

【目的】がん細胞には正常細胞に無いゲノム異常が認められるが、それ以上の数のエピゲノム異常が認められる。特に小児固形腫瘍の多くはドライバー変異に乏しく、エピゲノム異常が密接に病態と関連する。実際に DNA メチル化酵素の阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤が治療薬として認可されている。そのため、エピゲノムを変化させる物質は、がんを含む各種疾患の予防や治療のシード化合物になり得ると考えられる。しかしその探索として特定のエピゲノム関連酵素を標的に阻害剤のハイスループットスクリーニングが行われているが有用な探索方法は無いといえる。そこで本研究では、最近充実してきたエピゲノムの大規模情報に注目した。公的データベースを含む各種エピゲノムのデータ入手、バイオインフォマティクス的手法を用いてスクリーニングに適する標的遺伝子と細胞株の組み合わせを同定、標的遺伝子のエピゲノムが変化したときの産物を検出できるようにすることで、細胞ベースでエピゲノムの変化異常を誘発する物質を高感度に検出する系 (図) を新たに構築することを目的とした。

【方法】細胞株とその処理 LoVo, CW-2, HCT116, DLD-1, HT-29, Caco-2, HepG2, HuH-7, Jhh4, HLF, A172, T98G, No11, KALS-1, EN の各細胞株は、理化学研究所細胞材料開発室、JCRB 細胞バンク、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター・細胞バンクから分与を受けた。一部の細胞株は酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、バルプロ酸ナトリウム各 20 mM を含む培地で 24 時間培養した。データベース解析各がん種の細胞株の DNA メチル化については、GEO の GSE68379 における HM450K で解析したデータを用いた。変異については、COSMIC の Cell Lines Project のデータを用いた。RNA-seq 解析 Stranded RNA-seq は、Novogene 社において、NEBNext UltraII Directional RNA Library Prep Kit を用いてライブラリを合成、MGI DNBSEQ-T7 を用いてシーケンシングすることによって行った。配列の QC は Fastp、マッピングは Star を用いて行い、RSEM を用いて TPM を計算することによって各遺伝子の定量を行った。

【結果】1. 網羅的ゲノム解析結果の活用による細胞の選定：DNA メチル化酵素にゲノム異常が無く、脱メチル化酵素 TET1~3 の全てが変異で不活化している細胞株を探索した結果、子宮内膜癌細胞株 EN 1 個のみが該当することを見出した。全ゲノム中 48 万 5 千箇所の CpG のメチル化レベルの平均値は EN で 0.604 と最も高い値を示すことが明らかになった。以上の結果は、EN 細胞株は DNA メチル化異常が起きやすく、メチル化異常のスクリーニングに適していることを示している。EN 細胞株を既知の DNA メチル化誘導因子で処理し、DNA メチル化誘導の起きやすい遺伝子を同定すると共に、エピゲノム変化と並行して起きるスクリーニングにおける検出に適した変化の同定を試みている。2. 短鎖脂肪酸によるエピゲノム変化の誘導：大腸がん細胞株を酪酸およびプロピオン酸と、バルプロ酸を用いて CW-2 と Caco-2 を処理し、遺伝子発現変化を RNA-seq により解析した結果、特にポリアミンの代謝に関連する遺伝子 (*ODCI*, *SAT1*) の大幅な発現変化が認められた。ポリアミンの物質量を HPLC-MS により解析する試みを進めている。その一方で、プロピオン酸にのみ重要ながん関連遺伝子を含む多くの遺伝子についてスプライシング異常を認めた。以上、本研究の目的であるエピゲノムの変化異常を誘発する物質を高感度に検出する系を新たに構築することは期間内に完了できなかったが、多くの興味深い知見を得ることができた。今後も研究を継続し、初期目的の達成を目指す。

本研究における細胞系スクリーニングシステムの模式図

