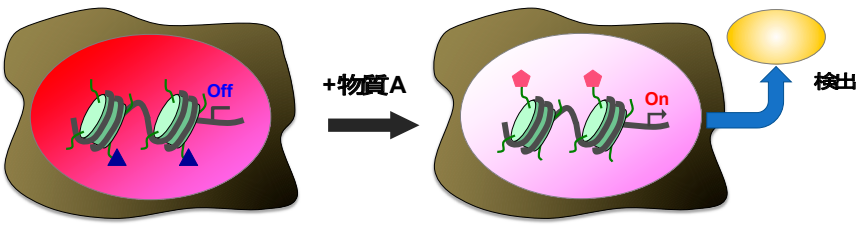
73　エピゲノムを変化させる物質のスクリーニング細胞系	山下　聡

【目的】がん細胞には正常細胞に無いゲノム異常が認められるが、それ以上の数のエピゲノム異常が認められる。特に小児固形腫瘍の多くはドライバー変異に乏しく、エピゲノム異常が密接に病態と関連する。実際に DNA メチル化酵素の阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤が治療薬として認可されている。そのため、エピゲノムを変化させる物質は、がんを含む各種疾患の予防や治療のシード化合物になり得ると考えられる。しかしその探索として特定のエピゲノム関連酵素を標的に阻害剤のハイスループットスクリーニングが行われているが有用な探索方法は無いといえる。そこで本研究では、最近充実してきたエピゲノムの大規模情報に注目した。公的データベースを含む各種エピゲノムのデータを入手、バイオインフォマティクスの手法を用いてスクリーニングに適する標的遺伝子と細胞株の組み合わせを同定、標的遺伝子のエピゲノムが変化したときの産物を検出できるようにすることで、細胞ベースでエピゲノムの変化異常を誘発する物質を高感度に検出する系（図）を新たに構築することを目的とした。

【方法】細胞株とその処理 LoVo、CW-2、HCT116、DLD-1、HT-29、Caco-2、HepG2、HuH-7、Jhh4、HLF、A172、T98G、No11、KALS-1、EN の各細胞株は、理化学研究所細胞材料開発室、JCRB 細胞バンク、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター・細胞バンクから分与を受けた。一部の細胞株は酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、バルプロ酸ナトリウム各 20 mM を含む培地で 24 時間培養した。データベース解析 各がん種の細胞株の DNA メチル化については、GEO の GSE68379 における HM450K で解析したデータを用いた。変異については、COSMIC の Cell Lines Project のデータを用いた。RNA-seq 解析　Stranded RNA-seq は、Novogene 社において、NEBNext UltraII Directional RNA Library Prep Kit を用いてライブラリを合成、MGI DNBSEQ-T7 を用いてシークエンシングすることによって行った。配列の QC は Fastp、マッピングは Star を用いて行い、RSEM を用いて TPM を計算することによって各遺伝子の定量を行った。

【結果】1. 網羅的ゲノム解析結果の活用による細胞の選定：DNA メチル化酵素にゲノム異常が無く、脱メチル化酵素 TET1〜3 の全てが変異で不活化している細胞株を探索した結果、子宮内膜癌細胞株 EN 1 個のみが該当することを見出した。全ゲノム中 48 万 5 千箇所の CpG のメチル化レベルの平均値は EN で 0.604 と最も高い値を示すことが明らかになった。以上の結果は、EN 細胞株は DNA メチル化異常が起きやすく、メチル化異常のスクリーニングに適していることを示している。EN 細胞株を既知の DNA メチル化誘導因子で処理し、DNA メチル化誘導の起きやすい遺伝子を同定すると共に、エピゲノム変化と並行して起きるスクリーニングにおける検出に適した変化の同定を試みている。2. 短鎖脂肪酸によるエピゲノム変化の誘導：大腸がん細胞株を酪酸およびプロピオン酸と、バルプロ酸を用いて CW-2 と Caco-2 を処理し、遺伝子発現変化を RNA-seq により解析した結果、特にポリアミンの代謝に関連する遺伝子（*ODC1*, SAT1）の大幅な発現変化が認められた。ポリアミンの物質量を HPLC-MS により解析する試みを進めている。その一方で、プロピオン酸にのみ重要ながん関連遺伝子を含む多くの遺伝子についてスプライシング異常を認めた。以上、本研究の目的であるエピゲノムの変化異常を誘発する物質を高感度に検出する系を新たに構築することは期間内に完了できなかったが、多くの興味深い知見を得ることができた。今後も研究を継続し、初期目的の達成を目指す。

本研究における細胞系スクリーニングシステムの模式図



73. エピゲノムを変化させる物質のスクリーニング細胞系

山下　聡

前橋工科大学 工学部 生命工学領域

Key words：エピゲノム，DNA メチル化，がん細胞，スクリーニング

緒　言

がん細胞には正常細胞に無いゲノム異常が認められるが、それ以上の数のエピゲノム異常が認められる。特に小児固形腫瘍の多くはドライバー変異に乏しく、エピゲノム異常が密接に病態と関連する。エピゲノム異常の制御は関連酵素の阻害剤により一部可能であり、実際に DNA メチル化酵素の阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤が治療薬として認可されている。そのため、エピゲノムを変化させる物質は、エピゲノムの機構の解析に有用であると共に、がんを含む各種疾患の予防や治療のシード化合物になり得ると考えられる。エピゲノムを変化させる物質の同定は重要な研究課題であることは世界的共通認識と考えられる。しかしその探索としては、特定のエピゲノム関連酵素を標的に阻害剤のハイスループットスクリーニングが行われているが、これまでの内外で目立った結果は認められないため、この手法には限界があり、現状ではエピゲノムを変化させる物質の有用な探索方法が無いといえる。今までのエピゲノムを変化させる物質の発見は、他の研究で偶然見いだされたものが後で実はエピゲノムを変化させる物質であったことがわかったことに限定される（例えば FK228［1］）。これは効率重視の酵素ベースであることに起因すると思われる。クロマチンを含めた立体構造が重要で多数の酵素が働くエピゲノムについては細胞ベースによる検討が重要と考えられる。細胞ベースの重要性については、メラノーマ治療薬トラメチニブの創製にも貢献した京都府立医大酒井敏行教授が常々強調している。

そこで本研究では、最近充実してきたエピゲノムの大規模情報に注目した。公的データベースを含む各種エピゲノムのデータを入手、バイオインフォマティクスの手法を用いてスクリーニングに適する標的遺伝子と細胞株の組み合わせを同定、標的遺伝子のエピゲノムが変化したときの産物を検出できるようにすることで、細胞ベースでエピゲノムの変化異常を誘発する物質を高感度に検出する系（図 1）を新たに構築することを目的とした。最近の自身の研究でゲノム､エピゲノム情報解析の研究と腫瘍細胞の分子生物学的解析の両方を行っており、生物情報解析との融合による細胞系スクリーニングシステムの構築を発想したことが本研究の動機になっている。既存の研究では酵母やマウス細胞を用いることがあるが、エピゲノムは細胞の高度な機能に関わり、その仕組みは生物種によって異なるため、本研究ではヒト細胞を用いた。

方　法

1. 細胞株とその処理

LoVo、CW-2、HCT116、DLD-1、HT-29、Caco-2（大腸がん由来）、HepG2、HuH-7、Jhh4［2］、HLF（肝がん由来）、A172、T98G、No11、KALS-1（脳腫瘍由来）、EN（子宮内膜がん由来）の各細胞株は、理化学研究所細胞材料開発室、JCRB 細胞バンク、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター・細胞バンクから分与を受け、指定の培養条件で培養した。一部の細胞株は酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、バルプロ酸ナトリウム各 20 mM を含む培地で 24 時間培養して細胞を回収した。細胞数の計測は Countess 自動細胞カウンター（Thermo Fisher Scientific）または Cell Counting Kit-8（Dojindo）を用いて行った。

2. データベース解析

DNA メチル化データベースについては、各がん種の細胞株について、GEO データベースの GSE68379 における 1,001 株を Illumina 社の Infinium HumanMethylation 450K（450K）で解析したデータ［3］を用いた。各がん組織については、The Cancer Genome Atlas（TCGA）に登録されている HM450K のデータをポータルサイトである MEXPRESS［4］から、個別のがん組織、遺伝子についてダウンロードすることによって解析した。ヒストン修飾に関しては、ENCODE プロジェクトのデータ［5］を用いた。がん細胞株の変異については、COSMIC（Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer）の Cell Lines Project のデータを用いた。正常組織における遺伝子発現については、GTEx（The Genotype-Tissue Expression）のデータを用いた。

3. RNA-seq 解析

総 RNA は ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて抽出した。Stranded RNA-seq は、Novogene 社において、mRNA を oligo d(T) beads で回収し、NEBNext UltraII Directional RNA Library Prep Kit（NEB）を用いてライブラリを合成、MGI DNBSEQ-T7 を用いてシークエンシングすることによって行った。得られた配列の QC は Fastp、マッピングは Star を用いて Hg38 レファレンス上に行い、RSEM を用いて TPM を計算することによって各遺伝子の定量を行った。IGVtools を用いて BAM ファイルを tdf ファイルに変換し、IGV を用いて図示した。

4. RT-qPCR による遺伝子発現解析

cDNA 合成は FastGene Scriptase Ⅱ（日本ジェネティクス）を用い、RT-qPCR には KOD SYBR qPCR Mix（東洋紡）を用いて行った。PCR 産物を標品とした検量線を用いてコピー数を定量、内在性コントロールとして *GAPDH* を使用して遺伝子発現量を比較した。

5. DNA メチル化解析

ゲノム DNA の重亜硫酸処理は EZ DNA Methylation Kit（Zymo Research）を用いて行い、処理後 DNA を専用のプライマーを用いて PCR で増幅、Oxford Nanopore を用いてシークエンシングすることにより個別領域の DNA メチル化の解析を行った。

6. 細胞株への遺伝子導入

ヒト遺伝子 CDS の増幅は KOD One PCR Master Mix（東洋紡）を用いて行った。PiggyBac cDNA Cloning and Expression Vector に NEBuilder（NEB）を用いて挿入し、Super PiggyBac Transposase Expression Vector とともに、Transit-2020 を用いて各細胞株に導入した。クローンはピューロマイシンを用いて選択した。

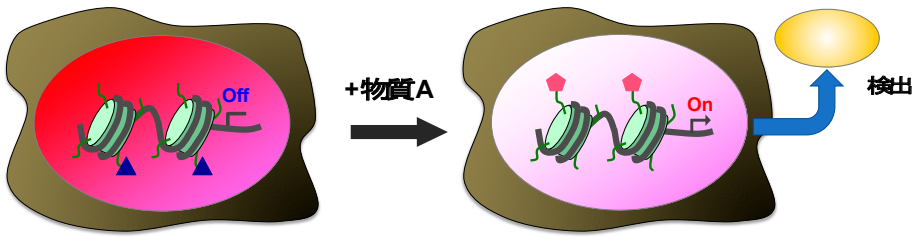


図 1. 本研究における細胞系スクリーニングシステムの模式図

用いる細胞のエピゲノムにより発現が抑制されている標的遺伝子の発現制御領域（左）において、特定の物質 A によりエピゲノムの変化が誘発され、標的遺伝子の発現が誘導される（右）。この標的遺伝子産物あるいはその下流の遺伝子産物が多量でかつ分泌性で、高感度に検出可能、もしくは検出可能な物質を誘導するレポーター遺伝子に（遺伝子操作で）改変されていれば有用なスクリーニングシステムとして成立する。

結果および考察

1. 網羅的ゲノム解析結果の活用による細胞の選定

まず、COSMIC の Cell Lines Project におけるがん細胞株の変異のデータを用いて、エピゲノム関連酵素をコードする遺伝子の変異に注目したところ、これまでのヒト細胞を用いた DNA 脱メチル化物質探索で用いられた、HCT116 大腸癌細胞株（遺伝子導入・相同組換えが容易な汎用細胞株のためによく用いられてきた）は脱メチル化酵素 *TET1～3* のうち最も発現の高い *TET3* をフレームシフト変異で欠いているため、脱メチル化物質のスクリーニングに不適であったことが判明した。

さらに、*DNMT* 等 DNA メチル化酵素にゲノム異常が無く、脱メチル化酵素 *TET1～3* の全てが変異で不活化している細胞株を探索した結果、子宮内膜癌細胞株 EN 1 個のみが該当することを見出した。GEO データベースの GSE68379 における 1,001 株を HM450K で解析した DNA メチル化のデータによると全ゲノム中 48 万 5 千箇所の CpG のメチル化レベルの平均値はがん細胞株の殆どは 0.4～0.55 を示す一方で、EN 細胞株は 0.604 と最も高い値を示すことが明らかになった。以上の結果は、EN 細胞株は DNA メチル化異常が起きやすく、メチル化異常のスクリーニングに適していることを示している。そして本研究における網羅的ゲノム解析結果の活用による細胞、細胞環境の選定という独自の戦略の有効性が確認できたと考えられた。

そこで EN 細胞株を既知の DNA メチル化誘導因子で処理し、DNA メチル化誘導の起きやすい遺伝子を同定すると共に、エピゲノム変化と並行して起きるスクリーニングにおける検出に適した変化の同定を試みた。以前の研究［6］で示した DNA メチル化誘導を進めているが、長期培養が必要であり、2024 年 4 月時点で完了していない。

2. 短鎖脂肪酸によるエピゲノム変化の誘導

DNA メチル化以外のエピゲノム変化として、ヒストン脱アセチル化阻害（HDACi）がよく知られ、有力である。そこでがん細胞株に HDACi を投与することで実験的に誘導し、スクリーニングに好適な遺伝子あるいは代謝物変化を同定することを試みた。そのために、HDACi 活性が知られ、腸内細菌の代謝物としても知られる短鎖脂肪酸の一種である酪酸およびプロピオン酸と、同様に短鎖脂肪酸であり、薬剤としても知られるバルプロ酸を用いて大腸がん細胞株 CW-2 と Caco-2 を処理し、遺伝子発現変化を RNA-seq により解析した。

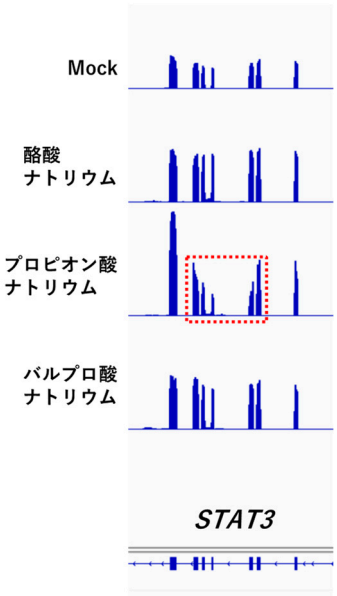


図 2. プロピオン酸特異的な *STAT3* のスプライシング異常の誘導を示す RNA-seq の結果
STAT3 についてはプロピオン酸のみについて発現亢進とスプライシング異常が認められた。

その結果、両化合物ともにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤としての既知の発現変化が多数の遺伝子について確認できた。新規な発現変化について探索したところ、特にポリアミンの代謝に関連する遺伝子（*ODC1*、*SAT1*）の大幅な発現変化が認められた。ポリアミンであるプトレッシン、スペルミジン、スペルミンがスクリーニング候補物質として考えられたので、現在処理前後における細胞内のこれらの物質量を HPLC-MS により解析する試みを進めている。

その一方で、プロピオン酸にのみ *AKT1*、*BRD9*、*STAT3*、*SMAD4* など重要ながん関連遺伝子を含む多くの遺伝子についてスプライシング異常を認めた（投稿準備中）（図 2）。この結果はエピゲノム変化をスクリーニングするための細胞系の構築には直接関係しないが、エピゲノム異常、スプライシング異常の双方を誘導する腸内細菌代謝物の存在を明らかにしたと共に、これらの探索が可能になれば食品関連物質の新規の健康影響評価や生体機能解析に繋がることを示している。

3. がん種特異的 DNA メチル化の解析

GEO データベースの GSE68379 における 1,001 株を HM450K で解析した DNA メチル化のデータの解析中、特定のがん種にのみ DNA メチル化異常を示す遺伝子は特定の環境においてのみ、その DNA メチル化異常が細胞にとって有利に働くため、脱メチル化を受けやすく、そのスクリーニングに有用な遺伝子ではないかと考えられた。そこでがん種特異的なメチル化異常を探索し、遺伝子発現調整に重要なプロモーター領域 CpG アイランドに限定したところ、大腸がんで 54 個、肝臓がんで 40 個、脳腫瘍で 33 個の遺伝子が同定できた。このうち、肝臓がんで特異的にメチル化異常が認められる *FXYD5* 遺伝子は細胞接着の負の制御に関与し［7］、*BCAT2* 遺伝子はアミノ酸代謝に関与している［8］興味深い遺伝子である。各遺伝子の発現解析を行ったところ、プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化を示す細胞株では発現量が低下していることが確認できた（図 3）。これらの脱メチル化のしやすさを解析するとともに、遺伝子の機能についても解析した。*FXYD5* が DNA メチル化により不活化している HepG2 細胞株に *FXYD5* を遺伝子導入することによって細胞接着性の低下が認められた。*BCAT2* が DNA メチル化により不活化している HepG2 細胞株では同等の機能を有する *BCAT1* の発現抑制により脆弱性を呈すると予想されるので研究を進めている。

以上、本研究の目的である細胞ベースでエピゲノムの変化異常を誘発する物質を高感度に検出する系を新たに構築することは設定された研究期間内に完了できなかったが、多くの興味深い知見を得ることができた。今後も研究を継続し、初期目的の達成を目指す。

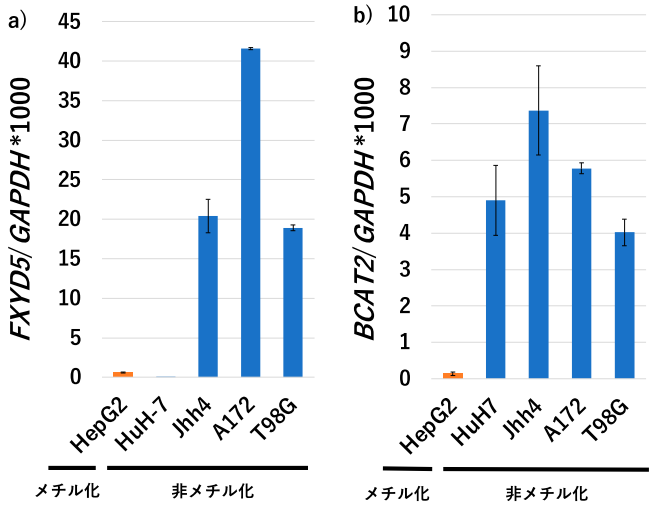


図 3. 各がん細胞株における遺伝子発現量

FXYD5 遺伝子（a）、*BCAT2* 遺伝子（b）。がん種特異的メチル化遺伝子のプロモーター領域 CpG アイランドのメチル化によるサイレンシングが確認できた。表記は Mean±SD。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、前橋工科大学工学部生命工学領域の蒔田由布子である。本研究助成の申請時からのお力添えに謝意を表したい。

文　献

1) H Nakajima, Y B Kim, H Terano, M Yoshida, S Horinouchi. FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. Exp Cell Res 1998 May 25;241(1):126-33. PMID: 9633520 DOI: 10.1006/excr.1998.4027

2) S Hasumura, H Sujino, S Nagamori, H Kameda. Establishment and characterization of a human hepatocellular carcinoma cell line JHH-4. Hum Cell. 1988 Mar;1(1):98-100. PMID: 2856444

3) F Iorio, TA Knijnenburg, DJ Vis, *et al.* A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. Cell 2016 Jul 28;166(3):740-754. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.017. PMID: 27397505 DOI: 10.1016/j.cell.2016.06.017.

4) A Koch, TD Meyer, J Jeschke, WV Criekinge. MEXPRESS: visualizing expression, DNA methylation and clinical TCGA data. BMC Genomics 2015 Aug 26;16(1):636. PMID: 26306699 DOI: 10.1186/s12864-015-1847-z

5) ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature 2012 Sep 6;489(7414):57-74. PMID: 22955616 DOI: 10.1038/nature11247

6) H Takeshima, T Niwa, S Yamashita, *et al.* TET repression and increased DNMT activity synergistically induce aberrant DNA methylation. J Clin Invest 2020 Oct 1;130(10):5370-5379. PMID: 32663196 DOI: 10.1172/JCI124070

7) IL Gotliv. FXYD5: Na(+)/K(+)-ATPase Regulator in Health and Disease. Front Cell Dev Biol. 2016 Mar 30:4:26. PMID: 27066483 DOI: 10.3389/fcell.2016.00026

8) X Nong, C Zhang, J Wang, *et al.* The mechanism of branched-chain amino acid transferases in different diseases: Research progress and future prospects. Front Oncol. 2022 Sep 2:12:988290. PMID: 36119495 DOI: 10.3389/fonc.2022.988290