

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	石崎 智章
学位論文題目			
<p>Retention of the <i>H19</i> imprinting and the normal methylation patterns at the <i>Igf2/H19</i> differentially-methylated regions in the monoclonal mouse hepatocellular carcinoma cells with loss of the <i>Igf2</i> imprinting</p> <p>(モノクロナールマウス肝癌細胞の <i>Igf2</i> Imprinting の消失と <i>Igf2/H19</i> アレル特異的メチル化領域のメチル化の解析)</p> <p style="text-align: right;">共著者名 吉江 真澄、柳沼 裕二、 田中 達也、小川 勝洋</p> <p style="text-align: right;">未発表</p>			
研 究 目 的			
<p><i>Igf2</i> は胎児の成長に深く関わる imprinting gene の一つで、マウスでは胎児期に各組織で父親アレルのみが発現しているが、生後は脳を除いて発現が消失する。一方、癌では <i>Igf2</i> の発現が認められ、その際しばしば父親と母親の両方のアレルから発現する Loss of Imprinting (LOI) が認められる。<i>Igf2</i> の imprinting には、その 90 Kb 下流に存在する <i>H19</i> の発現が密接に関係する。<i>H19</i> も imprinting gene の一つで <i>Igf2</i> と同様に胎児期に発現するが、非翻訳 mRNA をコードし、<i>Igf2</i> とは逆に母親のアレルのみが発現する。<i>Igf2</i> と <i>H19</i> は、<i>H19</i> の下流の enhancer を共有しており、父親のアレルでは enhancer は <i>Igf2</i> のみに作用し、母親のアレルでは <i>H19</i> のみに作用する。このような enhancer の使い分けには、<i>H19</i> の上流領域に存在する父親由来の遺伝子と母親由来の遺伝子との間でメチル化状態の異なる領域 (differentially-methylated region; DMR) が深く関わっているが、<i>Igf2</i> imprinting にはさらに <i>Igf2</i> の上流または遺伝子中に存在する <i>Igf2</i> DMR 及びマウス第7染色体 imprinting gene cluster 中に存在する <i>Kvlqt1</i> DMR も関わっていると考えられている。</p> <p>近年、<i>H19</i> DMR のメチル化と <i>Igf2</i>, <i>H19</i> のアレル特異的発現の関係について新しいメカニズムが提唱された。すなわち、<i>H19</i> DMR には多機能核蛋白である CTCF の結合配列が存在し、メチル化されていない母親 <i>H19</i> DMR では CTCF が結合するのに対して、メチル化されている父親アレルでは CTCF は結合しない。CTCF は遺伝子間の絶縁体 (insulator) として働くことが知られており、CTCF insulator が働く母親アレルでは共通の enhancer は <i>H19</i> のみ</p>			

に利用されるのに対して、働かない父親アレルでは *Igf2* に利用される。

一方、癌における *Igf2* LOI の原因は分かっていないが、近年 Wilms 腫瘍 や大腸癌で *Igf2* LOI を伴うケースでは、父親の *H19* アレルのメチル化は保たれているのに対し、正常ではメチル化されていない母親アレルの異常なメチル化が見られ、母親アレルからの *H19* の発現が消失することが報告されている。このような *Igf2/H19* の発現及びメチル化パターンは上記の *Igf2/H19* enhancer 競合説 (*Igf2/H19* enhancer competition theory) によく当てはまるが、*Igf2* LOI を伴う腫瘍の多くは、かならずしもこのような *Igf2/H19* の発現パターンは示さない。

われわれは癌細胞における *Igf2* LOI の原因を明らかにするために C3H/HeJ マウスと MSM マウスの F1 hybrid に誘発した肝癌細胞について *Igf2/H19* の imprinting を検索した。C3H/HeJ マウスは通常の実験用マウスであるのに対して MSM マウスは野生マウスであるため、両者の間には *Igf2* および *H19* の DMR を含むさまざまな領域に容易に遺伝子多型を見出すことができる。一方、我々は *Igf2* LOI(+)細胞株には LOI(+)細胞と LOI(-)細胞が混在することから、LOI(+)細胞をクローニングし、純度の高い LOI(+)細胞株を樹立した。本研究ではこれらの細胞を用いて *Igf2/H19* のアレル特異的発現、*Igf2/H19* DMR のアレル特異的メチル化、さらに *Igf2/H19* insulator として働く CTCF の発現と変異について検討した。

材料・方法

肝癌の誘発： 雌性 C3H/HeJ と雄性 MSM マウスを交配し、C3H/HeJ x MSM F1 マウスを得た。これらのうちの雄性マウスに生後2週目に diethylnitrosamine(DEN)を 5 μ g/g 体重あたり腹腔内投与し、投与後 12-14 ヶ月で発生した肝癌組織を以下の実験に用いた。

肝癌細胞株の樹立： 肝癌組織を collagenase 液で還流し、細胞を分離した。分離肝癌細胞は低密度で培養し、1-2 個で生着している細胞に印をつけ、コロニーが 0.5-1.0mm 程度の大きさになってから cloning ring を用いて分離し、細胞株を樹立とした。このようにして得られた各細胞株について *Igf2* LOI を検討し、*Igf2* LOI(+)のものについては、さらに多数の subclone 株を樹立した。

RT-PCR： 生後9週目雄性マウスの正常肝組織、肝癌組織、肝癌細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR により *Igf2*、*H19*、*CTCF* の発現を検討した。*Igf2* については、exon 6 に存在する polymorphic CA repeat 領域を増幅した。*H19* については single nucleotide polymorphysim (SNP)を含む exon 2 と 3 を含む領域を増幅した。*CTCF* については exon 2~7 を増幅した。*Igf2* の RT-PCR 産物は 15%ポリアクリルアミドゲルにて、*H19*、*CTCF* の産物は 2%アガロースゲルにて泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線下で発現または LOI を判定した。

DNA sequencing： *H19* のアレル特異的発現については、RT-PCR 産物を TA vector にてクローニングして各 clone を ABI automatic DNA sequencer により sequencing し、C3H/HeJ と MSM 間の SNP を利用して判定した。*CTCF* の突然変異については、*CTCF* の exon 2~7 を 3 個のフラグメントに分けて RT-PCR にて増幅し、direct sequencing により検討した。

メチル化特異的 DNA Sequencing： *Igf2* DMR および *H19* DMR のメチル化を検討するため、DNA を sodium bisulfite 処理し、C3H/HeJ と MSM の間で SNP のある DMR 領域について PCR を施行した。PCR 産物は TA cloning し、個々の plasmid clone を sequencing することでアレル特異的メチル化を検討した。

Western Blotting： 肝癌細胞を lysis buffer にて可溶化し、可溶化蛋白各 50 μ g を 7 % SDS-ポリアクリルアミドゲルにて泳動し、ニトロセルロース膜に blotting した。ニトロセルロース膜はスキムミルクにて blocking した後、抗 *CTCF* 抗体 (Santa Cruz) を 1 次抗体とし、HRP 結合抗ヤギ抗体を 2 次抗体として反応させ、ECL キットにて特異的バンドを検出した。また、コントロールとして同一膜を抗 tubulin 抗体で染色した。

結果

Igf2 LOI : *Igf2* の発現は生後9週目の正常マウス肝組織では認められなかったが、肝癌組織では10個中10個、肝癌細胞では62株中54株で認められた。しかし、*Igf2* LOIは肝癌細胞株でのみ認められ、その頻度は4/54株(6%)であった。これらのLOIを認めた4細胞株をクローニングし、それぞれから11-33個のsubclone株を作製し、個々のsubcloneについてLOIを調べたところ、LOI(+)の頻度は33-72%であった。さらに72%と比較的LOI(+)頻度の高かった一株を除いて、他の3株についてそれぞれのLOI(+) subcloneをさらにcloningし、11-33個のsubclone株を作製した。これらのsubcloneのLOIを調べたところ、LOI(+)の頻度は72~100%となった。

H19 Imprinting : *H19* の発現は正常肝組織、肝癌組織、肝癌細胞のいずれでもみられた。*Igf2* LOI(+)細胞4株、*Igf2* LOI(-)細胞4株について、*H19* exon 3 に含まれる7144 nt G/A (GenBank accession no. AF049091) のSNPをマーカーとしてimprintingを検討したところ、*Igf2* LOIに関わらず、いずれも母親アレルからのみ*H19*を発現しており、imprintingは保たれていた。

H19 DMRのメチル化 : 上記の*Igf2* LOI(+)およびLOI(-)細胞株それぞれ4個について*H19* DMRに含まれる一個のCTCF結合部位とその近傍の13個のCpGについてメチル化を検討した。この領域では3534 nt C/A (GenBank accession no. AF049091) にSNPが含まれているため、アレル特異的メチル化が検討できた。正常肝組織および肝癌細胞株はいずれも父親*H19* DMRアレルが強くメチル化されており、母親アレルはごく軽度にしかなメチル化されていなかった。しかし、*Igf2* LOI(+)細胞株ではLOI(-)細胞株に比べわずかに母親アレルが異常にメチル化されたものが認められた。また、*Igf2* LOI(-)細胞の父親のアレルは、*Igf2* LOI(+)細胞に比べ、メチル化の低下を認めた。このメチル化の低下は特にCTCF結合部に含まれるCpGおよびその周辺のCpGに著明であった。

Igf2 DMR1のメチル化 : 上記と同様に*Igf2* LOI(+), (-)細胞株それぞれ4個について*Igf2* DMR1に含まれる5箇所のCpGについてメチル化を検討した。父親と母親のアレルは12826 nt A/G (GenBank accession no. MMU71085) のSNPをマーカーとして判定した。正常肝組織では1番目と5番目のCpGにメチル化が強く認められ、5番目のCpGで父親アレルの高メチル化が見られた。肝癌細胞では*Igf2* LOIの有無にかかわらず、5番目では1つのLOI(-)細胞株を除き、正常肝組織と同様に父親アレルの高メチル化が認められた。しかし、*Igf2* LOI(+)とLOI(-)細胞株の間では有意な差異は認めなかった。

CTCF : 正常肝組織、肝癌細胞株のいずれもRT-PCRでCTCF mRNAの発現が認められたが、ほぼすべてのCTCF coding領域には突然変異は認められなかった。CTCF蛋白の発現量についても*Igf2* LOI(+)とLOI(-)細胞株の間で差は認められなかった。

考察

本研究では*Igf2* LOIは10個の肝癌組織ではいずれも認められず、細胞株では4/54株(6%)に認められたことから、LOI(+)細胞は肝癌組織中に存在した稀な細胞が細胞培養中に優位を占めるようになったか、細胞株の樹立中に新たに生じたものと考えられた。一方、最初の*Igf2* LOI(+)細胞株では、個々の細胞レベルでは33-72%がLOI(+)であり、LOI(-)細胞および*Igf2* の発現のない細胞も混在していた。このことは上記の可能性を強く示唆する。

*H19*は*Igf2* LOI(+), (-)のいずれの細胞株でも母親アレルから発現していた。これまで報告されているWilms tumorなどでは*Igf2* LOI(+)が認められるときには*H19*の発現は消失し、その際に母親のアレルにhypermethylationが認められるとしている。*Igf2* LOI(+)細胞で*H19*の発現が母親アレルからmonoallelicに見られた理由としては、*Igf2*を

biallelicに発現してH19を発現していないLOI(+)細胞と *Igf2*, *H19*のいずれも monoallelicに発現するLOI(-)細胞が混在していた可能性が考えられた。そこで *Igf2* LOI (+)細胞をクローニングしてLOI (+)細胞の純度の高い細胞株を複製して *Igf2/H19* の imprinting を調べたところ、やはり *Igf2* は biallelic に発現していたのに対して、*H19* は母親アレルから monoallelic に発現しており、imprinting は維持されていた。すなわち、これらの細胞における *Igf2* LOI は *H19* imprinting とは独立の起こっていることが明らかになり、このことは今日提唱されている *Igf2/H19* enhancer 競合説とは明らかに矛盾する。

H19 DMRについて *Igf2* LOI(+)細胞とLOI(-)細胞を比較すると、*Igf2* LOI(+)細胞では母親の *H19* DMRアレルの異常なメチル化をわずかに認めた。しかし、個々の染色体レベルでは大部分の母親アレルで非メチル化状態は維持されており、*H19* imprinting が維持されていたことと一致した。一方、*Igf2* LOI がすべての細胞に認められた細胞株についてもこのようなパターンが見られたことから、*Igf2* LOI の原因の大部分は母親の *H19* DMR の異常メチル化によるものではないことが明らかになった。

また、*Igf2* LOI(-)細胞株では父親 *H19* DMRアレルにメチル化の低下を認めた。このことは父親 *H19* DMRにCTCFが結合し、父親アレルから *H19*が発現する可能性が考えられる。しかし、いずれの細胞でも父親アレルからの *H19* の発現は見られず、*H19* imprinting が保たれていた。父親 *H19*アレルの発現の抑制は *H19* DMR のメチル化の他に、*H19* promoter のメチル化も関与しており、*H19* promoter のメチル化が正常に保たれていれば *H19* DMR が非メチル化状態でも *H19* imprinting は維持される可能性が考えられる。また、*H19* DMR にはCTCF結合部位が4個含まれており、今回調べたのはそのうちのひとつであることから、一個の脱メチル化だけで父親 *H19*アレルの発現抑制は解除されないのかも知れない。

一方、今回の検討ではCTCFの発現は *Igf2* LOI(+), (-)細胞株で差は見られず、また、CTCFの突然変異も見られないことから、これらの細胞ではCTCF insulator の働きは正常であったものと思われる。

Igf2 DMR1 を gene targeting により knockout すると父親アレルでは影響はないが、母親アレルでは不活性な *Igf2* が発現するようになり、その場合には *H19* の発現には影響はないことが報告されている。このことは *Igf2* DMR1 はCTCF insulator/*Igf2-H19* enhancer 競合の機序とはべつに、母親 *Igf2*アレルの発現を抑制することを示唆する。*Igf2* DMR1 は、*Igf2* が活性である父親アレルでメチル化されており、不活性である母親アレルでメチル化が低いことから何らかの repressor が結合する可能性が指摘されている。しかし、今回、正常組織で個々の染色体レベルで比較すると *Igf2* DMR1 のメチル化状態は *H19* DMR ほど父親、母親アレル間でメチル化の程度の違いは見られず、また、LOI (+), (-)細胞株で有意な差が見られなかった。したがって、*Igf2* DMRも癌細胞の *Igf2* LOI には深くは関わっていないものと考えられた。

以上より癌細胞における *Igf2* LOI は *Igf2* DMR1、*H19* DMR のメチル化の異常では説明できない。*Igf2* の imprinting には *H19*, *Igf2* DMR の他にさまざまな cis element が関与する可能性が考えられており、それらには Beckwith-Wiedman syndrome で稀に異常メチル化や欠損が見られる *Kvlqt1* DMRや、*H19*と *Igf2*の遺伝子間に存在し、種間で保存されているDNase I hypersensitive region (A6A4) などが知られている。一方、*H19*の影響は *Igf2*に特異的であるのに対して、*Kvlqt1* DMRの影響は *Igf2*, *H19*を含むマウス第7染色体のimprinted domainの広い領域に及ぶことが報告されている。癌細胞における *Igf2* LOI が short range の imprinting 機序の破たんによるのか、long range の機序の破たんによるのかは今後の重要な課題である。

結論

1. マウス肝癌細胞の *Igf2* LOI では、*H19* の発現消失は伴わず、また *H19* DMR の imprinting も維持されていることから *H19* とは独立に起こるものと考えられる。
2. *Igf2* LOI の原因として CTCF の異常は否定的である。
3. *Igf2* DMR1 も肝癌細胞の *Igf2* LOI には関与しないことから、他の既知および未知の imprinting 調節因子の破たんが考えられる。

引用文献

- 1) Wolf Reik and Jörn Walter. Genomic imprinting : Parental influence on the genome. Nat. Rev. Genet. 2, 21-32 (2001)
- 2) Shirley M. Tilghman. The sins of the fathers and mothers : Genomic imprinting in mammalian development. Cell 96, 185-193 (1999)

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	石 崎 智 章
審査委員長 小川勝洋 ㊦ 審査委員 羽田明 ㊦ 審査委員 田中達也 ㊦			
学 位 論 文 題 目 Retention of the <i>H19</i> imprinting and the normal methylation patterns at the <i>Igf2/H19</i> differentially-methylated regions in the monoclonal mouse hepatocellular carcinoma cells with loss of the <i>Igf2</i> imprinting (モノクローナルマウス肝癌細胞の <i>Igf2</i> Imprinting の消失と <i>Igf2/H19</i> アレル特異的メチル化領域のメチル化の解析)			
<p><i>Igf2</i> は胎児の成長に関わる imprinting gene で、マウスでは胎児期の各組織で父親由来のアレルが発現しているが、生後は脳を除いて発現が消失する。一方、癌では <i>Igf2</i> の発現が認められ、しばしば父親及び母親由来の両方のアレルの発現 (Loss of Imprinting; LOI) が起こる。<i>Igf2</i> imprinting には、<i>Igf2</i> と <i>H19</i> の共通 enhancer および、<i>H19</i> 上流と <i>Igf2</i> 上流または遺伝子中に存在するアレル特異的メチル化部位 (differential methylated region; DMRs) が関与するとされている。また、最近 <i>H19</i> DMR には多機能核蛋白 CTCF が結合し、絶縁体として作用することが注目されている。本学位論</p>			

文提出者は癌細胞の *Igf2* LOI の機序を解析するため、C3H/HeJ×MSM F1 マウス肝癌細胞を用いて *H19*、*Igf2* DMR のアレル特異的メチル化及び CTCF の発現、変異を検討した。方法は *Igf2*、*H19* の各部位の polymorphism を検出し、肝癌組織、細胞株につき *Igf2*、*H19* の imprinting を検索した。肝癌細胞株については *Igf2* LOI 陽性細胞から成る細胞株からクローニングし、純粋な *Igf2* LOI 陽性細胞株を作製して検討した。その結果、肝癌組織、細胞は *Igf2* LOI の有無に関わらず、*H19* は母親アレルから monoallelic に発現していた。一方、*Igf2* DMR1 については *Igf2* LOI(+), (-)細胞で差はみられず、*H19* DMR については *Igf2* LOI(+)細胞で一部に母親アレルの異常メチル化が認められたものの大部分では正常であった。CTCF についてはいずれの細胞でも発現があり、変異も認められなかった。これらの結果は *Igf2* DMR1 及び *H19* DMR による *Igf2* の imprinting の維持機構はほぼ正常に保たれていることを示し、癌細胞の *Igf2* LOI の機序を考える上で重要な知見である。

本論文提出者は試問審査においても明確な回答が得られ、関連領域について十分な知識を有していることが判明した。よって本審査委員会は本論文が学位論文として値するものと判定した。