

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 16 年度博士課程 入学

氏名 岩谷 美沙

指導教員 塩田 邦郎

論文題目 サリドマイドのエピジェネティック薬理作用に関する研究

序論

1950 年代に睡眠薬として用いられていたサリドマイドは、その催奇形性により世界的な薬害をもたらした。一方、現在では様々なガンや自己免疫性疾患の治療に有効であり、使用される疾患の数は 100 を超える。サリドマイドの作用機序として主に TNF- α が関連する分子伝達系の関与が示唆されている。

エピジェネティック機構は DNA メチル化とヒストン修飾によって維持され、細胞世代を超えても継承される遺伝子発現記憶装置である。正常細胞、組織の DNA メチル化プロファイルの比較により、組織特異的メチル化可変領域 (T-DMR) の存在が示され、ゲノム全体に存在する T-DMR における DNA メチル化状態が、細胞種に固有の DNA メチル化プロファイルを形成している。DNA メチル化プロファイルの形成には DNA メチル基転移酵素 (Dnmt) の他、ヒストン修飾も関与する。これらの酵素欠損胚は胎性致死、発生異常となる。さらに、いくつかのエピジェネティック制御因子の変異は疾患につながる。これらの結果は、正常な DNA メチル化プロファイルの形成が正常な胚発生、個体の維持に重要な役割を果たすことを示唆している。

分化多能性をもつ胚性幹細胞 (ES 細胞) は *in vitro*、*in vivo* における細胞分化誘導の系が確立しており、三胚葉に分化することができる。ES 細胞から胚様体、胚様体からテラトーマ形成過程においては、それぞれ固有の遺伝子座セットで DNA メチル化状態の変化が起こり、胚様体、テラトーマ固有の DNA メチル化プロファイルが形成される。従って、ES 細胞、胚

様体、テラトーマを用いることにより、DNA メチル化プロファイルの形成と、それに伴う細胞分化に及ぼすサリドマイドの影響を調べることができる。

本研究ではサリドマイドの薬理作用にエピジェネティック状態の変化が含まれるかを調べるため、胚様体の DNA メチル化プロファイルの形成過程にサリドマイドが及ぼす影響を解析した。*In vitro* 系におけるサリドマイドの研究で生じる問題は、水に対する不溶性である。サリドマイドの溶媒として、ジメチルサルフォキシド (DMSO) を用いた。しかし、DMSO 自体が細胞機能に対して様々な影響を与え、特に細胞の分化を誘導する作用を持つ。これまで DMSO がエピジェネティック状態に影響を与えるか否かは報告がない。第一章では胚様体の DNA メチル化プロファイルの形成に DMSO が及ぼす影響を検証した。第二章では DNA メチル化プロファイルの解析により、胚様体、ES 細胞においてサリドマイドが DNA メチル化状態に変化をもたらす遺伝子座を特定した。さらに、ES 細胞の分化誘導系を用い、サリドマイドが細胞分化に与える影響を解析した。

第一章

0.1% (v/v) DMSO 処理胚様体を用い、繰り返し配列における DNA メチル化状態への影響を調べた。内在性レトロウイルス由来繰り返し配列やマイナーサテライト繰り返し配列においてはメチル化が誘導された。遺伝子領域を含むゲノム全体の DNA メチル化プロファイルへの影響を解析すると、約 2000 箇所のうち、DMSO 処理によって 11 箇所の遺伝子座で脱メチル化、4 箇所でメチル化が誘導された。さらにマイクロアレイ法を用い遺伝子上流域の DNA メチル化状態を解析し、2 箇所のメチル化領域、3 箇所の脱メチル化領域を発見した。DMSO により DNA メチル化プロファイルの変化が見られたことから、エピジェネティック制御因子の発現状態を解析した。すると、DMSO 濃度 [0.02-1% (v/v)] に伴って *Dnmt3a* の mRNA レベルの上昇が見られた。ウェスタンブロット法による解析では、*Dnmt3a* とそのアイソフォームである *Dnmt3a2* のタンパク質レベルの上昇が認められた。DMSO はエピジェネティック制御因子である *Dnmt3a* 発現の上昇、ゲノム全体の特定遺伝子座の DNA メチル化状態の変化を引き起こすことによって、エピジェネティックプロファイルに影響を与えることが明らかとなった。

第二章

胚様体の DNA メチル化プロファイルの形成過程における (±)-サリドマイドの影響を RLGS 法によって調べた。約 2000 箇所の遺伝子座のうち 7 箇所で脱メチル化、2 箇所でメチル化が誘導された。さらに DNA メチル化状態が変化する遺伝子座を特定するため、マイクロアレイ法により遺伝子上流域における DNA メチル化状態の解析を行った。その結果、サリドマイドによってメチル化される領域を 8 箇所、脱メチル化される領域を 4 箇所発見した。その中には、転写因子である *Pou2f1* 遺伝子のメチル化誘導やコアヒストンのサブタイプである *H3.2* 遺伝子の脱メチル化などが認められた。またサリドマイドによって DNA メチル化状態が変化する 12 の遺伝子領域のうち、6 箇所ではヒト、マウス間で高い相同性を示した。次に DNA メチル化

状態の変化が表現型変化を伴うかについて検討した。胚様体では、(±)-サリドマイド処理による顕著な変化は見られないものの、光学異性体である(-)-サリドマイド存在下においては胚様体同士の接着が観察された。未処理胚様体あるいはサリドマイド処理胚様体を用い、サリドマイド投与下でテラトーマを形成させると、(±)-サリドマイド及び(-)-サリドマイド投与群で軟骨形成の促進が観察され、その効果は胚様体形成時からの処理検体で顕著であった。このことは、胚様体形成時に起きたサリドマイドによる DNA メチル化状態の変化と、その後の表現型変化との関連を示唆している。さらに異なる細胞種におけるサリドマイドによる DNA メチル化状態の変化を調べるため、未分化 ES 細胞を用いて解析を行い、それぞれ 5 箇所の脱メチル化、メチル化遺伝子座を発見した。胚様体と ES 細胞間で、影響を受けた遺伝子座を比較すると、1 箇所の DNA メチル化状態の変化が一致した。

総括

本研究では、ES 細胞から胚様体へ分化する系において、サリドマイドが DNA メチル化プロファイルの形成に影響を与えることを明らかにした。そして ES 細胞から胚様体、胚様体からテラトーマへの分化過程におけるサリドマイド投与により、テラトーマ中の細胞種の割合が変化し、軟骨組織の出現頻度が上昇することを示した。

DNA メチル化は遺伝子発現のオン・オフを決定する。そしてこの遺伝子発現記憶装置は細胞世代を超えて継承される。ゲノム中に多数存在する T-DMR の DNA メチル化状態の組み合わせである DNA メチル化プロファイルは、細胞分化、個体発生過程において形成されていく。サリドマイド処理した胚様体の RLGS 解析では、約 2000 箇所の遺伝子座のうち、DNA メチル化状態が変化した遺伝子座は 9 箇所存在した。マイクロアレイ法を用いた DNA メチル化解析では、RLGS 法とは異なる領域において DNA メチル化状態の変化を確認した。その中には、サリドマイドの分子機構に重要とされる TNF- α の情報伝達経路への関与が示唆される分子、Pou2f1、エピジェネティック機構に関与することが示唆されているコアヒストンのサブタイプ、H3.2 が含まれていた。

DNA メチル化状態に影響を受ける遺伝子座は、DMSO とサリドマイドでは異なっており、またサリドマイドと DMSO の組み合わせにより、DMSO 処理で起こった DNA メチル化状態の変化が失われる遺伝子座が存在した。DNA メチル化プロファイルの形成には、Dnmt3a などの Dnmt だけでなく、G9a のようなヒストン修飾酵素も関与する。DMSO 処理では Dnmt3a の発現上昇が、サリドマイド処理ではコアヒストンのサブタイプ、H3.2 遺伝子領域の DNA メチル化状態の変化が認められた。そしてヒストン修飾はサブタイプ特異的に起こることが報告されつつある。従って、サリドマイド、DMSO によって胚様体の DNA メチル化プロファイルが変化する過程にこれらの因子が関与すること、また関与する因子の違いが異なる遺伝子座のメチル化状態に影響を与える要因であることが示唆される。

多くの遺伝子座におけるヒト、マウス間の DNA メチル化状態、ヒストン修飾状態の共通性が近年報告されている。サリドマイドによって DNA メチル化状態が変化する 12 の遺伝子

領域のうち 6 箇所ではヒト、マウス間で高い相同性が見られた。このことは今回の結果のヒトへの応用の可能性を示唆している。その一方、サリドマイドによって DNA メチル化状態が影響を受ける遺伝子座は細胞種によって異なることから、サリドマイドが有効とされている疾患、例えば白血病やガンなどの細胞の DNA メチル化解析によって新しい標的遺伝子座が特定される可能性も高い。

本研究では、サリドマイドが細胞分化と DNA メチル化プロファイルの形成に影響を与えることを示すことにより、サリドマイドのエピジェネティック薬理作用を明らかにした。この成果により、サリドマイドの薬理作用を新しい観点から解釈することが可能となったと同時に、薬剤がエピジェネティック状態へ与える影響を解析する重要性が示された。