

論 文 要 旨

***MUC1* expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells**

〔 癌細胞において *MUC1* 遺伝子は DNA メチル化とヒストン H3 リジン 9 の修飾により制御されている 〕

山田 宗茂

【序論および目的】

我々は、これまで様々なヒト癌における一連のムチン抗原発現の研究において、癌の生物学的悪性度とムチン抗原の発現の関連性について詳細な分析を行ってきており、浸潤性膵管癌や腫瘍形成型胆管細胞癌における *MUC1* (膜結合ムチン) の発現が予後不良因子であることを見出した。*MUC1* 遺伝子プロモーター領域 (約 3,000bp) には、メチル化し得る数多くの CpG 部位が存在しているが、現在までに *MUC1* 遺伝子がエピジェネティックな制御機構により調節されているという報告はない。

本研究の目的は、*MUC1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化とヒストン修飾状態を検討することにより、*MUC1* 遺伝子の発現機構の解明に迫ることである。

【材料および方法】

膵臓癌、乳癌、大腸癌細胞株の中から、*MUC1* 陽性・陰性細胞株を選出し、*MUC1* 陰性細胞株に対しては、DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC) と、ヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害剤である Trichostatin A (TSA) を用いて処理を行い、*MUC1* mRNA の回復を RT-PCR により検討した。また、各々の細胞株に対する *MUC1* 遺伝子プロモーター全領域の DNA メチル化状態を、DNA メチル化定量解析システム MassARRAY^(R) 「EpiTYPERTM」を用いて検討した。具体的には、各細胞株から抽出した DNA に対してバイサルファイト処理を行い、アンチセンス側に T7 プロモーター配列を加えた *MUC1* 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR 増幅した。増幅した産物を RNA に In vitro 転写した後、酵素を用いてウラシルを特異的に切断した。これにより生じた DNA メチル化に依存した分子量の異なる断片の質量を、MALDI-TOF MS を用いて分析し、各々の細胞株における *MUC1* 遺伝子プロモーター領域の定量的 DNA メチル化解析を行った。

また、*MUC1* 陽性・陰性細胞株において DNA メチル化状態に有意な差がある領域をターゲットにして、Methylation Specific PCR (MSP) 用のプライマーを作製し、*MUC1* 遺伝子プロモーター領域の中においてもさらに遺伝子発現に関与する可能性のある領域の同定を試みた。

次に、DNA のメチル化に加えて、ヒストンの修飾状態も重要なエピジェネティック要因の一つであることから、クロマチン免疫沈降法：Chromatin immunoprecipitation

(ChIP) assays を用いて MUC1 プロモーター領域におけるヒストン修飾状態を検討した。具体的には、MSP で使用したプライマーとほぼ同じ領域に ChIP 用のプライマーを複製し、抗ヒストン H3 リジン 9 (H3-K9)ジメチル化抗体、抗ヒストン H3-K9 アセチル化抗体を用いて、MUC1 遺伝子発現に関与する可能性のある領域のヒストン H3-K9 の修飾状態を確認した。

【結 果】

膵臓癌・乳癌・大腸癌細胞株の中から、MUC1 陽性 4 株・陰性 4 株を選出し、陰性 4 株に対して 5-azadC、TSA 処理を行った結果、5-azadC 及び 5azadC+TSA 処理において、MUC1 mRNA 量の大幅な回復が確認された。次に、全 8 種類の細胞株に対する MUC1 プロモーター領域の DNA メチル化状態を、DNA メチル化定量解析システム MassARRAY^(R) 「EpiTYPERTM」を用いて検討した結果、転写開始付近における CpG のメチル化状態が MUC1 発現状態に相関していた。また、特に MUC1 発現状態に相関していた 4 箇所の CpG サイトにおいては、MSP により MassARRAY の結果と一致していることを確認した。更に、クロマチン免疫沈降法を用いた MUC1 プロモーターにおけるヒストン H3-K9 修飾状態の検討においても、MUC1 発現への関与が示唆される結果が得られた。

【結論及び考察】

今回得られた結果により、転写開始付近における DNA メチル化とヒストン H3-K9 修飾の双方が、MUC1 発現制御に影響している可能性が明らかとなった。今後、ヒト癌細胞株で示された MUC1 遺伝子のエピジェネティックな制御機構が、生体の組織においても成り立っているのかを明らかにすることにより、発癌リスクや予後の予測への応用が期待される。