

マウス皮膚腫瘍特異的 DNA メチル化領域を用いた
新規ヒト神経芽腫関連遺伝子の探索（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程
生理系機能生理学専攻

星 玲奈

修了年 2015 年

指導教官：越永 従道

【緒言】

神経芽腫は交感神経系，とくに副腎髄質や傍脊椎交感神経節から発生する胎児性腫瘍である．本症の平均発症年齢は17か月（1），発症頻度はおよそ1万人に1人であり，小児の悪性固形腫瘍の中では頭蓋内病変を除き最も頻度が高い（2）．治療は化学療法，放射線療法，手術療法などを組み合わせた集学的治療で行われる．化学療法としては，アルキル化剤である cyclophosphamide（以下，CPA）やアントラサイクリン系薬剤である pirarubicin（以下，THP-ADR），抗がん性抗生物質である doxorubicin（以下，Dox），白金製剤である cisplatin（以下，CDDP）などが併用され，進行例では造血幹細胞移植が行われることもある．乳児期に発見される症例は予後良好であるが，18か月以上で発見される症例や遠隔転移を伴う症例では上記のような強力な治療が行われているにも関わらず，5年生存率は40%以下にとどまっている（3）．生存症例においても化学療法による晩期障害や二次癌の発症が深刻な問題となっており，治療の軽減や予後改善のための新規治療薬の開発と，それを可能にする新たな治療標的の発見が喫緊の課題である．

近年，DNAメチル化の異常が様々な腫瘍の発生・進展に関与することが報告されており，精力的に研究が進められている．DNAメチル化とはDNAのシトシン塩基炭素5位がメチル基（-CH₃）に置換されるDNA修飾機構で，塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構のひとつである．DNAメチル化の変化は，その領域の近傍の遺伝子の発現レベルを調整することで組織の発生・分化などの制御に寄与する．一方で，DNAメチル化の異常は遺伝

子発現の異常を引き起こし、様々な腫瘍の発生に関与する (4)。多くの腫瘍において腫瘍関連遺伝子群の発現調整領域に位置する CpG island のメチル化の異常により当該遺伝子の発現状態に異常が起こり、形質の変化に至っていることが確認されている (5)。このことから、DNA メチル化異常領域のスクリーニングにより治療標的になり得る新規の腫瘍関連遺伝子が見つかる可能性が高い。

これまでに我々は、マウスにおける精巣特異的 DNA メチル化領域や、皮膚腫瘍モデルマウスにおける腫瘍組織特異的 DNA メチル化領域のヒト相同領域を、神経芽腫において検討することによって新規予後規定因子となり得る候補遺伝子群を発見してきた (6-8)。これらは、遺伝的背景や飼育環境、腫瘍の誘因がコントロールされたマウス検体から得られたデータをもとにした解析は不均一性の高いヒト検体を用いたスクリーニングでは見落とされている腫瘍関連遺伝子群の発見につながる可能性が高いという考えに基づいている。とくに、皮膚腫瘍は神経芽腫と同じ外胚葉由来であることから、皮膚腫瘍モデルマウスの解析より得られた候補遺伝子群はヒト神経芽腫関連遺伝子をスクリーニングする上での貴重なソースであると言える。しかし、これまでの解析では当該メチル化異常が遺伝子発現、さらには形質の変化に関与しているかどうか不明瞭であった。

そこで我々は、2 段階化学発癌プロトコールに基づいて皮膚腫瘍モデルマウスを作製し、その正常皮膚組織および皮膚腫瘍組織を用いて遺伝子発現解析と DNA メチル化解析を網羅的に行った。これら 2 つの解析結果から、正常皮膚組織と比較し皮膚腫瘍組織において低

発現かつ高メチル化状態であった領域を 4 領域 (4 遺伝子), 逆に高発現かつ低メチル化状態であった領域を 51 領域 (41 遺伝子) 認めた. これらの遺伝子群の発現変化を正常組織と腫瘍組織との間で比較したところ, DNA メチル化変化を伴うことが明らかになった. したがって, これらの遺伝子群は癌の発生・進展に関与する腫瘍関連遺伝子群である可能性が強く示唆された (9). この 55 領域 (45 遺伝子) のうち, ヒト相同領域を認め, CpG island が 1kb 以内に位置し, 未だヒト神経芽腫で DNA メチル化異常の報告がない遺伝子は 16 領域 (16 個) であった.

【目的】

皮膚腫瘍モデルマウスの解析より絞り込まれた腫瘍組織特異的 DNA メチル化領域のヒト神経芽腫への関与の可能性を実験的に検証することで, 神経芽腫の新規腫瘍関連遺伝子を探索する.

【方法】

材料にはヒト神経芽腫細胞株 (NB1, NB9, NB69, SK-N-SH), 神経芽腫腫瘍検体 19 検体, 比較対照として正常副腎組織 3 検体を用いた. 皮膚腫瘍モデルマウスを用いた解析から絞り込まれた 16 個の遺伝子につき, まず Real-time RT-PCR で遺伝子発現解析を, 次に Sequenom MassARRAY® EpiTYPER™ で DNA メチル化解析を行った. その結果絞り込まれた遺伝子につき, 培養系で脱メチル化剤 5-aza-2 deoxycytidine を用いて DNA メチル化による遺伝子発現制御機構を解析した.

2 群間の平均の差の検定は t 検定を用いて行った。遺伝子発現レベルと DNA メチル化レベルの相関は Spearman の順位相関係数より求めた。P<0.05 を統計学的有意差があるとした。

【結果】

前述の 16 個の遺伝子につき、ヒト神経芽腫細胞株を用いて遺伝子発現解析と DNA メチル化解析を行った結果、*TFAP2E* が正常副腎組織と比較しすべての細胞株で有意 (P<0.01) に高発現であり、その promoter 領域および intron 3 領域の CpG island はいずれも有意 (P<0.01) に高メチル化状態であった。*TFAP2E* につき神経芽腫腫瘍検体を用いて同様に解析したところ、*TFAP2E* は正常副腎組織と比較し腫瘍検体で有意 (P<0.01) に高発現であり、その promoter 領域および intron 3 領域の CpG island はいずれも有意 (P<0.01) に低メチル化状態であった。また、腫瘍検体の遺伝子発現レベルと DNA メチル化レベルの相関分析では、promoter 領域の CpG island において有意 (P<0.05) な正の相関を認めた (Spearman の順位相関係数 0.490)。遺伝子発現レベルと DNA メチル化レベルに有意な相関を認めた promoter 領域の CpG island について、培養系で脱メチル化剤 5-aza-2 deoxycytidine を用いて *TFAP2E* の発現制御機構を解析したところ、5-aza-2 deoxycytidine 非添加群と比較し添加群で有意 (P<0.01) に高発現・低メチル化状態を示した。

【考察】

2011 年までにヒト神経芽腫と DNA メチル化異常との関連についておよそ 75 の原著論文が記載されている (10)。2000 年に初めて神経芽腫において caspase-8 (以下、*CASP 8*) と

DNA メチル化異常との関連が報告され (11) , それ以降, 神経芽腫において RAS-association domain family 1 isoform A (*RASSF1A*) (12) など *CASP 8* 以外のアポトーシス関連因子と DNA メチル化異常との関連が相次いで報告された.

これまでに我々は, マウスにおける精巢特異的 DNA メチル化領域や, 皮膚腫瘍モデルマウスにおける腫瘍組織特異的 DNA メチル化領域のヒト相同領域を, 神経芽腫において解析することによって新規予後規定因子群を発見してきた (6-8) . これらの解析では当該メチル化異常が遺伝子発現, さらには形質の変化に関与しているかどうか不明瞭であった. 本研究では, DNA メチル化変化だけでなく, その近傍の遺伝子の発現変化を伴う遺伝子を解析の対象として抽出した. この点から, 既存の報告と比較し, 腫瘍の発生・進展に関与する腫瘍関連遺伝子を発見し得る可能性がより高いと考えられた.

本研究の解析の結果, *TFAP2E* が正常副腎組織と比較してすべての細胞株で有意に高発現であり, promoter 領域と intron 3 領域の CpG island はいずれも高メチル化状態であった.

TFAP2E は正常副腎組織と比較し腫瘍検体で有意 ($P < 0.01$) に高発現であり, promoter 領域および intron 3 領域の CpG island はいずれも低メチル化状態であった. また, 腫瘍検体の遺伝子発現レベルと DNA メチル化レベルの相関分析では, promoter 領域の CpG island において有意 ($P < 0.05$) な相関を認めた. メチル化レベルが細胞株と腫瘍検体とで逆を示す傾向はヒト肺癌でも認められる (13) . 腫瘍細胞を株化する際にメチル化レベルが一部変化することが知られており, 理由のひとつであると考えられる (14) .

腫瘍検体の遺伝子発現レベルと DNA メチル化レベルに有意な相関を認めた promoter 領域の CpG island が *TFAP2E* の遺伝子発現を制御しているか脱メチル化剤 5-aza-2 deoxycytidine を用いて解析したところ、5-aza-2 deoxycytidine 非添加群と比較し添加群で *TFAP2E* の遺伝子発現が有意に高くなり、promoter 領域の CpG island の DNA メチル化レベルは有意に低下した。*TFAP2E* は転写因子である transcription factor activator protein-2 epsilon をコードし、とくに正常皮膚組織やケラトサイトで発現している (15)。腫瘍と DNA メチル化異常との関連について現在までに大腸癌 (16) および前立腺癌 (17) で報告されている。前者では、74 例中 38 例の大腸癌患者に *TFAP2E* の高メチル化状態を認めたが、メチル化レベルと既存の予後因子と相関は認めなかった。また、この 74 例のうち 28 例の遺伝子発現を検討したところ、高メチル化状態であった 12 例で低発現を認めた。さらに、*TFAP2E* の下流に存在し *TFAP2E* によって down regulation されている Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 4 (*DKK4*) の遺伝子発現が *TFAP2E* の脱メチル化により亢進し fluorouracil の感受性が亢進したことから、大腸癌における *TFAP2E* の高メチル化状態が fluorouracil の抵抗性に関与していることが示唆されている。後者では、腫瘍生検で陰性と判定された前立腺癌患者において尿中の *TFAP2E* の DNA メチル化の検出が診断に有用であり、バイオマーカーとしての有用性が示唆されているが、*TFAP2E* の発現については言及していない。本研究では、*TFAP2E* は正常副腎組織と比較し腫瘍検体で有意に高発現であることからヒト神経芽腫の腫瘍関連

遺伝子である可能性が示唆され, その遺伝子発現は promoter 領域の CpG island の DNA メチル化により制御を受けている可能性が示唆される.

【結語】

TFAP2E はヒト神経芽腫の新規腫瘍関連遺伝子であり, その遺伝子発現は promoter 領域に存在する CpG island の DNA メチル化により制御を受けている可能性が示唆される.

【引用文献】

1. London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL: Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2005;23:6459-6465.
2. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR: Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER program 1975-1995. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1999. NIH publication no. 99-4649.
3. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL: Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369:2106-2120.
4. Jones PA, Baylin SB: The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128:683-692.
5. Sharma S, Kelly TK, Jones PA: Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:27-36.
6. Kawashima H, Sugito K, Yoshizawa S, Uekusa S, Furuya T, Ikeda T, Koshinaga T, Shinojima Y, Hasegawa R, Mishra R, Igarashi J, Kimura M, Wang X, Fujiwara K, Gosh S, Nagase H: DNA hypomethylation at the ZNF206-exon 5 CpG island associated with neuronal differentiation in mice and development of neuroblastoma in humans. *Int J Oncol* 2012;40:31-39.
7. Sugito K, Kawashima H, Uekusa S, Yoshizawa S, Hoshi R, Furuya T, Kaneda H, Hosoda T, Masuko T, Ohashi K, Ikeda T, Koshinaga T, Fujiwara K, Igarashi J, Ghosh S, Held WA, Nagase H: Identification of aberrant methylation regions in neuroblastoma by screening of

- tissue-specific differentially methylated regions. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:383-389.
8. Sugito K, Kawashima H, Yoshizawa S, Uekusa S, Hoshi R, Furuya T, Kaneda H, Hosoda T, Konuma N, Masuko T, Ohashi K, Ikeda T, Koshinaga T, Tomita R, Shinojima Y, Fujiwara K, Watanabe T, Held WA, Nagase H: Non-promoter DNA hypermethylation of Zygote Arrest 1 (ZAR1) in neuroblastomas. *J Pediatr Surg* 2013;48:782-788.
 9. Fujiwara K, Ghosh S, Liang P, Morien E, Soma M, Nagase H: Genome-wide screening of aberrant DNA methylation which associated with gene expression in mouse skin cancers. *Mol Carcinog* 2013 [Epub ahead of print]
 10. Decock A, Ongenaert M, Vandesompele J, Speleman F: Neuroblastoma epigenetics: from candidate gene approaches to genome-wide screenings. *Epigenetics* 2011;6:962-970.
 11. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ: Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000;6:529-535.
 12. Astuti D, Agathangelou A, Honorio S, Dallol A, Martinsson T, Kogner P, Cummins C, Neumann HP, Voutilainen R, Dahia P, Eng C, Maher ER, Latif F: RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours. *Oncogene* 2001;20:7573-7577.
 13. Wang R, An J, Ji F, Jiao H, Sun H, Zhou D: Hypermethylation of the Keap1 gene in human

lung cancer cell lines and lung cancer tissues. *Biochem Biophys Res Commun*

2008;373:151-154.

14. Smiraglia DJ, Rush LJ, Frühwald MC, Dai Z, Held WA, Costello JF, Lang JC, Eng C, Li B, Wright FA, Caligiuri MA, Plass C: Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet* 2001;10:1413-1419.
15. Tummala R, Romano RA, Fuchs E, Sinha S: Molecular cloning and characterization of AP-2 epsilon, a fifth member of the AP-2 family. *Gene* 2003;321:93-102.
16. Ebert MP, Tänzer M, Balluff B, Burgermeister E, Kretzschmar AK, Hughes DJ, Tetzner R, Lofton-Day C, Rosenberg R, Reinacher-Schick AC, Schulmann K, Tannapfel A, Hofheinz R, Röcken C, Keller G, Langer R, Specht K, Porschen R, Stöhlmacher-Williams J, Schuster T, Ströbel P, Schmid RM: TFAP2E-DKK4 and chemoresistance in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2012;366:44-53.
17. Payne SR, Serth J, Schostak M, Kamradt J, Strauss A, Thelen P, Model F, Day JK, Liebenberg V, Morotti A, Yamamura S, Lograsso J, Sledziewski A, Semjonow A: DNA methylation biomarkers of prostate cancer: confirmation of candidates and evidence urine is the most sensitive body fluid for non-invasive detection. *Prostate* 2009;69:1257-1269.