):663-77. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.005. PubMed PMID: 24529372
- 2) Shibata H, Komura S, Yamada Y, Sankoda N, Tanaka A, Ukai T, Kabata M, Sakurai S, Kuze B, Woltjen K, Haga H, Ito Y, Kawaguchi Y, Yamamoto T, Yamada Y. In vivo reprogramming drives Kras-induced cancer development. *Nat Commun*. 2018 May 25;9(1):2081.
- 3) Kottakis F, Nicolay BN, Roumane A, Karnik R, Gu H, Nagle JM, Boukhali M, Hayward MC, Li YY, Chen T, Liesa M, Hammerman PS, Wong KK, Hayes DN, Shirihai OS, Dyson NJ, Haas W, Meissner A, Bardeesy N. LKB1 loss links serine metabolism to DNA methylation and tumorigenesis. *Nature*. 2016 Nov 17;539(7629):390-395.