

論 文 内 容 要 旨

題目 *ZNF350* promoter methylation accelerates colon cancer cell migration

(*ZNF350* プロモーターのメチル化は大腸がん細胞の遊走を促進する)

著者 Hiroki Tanaka, Yuki Kuwano, Tatsuya Nishikawa, Kazuhito Rokutan,  
Kensei Nishida

平成30年12月4日発行 Oncotarget 第9巻第95号  
36750ページ～36769ページに発表済

内容要旨

がん細胞の悪性形質転換の一つである上皮間葉転換は、がん微小環境の変化に適応するための反応であり、間葉系細胞の形質を獲得することで周囲組織への遊走と浸潤能を獲得する。近年、この形質転換の誘因の一つとして、DNAメチル化に代表されるエピジェネティック機構が注目されている。本研究では、大腸がん細胞株 HCT116 細胞から遊走能の異なる二つの細胞集団を樹立し、DNAメチル化による大腸がん細胞の遊走能の獲得について検討した。

HCT116 細胞をトランズウェルで培養した後、トランズウェルメンブレンを通過した細胞（遊走能が亢進している細胞）とメンブレン上に残っている細胞（遊走能が低い細胞）をそれぞれ別々に回収した。この操作を、それぞれの細胞で5回繰り返して純化し、高い遊走能をもつ migrated cells (MG cells) と遊走能を持たない non-migrated cells (non-MG cells) を分離し、以下の実験を行った。

MG 細胞と non-MG 細胞には増殖能に差を認めなかった。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、MG 細胞と non-MG 細胞との間で1.5倍以上有意に発現量が変化した4,178遺伝子を同定した。パスウェイ解析の結果、MG細胞は“Cellular Movement”に関連する遺伝子群の発現が亢進していた。上皮間葉転換の4つの代表的なマーカーの中では、*ZEB1* および *VIM* 遺伝子は、MG細胞で発現が亢進していることを認めたが、*CDH1* および *SNAIL* 遺伝子は、両細胞間で発現量に差を認めなかった。これらのことから、樹立した MG 細胞は上皮間葉転換の中間体であることが示唆された。MG細胞をDNAメチルトランスフ

## 様式(8)

エラーゼ阻害剤 (5-アザシチジン) で処理すると遊走能が低下したことから、DNA メチル化による遊走能の獲得機構に注目した。マイクロアレイを用いた網羅的 DNA メチル化と遺伝子発現の解析を行い、MG 細胞において DNA メチル化が亢進し、かつ、5-アザシチジン処理により遺伝子発現が上昇する 35 遺伝子を同定した。臨床データベース The Cancer Genome Atlas を用いて、これらの 35 遺伝子の DNA メチル化と遺伝子発現量の相関係数について、大腸がん組織で調べたところ、*ZNF350* 遺伝子が最も強い負の相関を示した。さらに、大腸がんの臨床検体を用いた解析から、*ZNF350* は、周囲の正常組織に比べて大腸がん組織では *ZNF350* 遺伝子の発現が有意に低下していた。さらに、*ZNF350* タンパク質を過剰発現した HCT116 細胞は遊走能が低下し、*ZNF350* をノックダウンすると遊走能が亢進することを確認した。最後に、*ZNF350* のプロモーター領域の DNA メチル化をパイロシーケンス法で確認すると、5 箇所の CpG サイトの DNA メチル化が MG 細胞において有意に亢進していることを確認した。さらに、*ZNF350* のプロモーター活性を測定した結果、これらの CpG サイトは *ZNF350* の基本転写活性を有する領域に含まれることも確認した。

以上の結果から、*ZNF350* プロモーター領域におけるメチル化は大腸がん細胞の遊走能の獲得に関与する可能性を見出した。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 <b>1406</b> 号	氏名	田中 裕基
審査委員	主査 高山 哲治 副査 片桐 豊雅 副査 常山 幸一		

題目 *ZNF350* promoter methylation accelerates colon cancer cell migration

(*ZNF350* プロモーターのメチル化は大腸がん細胞の遊走を促進する)

著者 Hiroki Tanaka, Yuki Kuwano, Tatsuya Nishikawa, Kazuhito Rokutan, Kensei Nishida

平成30年12月4日発行 Oncotarget 第9巻第95号  
 36750ページ～36769ページに発表済  
 (主任教授 勢井 宏義)

要旨 上皮系がん細胞は、上皮間葉転換により間葉系細胞の形質を獲得して周囲組織への遊走能及び浸潤能が増強する。大腸がんにおいても、上皮間葉転換により遊走能や浸潤能が増強すると考えられるが、その詳細な機序は不明である。申請者は、この形質転換の誘因としてDNAメチル化に着目し、大腸がん細胞の遊走能獲得の機序を検討した。得られた結果は以下のごとくである。

1. 大腸がん細胞 HCT116 から、トランズウェル法を用いて、高い遊走能を有する細胞(MG細胞)と遊走能が低い細胞(non-MG細胞)を分離培養した。
2. MG細胞は、non-MG細胞に比べ、細胞運動に関連する遺伝子群の発現が変化し、上皮間葉転換マーカーである *ZEB1* 及び *VIM*

遺伝子の発現が亢進していた。

3. MG 細胞に DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤 (5-アザシチジン) を加えて脱メチル化すると、その遊走能が低下した。
4. MG 細胞、脱メチル化した MG 細胞、及び、non-MG 細胞の網羅的 DNA メチル化と遺伝子発現の解析を行い、DNA メチル化により遺伝子発現が抑制される 35 遺伝子を同定した。
5. 35 遺伝子について臨床データベース The Cancer Genome Atlas を用いて解析したところ、DNA メチル化亢進と遺伝子発現の低下が最も相関する遺伝子として *ZNF350* 遺伝子を抽出した。
6. ヒト大腸がん組織では、周囲の正常組織に比べて *ZNF350* 遺伝子の発現が有意に低下していた。
7. MG 細胞を用いて *ZNF350* タンパク質を過剰発現すると細胞遊走能が低下し、non-MG 細胞を用いて *ZNF350* をノックダウンすると細胞遊走能が亢進した。
8. MG 細胞は、non-MG 細胞に比べて、*ZNF350* 遺伝子の基本転写活性に関わる領域に存在する CpG サイトのメチル化が有意に亢進していた。

以上の結果から、*ZNF350* プロモーターのメチル化は、*ZNF350* の発現を抑制し、大腸がん細胞の遊走能の獲得に関与することが示唆された。本研究は、大腸がん悪性形質獲得機構の新たな経路を示したものであり、臨床的にも重要な知見であることから学位授与に値すると判定した。