

論 文 要 旨

DNA methylation and histone H3-K9 modifications contribute to MUC17 expression

〔 癌細胞において MUC17 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 〕

北 本 祥

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

ムチン糖タンパクは、様々なヒト組織（呼吸器官・消化器官等）の上皮細胞表面に広く分布し、上皮組織を外部刺激から保護し、上皮の微小環境の維持を通して組織の恒常性の維持に重要な役割を担う多機能な高分子タンパク質として知られている。一方で、癌化に伴ってムチンファミリー遺伝子の異常発現が報告されており、ムチン分子が癌の病態形成（増殖・浸潤転移等）の過程で機能的役割をもつことが明らかにされている。これまで我々の研究室では、膵胆管系腫瘍を中心に「一連のムチン遺伝子発現の臨床病理学的意義」とその「発現制御メカニズム」の解明を通して、早期かつ質的診断を目的とした膵胆管系腫瘍の診断システム構築を目指し研究を進めてきた。このような背景の中、本研究では、近年、新たに膵臓癌組織（特にリンパ節転移を伴う症例）において発現の上昇が見られ、独立した予後不良因子になりうることを示されている膜型ムチン分子 MUC17 に関して、エピジェネティックな観点からその癌における発現制御機構の解明を試みた。

【材料および方法】

固形癌（膵臓癌、乳癌、大腸癌、肺癌）由来の癌細胞株の中から、MUC17 陽性・陰性細胞株を選出し、MUC17 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、MUC17 mRNAの回復をリアルタイムRT-PCRにより検討した。また、各々の細胞株に対する MUC17 遺伝子プロモーター全領域の CpG DNA のメチル化状態を、DNAメチル化定量解析システム MassARRAY[®] を用いて網羅的に定量した。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 MUC17 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 MUC17 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。そして、MUC17 陽性・陰性細胞株において DNA メチル化状態に有意な差のみられる領域を探索し、遺伝子発現に関与する CpG DNA のメチル化領域の同定を試みた。次に、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 MUC17 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、上述で遺伝子発現に関与することが強く示唆される領域近傍にChIP用のプライマーを作製し、ヒストンH3やH4のリジン残基に対する抗体を用いて、MUC17遺伝子発現に関与する可能性のある領域のヒストンの化学修飾状態を調べた。さらに、MUC17の発現に関与する可能性のあるマイクロRNA(miRNA)についても、癌細胞株を対象に行ったmiRNA発現プロファイルとMUC17のmRNA発現量を比較して、相関のあるmiRNAを絞りこみ、miRNAの標的遺伝子の予測プログラムであるTargetScanを用いてMUC17の3'-UTRと相互作用しうる候補miRNAの選定を行った。

【結果】

MassARRAY[®]を用いたMUC17のプロモーター領域におけるメチル化解析の結果、転写開始点近傍(-179/+52)のCpG DNAのメチル化がMUC17陽性細胞では有意に低メチル化状態にあり、MUC17陰性細胞においては高メチル化状態にあることが明らかとなった。さらに、同領域を対象に行ったChIP解析の結果、MUC1陽性細胞ではヒストンH3K9がアセチル化(ユークロマチンの指標として知られる化学修飾)されており、対してMUC17陰性細胞においてはジメチル化(ヘテロクロマチンの指標として知られる化学修飾)されていることが分かった。さらに、これらMUC17の陰性細胞を対象に、5-azadCおよびTSA処理を施すとMUC17の転写が顕著に促進されることが確認された。一方、膵癌組織検体中のMUC17の当該プロモーター領域のメチル化状態をMethylation Specific PCRにより調べた結果、腫瘍部位では、正常部位と比べて低メチル化状態にある傾向が確認された。さらにmiRNAマイクロアレイより得られた各種癌細胞株におけるmiRNA発現プロファイル、MUC17発現パターン及びMUC17の3'UTRへのmiRNA結合予測解析によりMUC17を標的とするmiRNAの絞り込みを行った結果、5種類のmiRNA(miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-30c, miR-30e)が候補として同定された。

【結論及び考察】

本研究では、7番染色体上に位置するMUC17遺伝子の発現機構をエピジェネティックな観点から解析を進めた。その結果、MUC17が1)プロモーターの転写開始点近傍(-179/+52)のCpG DNAのメチル化と2)同領域に存在するヒストンH3の9番目のリジン残基における化学修飾が、その転写段階での遺伝子発現を厳密に制御することを明らかにした。さらに、3)5つのmiRNA(miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-30c, miR-30e)に関してもMUC17の転写後制御に関わっている可能性を見いだした。

膵臓がんは癌の中でも極めて悪性度が高く、PET-CT等の最新の機器を用いても、いまだに早期発見どころか、治癒を望める段階での診断は不可能であることが多く、それゆえ、手遅れになる可能性の高い最も難治性の癌である。このような現状を打破するために、現在、膵胆管系腫瘍の「早期診断法の確立」あるいは「悪性度を規定する分子標的の同定」が望まれている。特に、本研究で同定されたDNAメチル化制御機構は、臨床検体においてもMUC17の発現を反映している可能性を示唆する結果が得られているため、今後、PCRを基盤とした高感度なメチル化検出法を用いて、膵癌における悪性度診断のバイオマーカーとしての有用性に関して解析を進める必要がある。並行して、膜型ムチンMUC17の癌における機能的意義についても詳細な検討を進め、癌治療の標的分子としての有用性の評価も必要である。