



Methylation of CpG loci in 5'-flanking region alters steady-state expression of adenomatous polyposis coli gene in colon cancer cell lines

[サカ]本, 喜雄

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2001-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2311

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002311>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【87】

氏 名・(本 籍) 堀本 喜雄 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博い第1325号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成13年3月31日

【学位論文題目】

**Methylation of CpG loci in 5'-flanking region alters steady-state
expression of adenomatous polyposis coli gene in colon cancer cell lines**

(APC遺伝子5'側非翻訳領域のメチル化は大腸癌細胞株でのAPC遺伝子発現を変化させる。)

審 査 委 員

主査 教授 前田 盛

教授 春日 雅人 教授 伊藤 宏

【緒言】

ヒトAPC遺伝子は、染色体5q21に位置し、300キロダルトンの巨大な蛋白をコードしている。APC遺伝子異常はFAP（家族性大腸腺腫症）の原因遺伝子として知られているが、非家族性の大腸癌においても早期から点突然変異を起こしていることが知られている。APC遺伝子は、他の蛋白と複合体を形成し、Wntシグナルを制御し、主に β カテニンの制御にかかわっている。一方、遺伝子の5'側非翻訳領域のメチル化は、クロマチン蛋白や転写因子に作用して、組織特異的な遺伝子の発現制御にかかわっている。DNAメチル化は、直接的に転写因子とDNAとの結合を阻害する作用と、間接的にmethyl-CpG-binding 蛋白（MeCP1やMeCP2など）によりクロマチン構造の変化が生じる場合とが知られている。このDNAメチル化によってさまざまな癌抑制遺伝子の発現が低下することが最近多数報告されている。APC遺伝子に関しては、大腸癌においてメチル化が高頻度に行われているという報告が見られるが、メチル化とAPC遺伝子発現に関する報告はない。そこで、6種類の大腸癌細胞株を用いてAPC遺伝子のプロモータ領域のメチル化とAPC遺伝子発現との関係を調べた。メチル化は、APC遺伝子プロモータ603塩基内にある、31個のCpGのシトシンのメチル化をbisulfite変換後のDNAの塩基配列を決定し、APC遺伝子の発現は、ノザン法と免疫染色を併用し解析した。

【材料と方法】

細胞株：大腸癌細胞株6種類（DLD-1, SW480, Colo320, Ht29, WiDr 及び Colo201）を用いた。

免疫染色：細胞株をそれぞれスライドグラスに浮遊系の場合は遠心機で貼り付け、接着系の場合は、チャンバースライド上で培養して、それぞれ100%メタノールにて固定した。2種類の抗体（Ab3及びAb4）を用い免疫染色を行った。Ab3はAPC蛋白のN末端を認識し、Ab4はC末端を認識するため、Ab3は、truncateされたAPC蛋白も含めAPC蛋白の総量を反映し、Ab4は、正常なAPC蛋白のみを認識する。Ab3とAb4の抗体の染色パターンにより、Truncationの有無と、APC蛋白の発現量を検討した。発現量は、染色される細胞数染色強度により、++、+、+-、-の4段階に分けて評価した。

ノーザン法：6種類の大腸癌細胞株よりTotal RNAをRNAzolを用いて抽出した。プローブはFull length APC cDNAを用いた。

RT-PCR法：APC遺伝子には、2つ転写開始領域があることが知られている（P1とP2）。total RNAからcDNAを作成し、エクソン1A、エクソン1Bおよびエクソン2に設定したプライマーにより、RT-PCRを行いAPC遺伝子プロモータUsageを検討した。

サザン法：Genomic DNAをEcoRI, HindIIIにて消化後、Full length cDNAをプローブとして行った。

APC遺伝子5' 非翻訳領域のメチル化の検索：Genomic DNAを抽出後、NaOHを加え、hydroquinoneとbisulfiteを加え、非メチル化シトシンをウラシルに変換した。

Bisulfiteによって処理したDNAは-20度にて保存した。APCプロモーターP1領域のメチル化は、bisulfite処理後のDNAとAPC遺伝子5' 側非翻訳領域に設定したプライマーとによって検出した。プライマーにCpG領域が含まれないように設定し、

APCプロモーター領域の603塩基を増幅後、塩基配列を決定した。

MSP (Methylation specific PCR) for APC gene : APCプロモーター領域P1およびP2領域のメチル化を、MSPを用いて調べた。MSPは、プライマーにCpGが少なくとも3個含まれる部位を選び、プライマーは、すべてメチル化している場合のbisulfite処理後の塩基配列を想定して設定したもの（メチル化検出用）と、すべてメチル化していない場合のbisulfite処理後の塩基配列を想定して設定したもの（非メチル化検出用）とを作成した。この2種類のプライマーを用いて、同一のbisulfite処理後のDNAに対しPCRを行い、増幅される組み合わせによりメチル化、非メチル化、ヘミメチル化を判定した。

MSP for hMLH1 gene : ミスマッチ修復遺伝子の一つであるhMLH1遺伝子についてもAPCと同様にMSPを用いてメチル化の有無を検索した。

【結果】

免疫染色の結果は、Ab3抗体で、Colo320とWiDrとで、細胞質に強く染色され、それ以外の細胞では、弱陽性、あるいは陰性であった。Ab4抗体では、すべての細胞株は陰性を示し、Colo320とWiDrのAPC蛋白はTruncateしていることが示唆された。ノザン法では、免疫染色の結果とよく相関してColo320とWiDrとで、APC mRNAの強い発現を認めた。他の細胞株では、弱い発現のみを認めた。サザン法では、すべての細胞株でバンドに差は認められなかった。RT-PCR法によるAPC遺伝子のプロモーター利用を検索した結果、エクソン1Aに設定したプライマーからのみRT-PCRが陽性を示し、エクソン1Bに設定したプライマーではすべて陰性であっ

た。以上から、すべての大腸癌細胞株において、エクソン1Aから転写が始まっていると考えられた。APC遺伝子のプロモータのメチル化をMSP法で、調べたところ、エクソン1Aでは、すべて、非メチル化パターンを示し、エクソン1Bでは、すべてメチル化のパターンを示した。さらに、詳細なメチル化の検出をするために、APC遺伝子5'側非翻訳領域の31個のCpGを含む630塩基に及ぶ範囲を、シーケンス法を用いて調べた。MSP法で調べたP1の範囲にはメチル化を認めなかったが、DLD-1, HT29及びSW480において転写開始部位周辺にメチル化を認めた。Colo320, WiDr及びColo201においては、メチル化は存在しなかった。hMLH1遺伝子プロモータ領域のメチル化は、SW480では、メチル化パターンを、Colo320は、ヘミメチル化パターンを示した。それ以外のDLD-1, HT29, WiDr及びColo201では、非メチル化のパターンを示しAPCメチル化パターンとは全く異なる結果であった。

【考察】

6種類の大腸癌細胞株では、APCのmRNAの発現レベルは、APC蛋白の発現レベルによく相関していた。サザン法で、遺伝子増幅や欠失が無いことより、APC遺伝子発現は主として転写機構によると推定された。APC遺伝子のエピジェネティックな変化を検索したところP1プロモータにメチル化は認めなかったが、通常MSP法では、カバーできなかった領域にメチル化が存在し、同部のメチル化と、APC遺伝子の発現との間に相関を認めた。さらに、P2プロモータには、MSP法で、すべての細胞株でメチル化が存在し、エクソン1BのP2プロモータからの転写は、メチル化によって抑制されていることが示唆された。以上より、DLD-1, SW480及びHT29の

細胞株では、メチル化は、転写開始部位に存在し、メチル化による間接的な作用により、転写活性の抑制が起こっていると推定される。Colo201では、mRNAと蛋白の発現低下が観察されたが、メチル化は認めず、この細胞株に関しては、他のAPC遺伝子の上流因子等が、APC遺伝子の発現の制御にかかわっている可能性がある。主要なミスマッチ修復遺伝子の一つであるhMLH1遺伝子プロモータ領域のメチル化は、APC遺伝子のメチル化とは、相関が無く、大腸癌細胞株では、エピジェネティックな制御は、それぞれの遺伝子に選択的かつ特異的な現象であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1326号	氏 名	塔本 喜雄
論文題目	<p>Methylation of CpG loci in 5'-flanking region alters steady-state expression of adenomatous polyposis coli gene in colon cancer cell lines</p> <p>APC遺伝子5' 側非翻訳領域のメチル化は大腸癌細胞株でのAPC遺伝子発現を変化させる。</p>		
審査委員	<p>主 査 前田 盛 印</p> <p>副 査 伊東 宏 印</p> <p>副 査 春日 雅人 印</p>		
審査終了日	平成 13 年 2 月 1 日		

（要旨は1, 000字～2, 000字程度）

大腸癌発癌モデルは多段階発癌モデルとして初期に確立された。しかし未だ不明な点も多い。ヒトAPC遺伝子は、染色体5q21に位置し、300キロダルトンの巨大な蛋白をコードしている。APC遺伝子異常はFAP（家族性大腸腺腫症）の原因遺伝子として知られているが、非家族性の大腸癌においても早期から点突然変異を起こしていることが知られている。一方、遺伝子の5'側非翻訳領域のメチル化は、クロマチン蛋白や転写因子に作用して、組織特異的な遺伝子の発現制御にかかわっている。DNAメチル化によってさまざまな癌抑制遺伝子の発現が低下することが最近多数報告されている。APC遺伝子に関しては、大腸癌においてメチル化が高頻度に行われているという報告が見られるが、メチル化とAPC遺伝子発現に関する報告はない。そこで、本研究者は6種類の大腸癌細胞株を用いてAPC遺伝子のプロモーター領域のメチル化とAPC遺伝子発現との関係を検討した。

【材料と方法】

細胞株：大腸癌細胞株6種類（DLD-1, SW480, Colo320, Ht29, WiDr 及び Colo201）を用いた。

免疫染色：細胞株をそれぞれスライドグラスに浮遊系の場合は遠心機で貼り付け、接着系の場合は、チャンバースライド上で培養して、それぞれ100%メタノールにて固定した。2種類の抗体（Ab3及びAb4）を用い免疫染色を行った。Ab3はAPC蛋白のN末端を認識し、Ab4はC末端を認識するため、Ab3は、truncateされたAPC蛋白も含めAPC蛋白の総量を反映し、Ab4は、正常なAPC蛋白のみを認識する。Ab3とAb4の抗体の染色パターンにより、Truncationの有無と、APC蛋白の発現量を検討した。発現量は、染色される細胞数染色強度により、++、+、+-、-の4段階に分けて評価した。

ノーザン法：6種類の大腸癌細胞株よりTotal RNAをRNAzolを用いて抽出した。プローブはFull length APC cDNAを用いた。

RT-PCR法：APC遺伝子には、2つ転写開始領域があることが知られている（P1と

P2)。total RNAからcDNAを作成し、エクソン1A、エクソン1Bおよびエクソン2に設定したプライマーにより、RT-PCRを行いAPC遺伝子プロモータUsageを検討した。

サザン法：Genomic DNAをEcoRI, HindIIIにて消化後、Full length cDNAをプローブとして行った。

非翻訳領域のメチル化の検索：Genomic DNAを抽出後、NaOHを加え、hydroquinoneとbisulfiteを加え、非メチル化シトシンをウラシルに変換した。

Bisulfiteによって処理したDNAは-20度にて保存した。APCプロモーターP1領域のメチル化は、bisulfite処理後のDNAとAPC遺伝子5'側非翻訳領域に設定したプライマーとによって検出した。プライマーにCpG領域が含まれないように設定し、APCプロモーター領域の603塩基を増幅後、塩基配列を決定した。

APCプロモーター領域とhMLH1のメチル化：APCプロモーター領域P1およびP2領域のメチル化とhMLH1を、MSPを用いて調べた。MSPは、プライマーにCpGが少なくとも3個含まれる部位を選び、プライマーは、すべてメチル化している場合のbisulfite処理後の塩基配列を想定して設定したもの（メチル化検出用）と、すべてメチル化していない場合のbisulfite処理後の塩基配列を想定して設定したもの（非メチル化検出用）とを作成した。この2種類のプライマーを用いて、同一のbisulfite処理後のDNAに対しPCRを行い、増幅される組み合わせによりメチル化、非メチル化、ヘミメチル化を判定した。

【結果】

免疫染色の結果は、Ab3抗体で、Colo320とWiDrとで、細胞質に強く染色され、それ以外の細胞では、弱陽性、あるいは陰性であった。Ab4抗体では、すべての細胞株は陰性を示し、Colo320とWiDrのAPC蛋白はTruncateしていることが示唆された。ノザン法では、免疫染色の結果とよく相関してColo320とWiDrとで、APC mRNAの強い発現を認めた。他の細胞株では、弱い発現のみを認めた。サザン法で

は、すべての細胞株でバンドに差は認められなかった。RT-PCR法によるAPC遺伝子のプロモータ利用を検索した結果、エクソン1Aに設定したプライマーからのみRT-PCRが陽性を示し、エクソン1Bに設定したプライマーではすべて陰性であった。以上から、すべての大腸癌細胞株において、エクソン1Aから転写が始まっていると考えられた。APC遺伝子のプロモータのメチル化をMSP法で、調べたところ、エクソン1Aでは、すべて、非メチル化パターンを示し、エクソン1Bでは、すべてメチル化のパターンを示した。さらに、詳細なメチル化の検出をするために、APC遺伝子5'側非翻訳領域の31個のCpGを含む630塩基に及ぶ範囲を、シーケンス法を用いて調べた。MSP法で調べたP1の範囲にはメチル化を認めなかったが、DLD-1, HT29及びSW480において転写開始部位周辺にメチル化を認めた。Colo320, WiDr及びColo201においては、メチル化は存在しなかった。hMLH1遺伝子プロモータ領域のメチル化は、SW480では、メチル化パターンを、Colo320は、ヘミメチル化パターンを示した。それ以外のDLD-1, HT29, WiDr及びColo201では、非メチル化のパターンを示しAPCメチル化パターンとは全く異なる結果であった。

【考察】

6種類の大腸癌細胞株では、APCのmRNAの発現レベルは、APC蛋白の発現レベルによく相関していた。サザン法で、遺伝子増幅や欠失が無いことより、APC遺伝子発現は主として転写機構によると推定された。APC遺伝子のエピジェネティックな変化を検索したところP1プロモータにメチル化は認めなかったが、通常MSP法では、カバーできなかった領域にメチル化が存在し、同部のメチル化と、APC遺伝子の発現との間に相関を認めた。さらに、P2プロモータには、MSP法で、すべての細胞株でメチル化が存在し、エクソン1BのP2プロモータからの転写は、メチル化によって抑制されていることが示唆された。以上より、DLD-1, SW480及びHT29の細胞株では、メチル化は、転写開始部位に存在し、メチル化による間接的

な作用により、転写活性の抑制が起こっていると推定される。Colo201では、mRNAと蛋白の発現低下が観察されたが、メチル化は認めず、この細胞株に関しては、他のAPC遺伝子の上流因子等が、APC遺伝子の発現の制御にかかわっている可能性がある。

主要なミスマッチ修復遺伝子の一つであるhMLH1遺伝子プロモータ領域のメチル化は、APC遺伝子のメチル化とは、相関が無く、大腸癌細胞株では、エピジェネティックな制御は、それぞれの遺伝子に選択的かつ特異的な現象であることが示唆された。

本研究は、大腸癌について、その遺伝子発現に及ぼすメチル化の影響を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった大腸癌培養細胞株のAPC遺伝子の発現制御について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。