

表 題 細胞内スเปルミン濃度の生理的な変化による遺伝子メチル化への影響に  
関する研究

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 福井 太郎

担当指導教員氏名 教授 力山 敏樹

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系  
総合医学専攻  
外科系総合医学

2018年1月10日申請の学位論文

## 目次

|                |        |
|----------------|--------|
| はじめに . . . . . | p.1.   |
| 方法 . . . . .   | p.5.   |
| 結果 . . . . .   | p.13.  |
| 考察 . . . . .   | p. 25. |
| おわりに . . . . . | p.29.  |
| 謝辞 . . . . .   | p.31.  |
| 文献 . . . . .   | p.32.  |

はじめに

豆、野菜、魚といった食品、地中海食、日本食といった食事習慣は健康長寿への関連や一部のがんの発症率低下が指摘されている(1, 2, 3, 4, 5, 6)。近年報告されたランダム化比較試験では地中海食の摂取により浸潤性の乳癌の発症が抑制されるといった報告がなされている(7)。そのような食品や食事習慣に豊富に含まれているのが我々の研究対象であるポリアミンである(8, 9, 10)。ポリアミンにより加齢や生活習慣病・癌の発症を抑制することを長期的な目標とし、その効果について研究を行ってきた。

ポリアミンは第一級アミノ基が複数個結合した直鎖脂肪族炭化水素の総称で、代表的なポリアミンは、アミノ基を3個有する Spermidine (Spd) と4個有する Spermine (Spm) である。ポリアミンはほとんどすべての細胞内で合成され、細胞の分化や増殖などの様々な細胞機能に必要不可欠な物質であるが、ポリアミンは細胞外からも供給される。体内の局所に投与されたポリアミンは全身の臓器や組織に移行するために、癌細胞のようなポリアミンを持続的かつ多量に合成する細胞集団が体内に存在したり、消化管へのポリアミン供給が持続的に増加すると、血液細胞内のポリアミン濃度が上昇することが知られている(11, 12)。

ポリアミンは細胞の分化や増殖に必要不可欠であり、抗酸化作用(13, 14)、抗炎症作用 (15, 16)、遺伝子保護作用(17, 18)、細胞保護作用(19, 20)など多数の生理

活性が報告されている。しかし、類似の作用を有する植物由来の抗酸化物質は哺乳類の寿命を延長できない可能性が報告されている(21,22,23)。ポリアミンのその他の生理作用を検討するにあたり、我々はポリアミンと遺伝子メチル化の関係に着目し研究を行ってきた。

遺伝子メチル化は様々な病態に関与しているが、ポリアミン代謝と遺伝子メチル化に係る代謝の間には密接な関係がある（図1）。

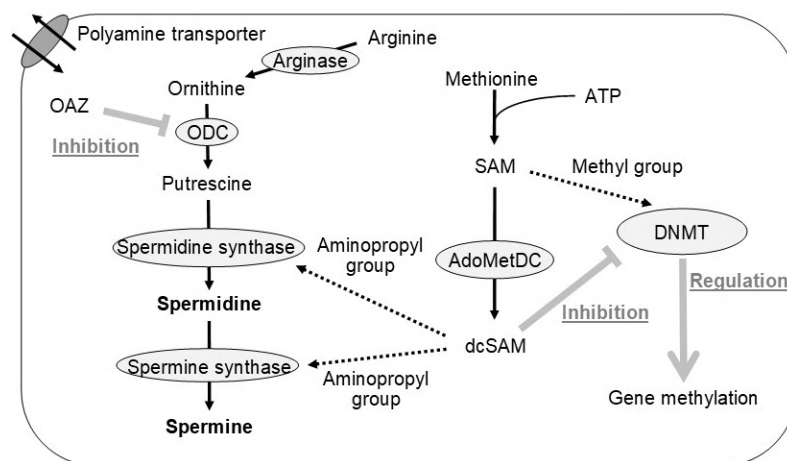


図1 ポリアミン合成系と遺伝子メチル化経路

AdoMetDC: S-adenosylmethionine decarboxylase, ATP: Adenosine triphosphate,

dcSAM: decarboxylated S-adenosylmethionine, DNMT: DNA methyltransferase, OAZ:

ODC antizyme-1, ODC: Ornithine decarboxylase, SAM: S-adenosylmethionine

ポリアミンの生体内での合成において、Arginase の作用を受け Arginine から合成された Ornithine が、ポリアミン合成の律速酵素である Ornithine

Decarboxylase (ODC)の作用を受けて Putrescine になる。Spermidine が合成される際には、Adenosine と Methionine から合成される生体内物質である S-adenosyl-L-methionine (SAM) が S-Adenosyl methionine decarboxylase (AdoMetDC) の作用により合成される dcSAM Decarboxylated S-adenosyl methionine (dcSAM)から供給される Aminopropyl 基がスぺルミジン合成酵素 (Spermidine synthase) の作用により付与される。さらに、スぺルミン合成酵素 (Spermine synthase) の作用によって、Aminopropyl 基が Spermidine に付与されて、Spermine が合成される。

ポリアミンは Arginine と SAM から合成されるが、SAM は体内でのメチル基供与体としても作用する。メチル基の付与によって生じる遺伝子やヒストンなどのタンパク質のメチル化修飾は、それらの機能調整に深くかかわっていることが知られている。遺伝子メチル化とは、DNA のシトシンにメチル基が付与される反応であるが、転写の制御に関わる重要なエピジェネティック修飾機構の一つであり、遺伝子発現の調整に重要な役割を担っている。SAM から DNA のシトシンへのメチル基の付与は、DNA メチル基転移酵素 (DNA methyltransferase (DNMT)) の作用によって触媒される。一方、AdoMetDC の作用により SAM から合成される dcSAM は DNMT 活性を抑制すると考えられている(24)。

これらのことから、SAM や dcSAM 濃度、および AdoMetDC 活性に影響を

及ぼす代謝の変化は遺伝子のメチル化にも影響を及ぼすことが推測できる。実際に、メチル基の供与体を欠乏させた餌を動物に投与すると様々な遺伝子の低メチル化が生じることが報告されている(25, 26)。反対に、メチル基を供給することによって、遺伝子のメチル化が変化し、遺伝子発現にも影響を与えることも報告されている(27)。我々もポリアミンを細胞に供給したところ、遺伝子のメチル化に変化が生じることを確認した(28, 29)。また、動物に長期間高ポリアミン餌を投与すると遺伝子のメチル化に変化が生じ、老化が抑制され寿命が延長することを確認した(30, 31)。しかし、メチル基の供与体やポリアミンの濃度の変化が遺伝子のメチル化機構に及ぼす基礎的背景は不明である。

そこで、本研究では、ポリアミン合成能の低下や細胞外からのポリアミン供給が、ポリアミン代謝および遺伝子メチル化に係る物質濃度や酵素活性におよぼす影響を検討し、加齢に伴う生活習慣病発症に関わる遺伝子などを含めた遺伝子プロモーター領域のメチル化におよぼす影響をゲノムワイドな解析手法により検索した。なお、我々のこれまでの検討では、高ポリアミン食の継続摂取を行ったヒトとマウスでは血液細胞内S濃度は1.1-1.5倍程度に増加するが、Spd濃度の上昇は明確には認められない(31)。また、細胞レベルでの検討では、500 $\mu$ MのSpmと培養した細胞内のSpm濃度は生体内での変化の範囲内まで上昇した。しかし、Spmと同じ濃度のSpdは同程度の生理活性を発揮するものの、細

胞内Spd濃度は生理的上昇の範囲を大きく超えていた(15)。よって、体内での生理的な反応を再現するため、Spmを用いて検討した。

## 方法

### 細胞と培養条件

Jurkat細胞（E6-1, ATCC Number: TIB-152）およびヒト乳腺上皮細胞（Human Mammary Epithelial Cell（HMEpC）（Cell Applications INC., CA, USA））を実験に用いた。Jurkat細胞は、細胞密度が  $1.0 \times 10^6$  cells/mlとなるように調整し、10%非働化ヒト血清（Cosmo Bio Co., Ltd. Tokyo, Japan）を含むRPMI-1640培養液（Sigma-Aldrich Co., MO, USA）で72時間培養し、その後の実験に用いた。

HMEpCは、細胞密度が  $5.0 \times 10^4$  cells/mlとなるように調整後、無血清培地

（MammaryLife™ Comp Kit, （Kurabo Industries Ltd., Tokyo, Japan））で培養し、添付された培養方法のプロトコールに従って継代を行った。細胞数が十分に増加した時点で細胞を回収し実験に用いた。

培養の際、加齢とともに生じる変化であるポリアミン産生に関わるODCの活性低下を再現するために、培養液中にODCを不可逆的に阻害するD,L-alpha-difluoromethylornithine hydrochloride (DFMO)を加えた。

細胞数が十分に得られた時点で、下記の条件で72時間培養して各種実験に用

いた。①通常培養（Jurkat：RPMI-1640 + 10%非働化ヒト血清、HMEpC：無血清培地）、②通常培養液にDFMO (D,L-alpha-difluoromethylornithine)を混じた培養液、③通常培養液にSpermine（Spm）(Sigma-Aldrich Co., MO, USA)を加えた培養液、④培養液中にDFMOとSpmを混じた培養液。

Jurkat細胞での検討ではこれまで行ってきた実験プロトコールに従い、DFMOとSpmの濃度はそれぞれ3.0 mMと500 $\mu$ Mに設定した。HMEpCを様々な濃度のDFMOおよびSpmで培養し、MTT(3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole)アッセイ（IN VITRO TOXICOLOGY ASSAY KIT, (Sigma-Aldrich INC., MO, USA)）で検討し、細胞数や活性の低下が認められない最大の濃度を決定した。その結果、DFMOは24mMの濃度とし、Spmは500 $\mu$ Mの濃度に設定した（図2）。

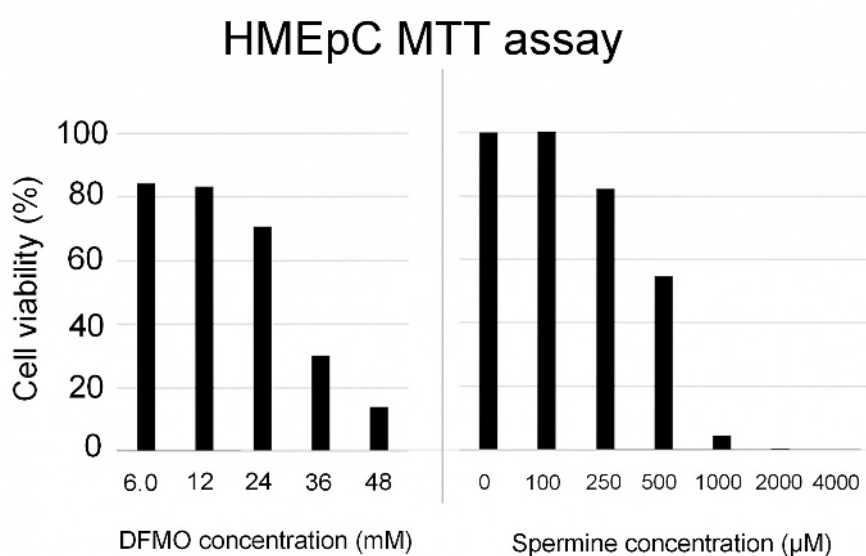




図2 DFMOと Spermineの至適濃度決定のためのHMEpCのMTTアッセイ結果  
各AssayはTriplicateで同条件の実験を3回行った。同様の傾向であったため、代表的な結果を示している。

### 細胞内ポリアミン濃度測定

各種条件で培養した細胞のポリアミンを過去の報告に一部修正を加えて抽出した(32, 33)。各条件で培養した細胞を遠心 (Jurkat細胞：1200rpm, 3分, 4°C, HMEpC：220g, 5分, 4°C) して、得られた沈査をJurkat細胞は $1.0 \times 10^6$  個、およびHMEpCは $1.0 \times 10^5$ 個あたり50 $\mu$ lの0.2 M 過塩素酸に懸濁してタンパク質除去を行った。その後、超音波破碎(150 w, 10秒  $\times$  3回) (Ultrasonic Cleaner VS-150, IUCHI KOKI INC., Tokyo, Japan) を行いvortexした。遠心分離 (14,000g, 10分, 4°C) して得られた上清の50 $\mu$ lを300 $\mu$ lのダンシルクロライド(10mg/ml)を反応させて蛍光誘導体化し、500 $\mu$ lのアセトニトリルに再溶解した。抽出液中の濃度を逆相高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography) (HPLC) (LC-20AB, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) で測定した。

カラムはCapcell pak C18 MG (Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan)を使用し、HPLCへの試料注入量は一回10 $\mu$ lとした。溶離液の組成はA液：55%(v/v)10 mMリン酸アンモニウム+45%(v/v)アセトニトリル, pH 4.4, およびB液：100% アセトニ

トリル, pH 4.4とした。カラムオーブンの温度は50°C, flow rateは0.9 ml/minに設定した。グラディエント設定は、溶離液Aを18%・溶離液Bを82%から15分のリニアグラディエントで溶離液Aを100%とし、7分間保持した後、A18%・B82%で8分間平衡化させた。

励起波長360nm、蛍光波長500nmで測定した。得られたデータはLC Workstation chromatography software (Shimadzu) を使用して処理した。

### **AdoMet DC 活性測定**

各条件で培養したJurkat細胞を1×PBS (Phosphate Buffered Saline) (-)で洗浄後に遠心し (1200rpm、4°C、3分)、得られたCell pelletに対してExtraction buffer (1mM dithiothreitol (DTT), 1.0mM EDTA, 0.01% Tween80を含む25mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.2) ) 300μlに懸濁し、超音波破碎した後 (150w、10秒×3回) に遠心分離 (15000rpm、4°C、30分) し、細胞内タンパク質を含んだ上清を得た。

測定の原理は、S-Adenosyl-L-methionine [carboxyl-14C]がAdoMet DCによりdc SAMへ変換される際に放出されるCO<sub>2</sub>の量を測定する方法である。2ml Eppendorf tubeのキャップの内側に濾紙を装着し、Reaction mixture (250mM phosphate buffer(pH 7.5)、15mM DTT) 20μl +25mM Putrescine dihydrochloride 15μl + サンプル (細胞内タンパク質溶液) 80μlを混合し、SAMカクテル (4.8mM

Cold SAM (New England Biolabs INC, MA, USA) 、 0.2 mM S-Adenosyl-L-methionine [carboxyl- $^{14}\text{C}$ ] (0.1 $\mu\text{Ci}$ /反応) (American Radiolabeled Chemicals INC, MO, USA) 10 $\mu\text{l}$ を加えた。アルカリによる $\text{CO}_2$ の吸着のため、10% KOHをキャップの濾紙に浸透させ、すぐにキャップを閉じ、37°Cで30分反応させ、速やかに15分氷冷した。その後、溶存した $\text{CO}_2$ を遊離させるため50 $\mu\text{l}$  6N HClを反応液へ混合し、速やかにキャップを閉じ、37°Cで15分反応させ放出された $^{14}\text{CO}_2$ を濾紙へ吸着した。

氷冷の後、3.5mlのシンチレーション液の入ったシンチレーションバイアルに濾紙を入れ、カウンターで4分間、3回計測した。

### **SAMおよびdc SAM定量分析**

細胞内SAMおよびdc SAM濃度は逆相HPLC(LC-20AB, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)を用いて測定した。各種条件で培養した細胞を細胞内ポリアミン濃度測定と同じ条件で調整した。カラムはCapcell pak C18 SG120 (4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm) (Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。HPLCへの試料一回注入量は20 $\mu\text{l}$ とした。

溶離液の組成はA液：90%(v/v) 0.1 M 酢酸ナトリウム(酢酸によりpH 4.50へ調整) + 10mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム (Tokyo Kasei Kogyo Comp.,

Ltd, Tokyo, Japan) + 10%(v/v) メタノール、およびB液：90%(v/v) 0.2 M 酢酸ナトリウム(pH 4.50) — アセトニトリル (10:3) + 10mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム+10%(v/v) メタノールとした。グラデーションの設定は、溶離液Aを0%から50分のリニアグラデーションで100%とし、10分間保持した後、0%で10分間平衡化させた。UV detector (SPD-20A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) を使用し、250nmで測定し、データ処理はLC Workstation chromatography software (Shimadzu)を使用した。

### **DNA Methyltransferase (Dnmt) のサブタイプ別の定量および活性の測定**

核内タンパク質の抽出にはEpiQuik Nuclear Extraction Kit I (Epigentek Group INC., NY, USA) を使用した。Jurkat細胞 $1.0 \times 10^6$ 個あたり1 $\mu$ lのextraction bufferで核内タンパク質を抽出した。

DNMT 1、3 A、3 Bのタンパク質濃度の測定には、EpiQuik DNMT1 Assay Kit (Epigentek Group INC., NY, USA)、EpiQuik DNMT3A Assay kit (Epigentek)、EpiQuik DNMT3B Assay Kit (Epigentek) をそれぞれ使用した。細胞から抽出した核タンパク質液を、各DNMTに親和性のある基質で被覆されたプレート上で反応させた後 (37°C、2時間)、比色法によりマルチプレートリーダー (DTX 880 Multimode Detector) (Beckman Coulter INC., CA, USA) で検出した

(450nm)。

DNMT 1、3 A、3 Bの活性の評価には、EpiQuik DNA Methyltransferase 1 Activity/Inhibitor Screening Assay Core Kit (Epigentek)、DNMT3A Direct Activity Assay Kit (BPS Bioscience Corp., MO, USA)、EpiQuik DNA Methyltransferase 3B Activity/Inhibitor Screening Assay Core Kit (Epigentek)をそれぞれ使用した。核タンパク質液をアッセイバッファーで調整して各DNMTタンパク濃度を一定にした。シトシンに富むDNA被覆プレート上でアッセイバッファーと共にインキュベートし (37°C、2時間)、DNMT1、DNMT3Bは比色法(450nm)で、DNMT3AはHRPによる化学発光(1000m second)により、マルチプレートリーダーで検出した。解析はMultimode Analysis Software ver.3.2.0.5 (Beckman Coulter INC.) で行った。各培養条件での測定値を通常培養での測定値で除し、indexで活性を評価した。

### **Methylation EPIC BeadChip (Infinium) microarray**

Jurkat細胞を用いてメチル化解析アレイを行った。方法は過去の報告に従った(34)。

細胞より抽出した500ngのDNAをEZ DNA Methylation Kit (Zymo Research Corp., CA, USA)でbisulfite処理した。全ゲノム増幅反応後に酵素反応により断片

化して、イソプロパノールで沈殿させた後、ハイブリダイゼーションバッファに再溶解した。熱変性を加え、再溶解したDNAをMethylationEpic BeadChip (Illumina INC., CA, USA)にアプライし、ハイブリダイゼーションオープンで約23時間反応させた。ハイブリダイゼーション後、BeadChipをバッファで洗浄し、一塩基伸長反応によりプローブ末端に一塩基の標識ヌクレオチドを取り込ませた。ハイブリダイズしたゲノムDNAを、取り込ませた標識ヌクレオチドに対する蛍光色素標識抗体を用いて染色を行った。染色したBead Chipは洗浄、コーティングと乾燥を行った後、iScan(Illumina)によって蛍光イメージを取得した。

それぞれのCpGサイトのメチル化レベルは、GenomeStudio® Methylation moduleを用いてメチル化β値( $\beta = \text{intensity of the Methylated allele (M)} / (\text{intensity of the Unmethylated allele (U)} + \text{intensity of the Methylated allele (M)} + 100)$ )を計算した。864,605か所のCpG siteについて、各条件におけるメチル化状態をメチル化β値とそれによって導かれるデータ値 (Diff Score) を用いて、遺伝子プロモーター領域のメチル化状態について比較した。

## 統計処理

統計分析は、EZRフリーソフトウェア（自治医科大学附属さいたま医療セ

ンター) を用いて行った(35)。2群間の差の検定には、分散が等しいと見なせる場合には対応のない t 検定(Unpaired t-test)を、分散が等しくない場合にはマン・ホイットニ(Mann-Whitney)検定を用いた。危険率0.05%以下 ( $p<0.05$ ) で有意な差があるとした。

## 結果

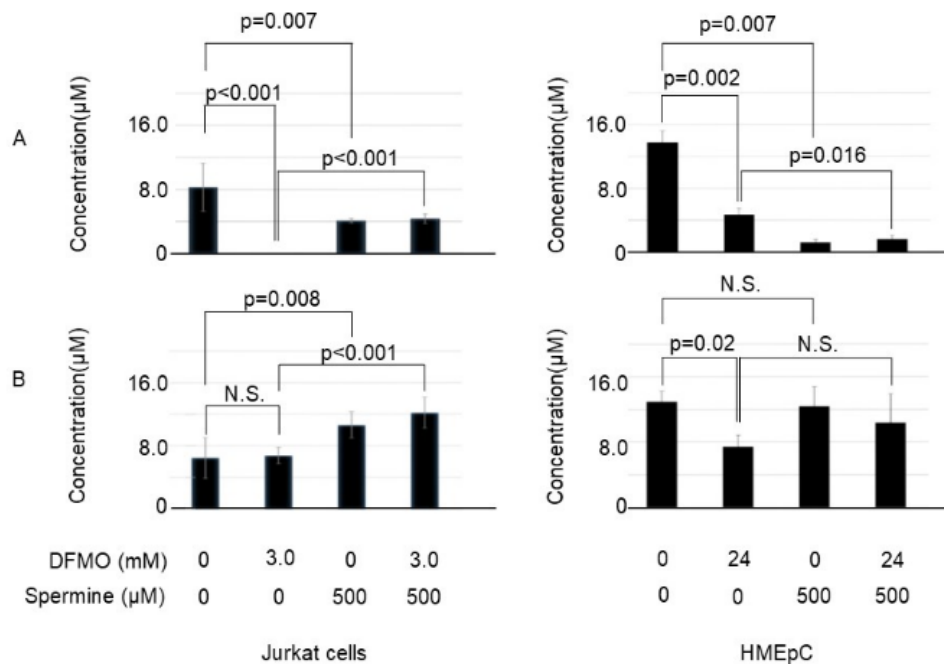
### DFMOとスペルミンによる細胞内ポリアミン濃度の変化

事前に設定したDFMOおよびSpmの至適濃度の検討結果に従い、DFMOの濃度をJurkat細胞では3.0mM、HMEpC細胞では24mMと設定し、Spm濃度はいずれの細胞でも500 $\mu$ Mの濃度で培養した。

通常培養したJurkat細胞 (Control) の細胞内Spd濃度は $8.27\pm 3.01\mu\text{M} / 1.0\times 10^6$  cellsであり、細胞内Spm濃度は $6.45\pm 2.60\mu\text{M} / 1.0\times 10^6$  cellsであった。3.0mMのDFMOとともに培養した細胞では、細胞内Spd濃度は測定感度以下まで減少した ( $p<0.001$ ) が、細胞内Spm濃度の平均値は $6.76\pm 1.03\mu\text{M} / 1.0\times 10^6$  cellsとなり、大きな減少は認めなかった ( $p= 0.793$ )。一方、Spmを加えた細胞では、DFMOの有無にかかわらず細胞内Spm濃度が有意に上昇した( $p<0.001$ )。通常培養した細胞にSpmを加えると細胞内Spd濃度は低下したが ( $p= 0.007$ )、DFMOとともに培養した細胞にSpmを加えると細胞内Spd濃度も上昇した( $p<0.001$ ) (図

3左)。

通常培養したHMEpCの細胞内Spd濃度は $13.79 \pm 1.41 \mu\text{M}/1.0 \times 10^5 \text{cells}$ であり、Spm濃度は $12.93 \pm 1.30 \mu\text{M}/1.0 \times 10^5 \text{cells}$ であった。24mMのDFMOを加えて培養した細胞内のSpd濃度は $4.69 \pm 0.77 \mu\text{M}/1.0 \times 10^5 \text{cells}$ と著明に低下し ( $p=0.002$ )、Spm濃度も $7.42 \pm 1.43 \mu\text{M}/1.0 \times 10^5 \text{cells}$ に低下した ( $p=0.02$ )。Spmを加えて培養すると、Spd濃度は $1.22 \pm 0.39 \mu\text{M}/1.0 \times 10^5 \text{cells}$ と有意に低下したが ( $p=0.007$ )、細胞内Spm濃度は $12.39 \pm 2.37 \mu\text{M}/1.0 \times 10^5 \text{cells}$ であり、通常培養細胞内濃度と差がなかった。一方、DFMOとともに培養した細胞にSpmを添加すると、細胞内Spd濃度は減少したが( $p=0.016$ )、細胞内Spm濃度は軽度上昇したものの、有意差はなかった(図3右)。



N.S.: not significant



### 図3 DFMO およびスぺルミンと培養した細胞内ポリアミン濃度の変化

A : Spermidine concentrations、 B : Spermine concentrations

グラフは、各培養条件における6サンプルの平均値と標準偏差で示している。

対応のない t 検定(Unpaired t-test)検定を使用した。

### AdoMet DC活性、SAM濃度、dc SAM濃度、およびdcSAM/SAM比

DFMOとともに培養したJurkat細胞内のAdoMet DCの活性(数値1:  $50.81 \pm 41.52$  pmol/mg protein/min)は、通常培養した細胞内AdoMet DC活性(数値2:  $1.56 \pm 0.77$  pmol/mg protein/min)と比較すると顕著に上昇した ( $p < 0.001$ )。DFMOおよびSpmとともに培養した細胞( $0.008 \pm 0.18$  pmol/mg protein/min)では、DFMOと培養した細胞で認められたAdoMet DCの活性(数値1)の上昇は著明に抑制された ( $p < 0.001$ )。また、通常培養にSpmを加えて培養 ( $0.03 \pm 0.18$  pmol/mg protein/min) した場合にも通常培養細胞(数値2)より低下した ( $p < 0.001$ ) (図4A左)。

DFMO とともに培養した Jurkat 細胞の細胞内 SAM 濃度 (数値 3:  $1.016 \pm 0.277$   $\mu$ M) は通常培養の細胞 ( $2.27 \pm 0.30$   $\mu$ M) と比較すると低下した ( $p = 0.018$ )。

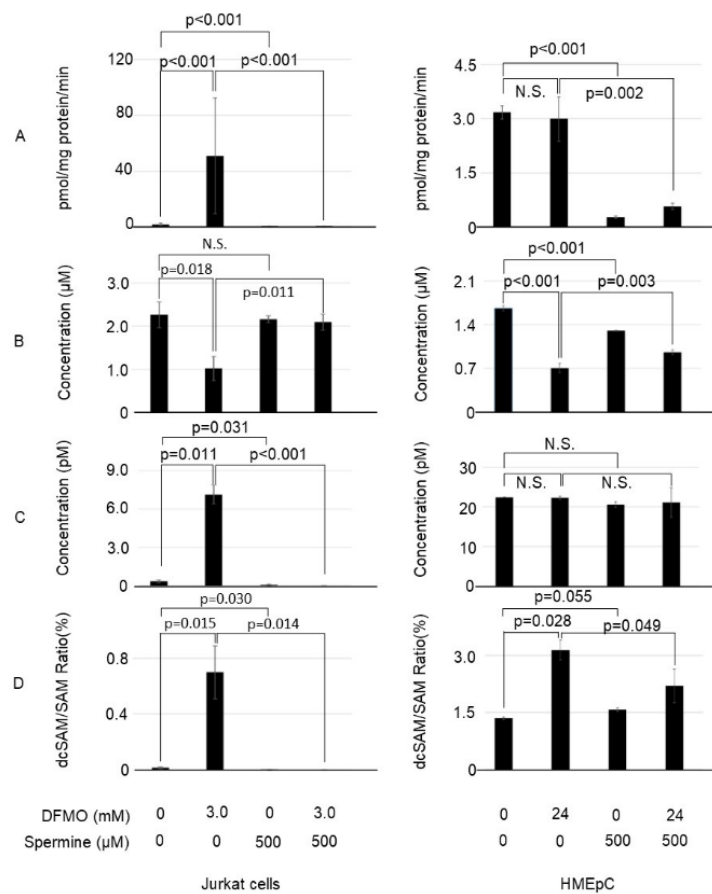
通常培養に Spm を加えた場合には濃度 ( $2.16 \pm 0.09$   $\mu$ M) の変化は認めなかったが ( $p = 0.40$ )、DFMO と Spm で培養した細胞 ( $2.10 \pm 0.19$   $\mu$ M) では DFMO で培

養（数値 3）した細胞より SAM 濃度が上昇した（ $p=0.011$ ）（図 4B 左）。

DFMO で培養した Jurkat 細胞内の dcSAM 濃度（数値 4:  $7.12 \pm 0.74$  pM）は著明に上昇した（ $p=0.001$ ）（図 4C 左）。一方、Spm を加えた細胞では、培養液中の DFMO の有無にかかわらず細胞内 dcSAM 濃度は著明に低下した（通常培養（ $0.335 \pm 0.116$  pM） vs Spm 培養（ $0.04 \pm 0.07$  pM）（ $p=0.031$ ）、DFMO 培養（数値 4） vs DFMO+Spm 培養（ $0 \pm 0$  pM (検出感度以下)）（ $p<0.001$ ））。dcSAM/SAM 濃度比は通常培養（ $0.02 \pm 0.006$  %）では低い値を示したが、DFMO（数値 5:  $0.70 \pm 0.19$  %）により著明に上昇し（ $p=0.015$ ）（図 4D 左）、Spm を加えて培養した細胞では DFMO の有無にかかわらず減少した（通常培養（ $0.02 \pm 0.006$  %） vs Spm 培養（ $0.002 \pm 0.003$  %）（ $p=0.03$ ）、DFMO 培養（数値 5） vs DFMO+Spm 培養（ $0 \pm 0$  % (検出感度以下)）（ $p=0.014$ ））。

HMEpC を DFMO とともに培養（数値 6:  $2.99 \pm 0.47$  pmol/mg protein/min）しても、Jurkat 細胞で認められた AdoMet DC 活性の上昇は確認できなかった（通常培養（数値 7:  $3.17 \pm 0.14$  pmol/mg protein/min）（ $p=0.59$ ）（図 3A 右）。しかし、Spm を加えると、DFMO の有無にかかわらず、AdoMet DC 活性は大きく低下した（（通常培養（数値 7） vs Spm 培養（ $0.28 \pm 0.05$  pmol/mg protein/min）（ $p<0.001$ ）、DFMO 培養（数値 6） vs DFMO+Spm 培養（ $0.57 \pm 0.13$  nmol/mg protein/min）（ $p=0.002$ ））（図 4A 右）。

HMEpC を DFMO とともに培養 ( $0.71 \pm 0.074 \mu\text{M}$ ) すると、SAM 濃度が低下したが (通常培養 ( $1.67 \pm 0.04 \mu\text{M}$ ) ( $p < 0.001$ )) (図 4B 右)、dcSAM 濃度は変化しなかった (通常培養 ( $22.44 \pm 0.02 \text{ pM}$ ) vs DFMO 培養 ( $22.27 \pm 0.45 \text{ pM}$ ) (図 4C 右))。また、通常培養細胞に Spm を加えて培養すると、細胞内 SAM 濃度が低下したが ((通常培養 ( $1.67 \pm 0.04 \mu\text{M}$ ) vs Spm 培養 ( $1.30 \pm 0.01 \mu\text{M}$ )) ( $p < 0.001$ ) (図 4B 右)、DFMO とともに培養した細胞 ( $0.71 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ) に Spm を加えて培養 ( $0.96 \pm 0.04 \mu\text{M}$ ) すると SAM 濃度はむしろ上昇した ( $p = 0.003$ )。各種培養条件で、dc SAM 濃度の差は認めなかったものの、DFMO とともに培養した細胞の dcSAM/SAM 濃度比 ( $3.15 \pm 0.27 \%$ ) は上昇していた (vs 通常培養 ( $1.35 \pm 0.03 \%$ )) ( $p = 0.028$ ) (図 4D 右)。



N.S.: not significant

図4 AdoMet DC 活性、SAM 濃度、dcSAM 濃度、dcSAM/SAM 比

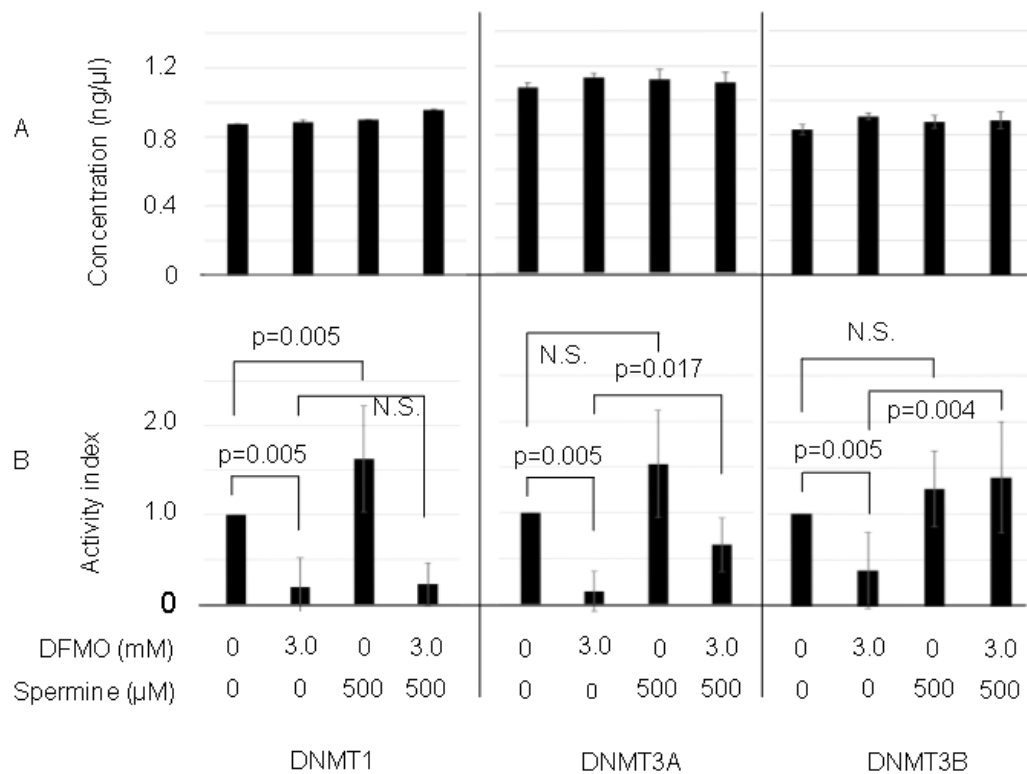
A: AdoMet DC活性 B: SAM濃度、C: dcSAM濃度、D: dcSAM/SAM比

グラフは、各培養条件における6サンプルの平均値と標準偏差で示している。

マン・ホイットニ(Mann-Whitney)検定を用いた。

## DNMT酵素量および酵素量あたりの活性

HMEpC を用いて DNMT 酵素量と DNMT 酵素活性の検討を十分に行うための十分な細胞数の確保が困難であったために、細胞数が十分に確保できる Jurkat 細胞で行った。Jurkat 細胞の DNMT 1、DNMT3A および DNMT3B の酵素量（タンパク質量）は、DFMO および Spm によって影響を受けなかった（図 5A）。しかし、酵素量が同一になるように調整して酵素活性を検討すると、DFMO とともに培養した細胞では DNMT1、3A、および 3B のすべての酵素活性が、通常培養細胞と比較すると著明に低下した（DNMT1 ( $0.19 \pm 0.33$ )、3A ( $0.14 \pm 0.22$ )、3B ( $0.39 \pm 0.41$ ) いずれも  $p=0.005$ )（図 5B）。通常条件で培養した細胞に Spm を加えると、DNMT1 が活性化された（ $1.63 \pm 0.60$ ）（ $p=0.005$ ）。DNMT3A ( $1.54 \pm 0.59$ ) および 3B ( $1.27 \pm 0.41$ ) も活性化される傾向にはあったが、有意差は認めなかった（DNMT 3A ( $p=0.069$ )、DNMT 3B ( $p=0.069$ ))（図 5B）。また、DFMO とともに培養した細胞（DNMT1 ( $0.19 \pm 0.33$ )、DNMT 3A ( $0.14 \pm 0.22$ )、DNMT 3B ( $0.39 \pm 0.41$ )）に Spm を加えて培養すると、DNMT1 の酵素活性（ $0.22 \pm 0.24$ ）は変化が見られなかったが、DNMT3A は活性化され（ $0.65 \pm 0.30$ ）（ $p=0.017$ ）、DNMT3B は著明に活性化された（ $1.40 \pm 0.60$ ）（ $p=0.004$ ）（図 5C）。



N.S. : not significant

図5 DNMT酵素量および酵素量あたりの活性 (Jurkat細胞)

グラフは、各培養条件における 6 サンプルの平均値と標準偏差で示している。

マン・ホイットニ(Mann-Whitney)検定を用いた。

### ゲノムワイドなメチル化検索

DFMOおよびSpmがゲノムワイドなメチル化に及ぼす影響は、Jurkat細胞を用いた。各条件で培養したJurkat細胞のゲノム上の864,605か所のCpG siteのメチル化状況を調べた。4つの培養条件間での大きな違いはなかったが、通常培養し

た細胞とDFMOとともに培養した細胞での比較では、散布図では高メチル化を示す部位が増加し、950個のプローブ（全体の0.11%）のメチル化状態が有意に変化していた（ $p < 0.01$ ）。通常培養した細胞とSpmとともに培養した細胞では、Spmを加えた細胞に高メチル化を示す分布が増加し、872個のプローブ（0.10%）が有意に変化した（ $p < 0.01$ ）。DFMOとともに培養した細胞とDFMOおよびSpmとともに培養した細胞を比較した場合には、高メチル化および低メチル化それぞれへ分布が変化し、7439個のプローブ（0.86%）が有意に変化した（ $p < 0.01$ ）。ControlとDFMOとSpm.を添加した細胞では38302個のプローブ（4.43%）が有意に変化した。

次に、Illumina社のCGデータベースの情報(36)に基づいて、遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態の変化を調べた。Methylation EPIC array上に存在するCpG部位を、カテゴリー遺伝子領域（TSS200, TSS1500, 5'UTR, 1st Exon, Body, 3'UTR）に分類した。各カテゴリーは以下のように表される。TSS200：転写開始部位(Transcription start site: TSS)から0～200塩基上流の領域, TSS1500：TSSから上流200～1500bp, 5'UTR (Untranslated region)：TSSと開始部位との間の領域, 1st Exon：第1エクソン内のCpG, Body：停止コドンまでのイントロン領域を含む第1エクソンの下流のCpG, 3'UTR：poly Aまでの停止コドンの下流に位置するCpG(34)。

今回のアッセイで遺伝子のプロモーター領域は TSS200, TSS1500, 5'UTR および第 1 エクソンとした。過去の文献で報告された老化や悪性疾患に関連する遺伝子のプロモーター領域として、c-MYC(MYC proto-oncogene), c-FOS (FBJ osteosarcoma oncogene)、ESR1( Estrogen receptor 1), ESR2(Estrogen receptor 2), IGF2(Insulin-like growth factor 2), MYOD1(Myogenic differentiation 1), SIRT1 (Sirtuin 1), VCAN (Versican), PAX6 (Paired box protein 6), DBC1 (Deleted in bladder cancer protein 1), CDH1 (Cadherin-1), HIC1 (HIC ZBTB Transcriptional Repressor 1)、また、近年ポリアミンとの関連が報告されている(37)Autophagy 関連の遺伝子である ATG(Autophagy) Family、以前にポリアミン濃度の変化によりプロモーター領域のメチル化状態の変化を報告している ITGAL (Itgal integrin alpha L) (28)、以上の遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態に及ぼす影響を検討した。しかし、 $\beta$  値の変化は概ね微小であった。そのなかで、c-MYC は DFMO と DFMO + Spm との間の比較で 1 つのプローブに有意な ( $p<0.01$ ) 変化がみられた。同様に、ESR2 も DFMO と DFMO + Spm との比較で 1 つのプローブについて有意な ( $p<0.01$ ) 変化がみられた。しかし、有意差がみられた CpG site 以外の遺伝子のプロモーター領域でのメチル化状態の変化は概ね-5~+10%程度であった。

次に、CpG siteの中で有意にメチル化状態が複数カ所変化しているプロモーター領域をControlとDFMO、ControlとSpm、DFMOとDFMO+Spm間で検索し



たところ、ACOT1 (Acyl-CoA thioesterase 1)、HEATR4 (HEAT Repeat Containing 4)、CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)、CDKN2B (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B)、CDKN2B-AS1 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B- 、DMRTA1 (Doublesex- And Mab-3-Related Transcription Factor A1)、KLHL9 (Kelch like family member 9)、MTAP (methylthioadenosine phosphorylase)が抽出された。

(図6)

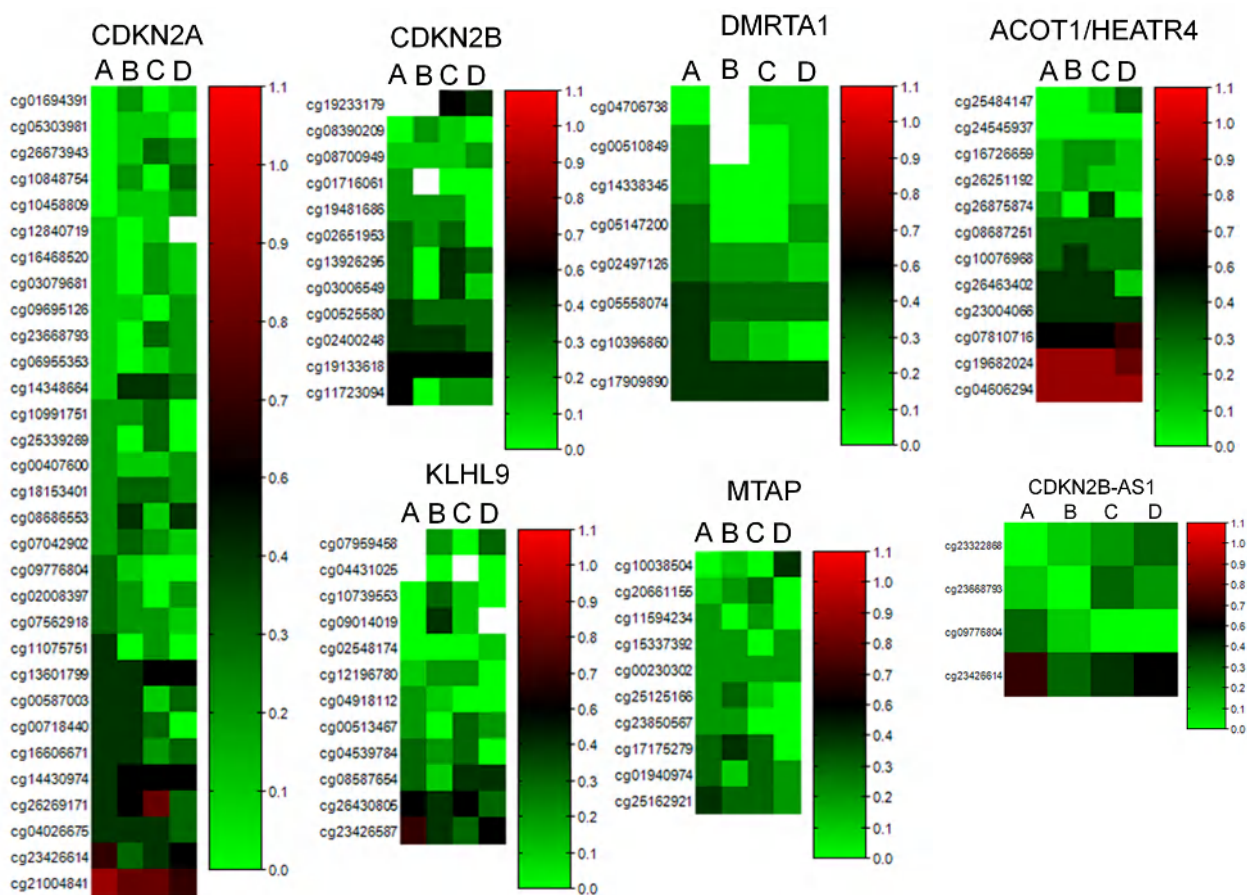


図 6 プロモーター領域の CpG site において有意な変化を認めた遺伝子のメチル化状態を示したヒートマップ

アルファベットの列(A,B,C,D) は培養条件を示し、A は Control (DFMO(-), Spm(-))、B は DFMO(+), Spm(-)、C は DFMO(-), Spm(+), D は DFMO(+), Spm(+)  
 の条件を示す。行は Illumina 社の独自の CG データベースから識別され付与された Target ID の中で各遺伝子のプロモーター領域に存在するものを示している。  
 Target ID は培養条件 A (Control) における  $\beta$  値を昇順で示している。

## 考察

悪性腫瘍細胞（ヒト急性T細胞性白血病細胞）であるJurkat細胞と正常細胞であるHMEpCではDFMOによるポリアミン濃度の抑制の程度が異なり、正常細胞ではポリアミン濃度を維持するホメオスターシスがより強固であることが推測された。しかし、両者において、Spmと培養した細胞では細胞内Spm濃度の上昇の有無にかかわらず、細胞内Spd濃度の変化が確認されており、細胞外からのスペルミン供給によって細胞内のポリアミン代謝が影響を受けたことが確認できた。さらに、SpmによってAdoMet DC活性が著明に低下しており、Spmの細胞内への取り込みによって、ポリアミン合成を抑制するためのネガティブフィードバック機構が作用したと考えられた。

DFMOやSpmがAdoMetDCの酵素活性やSAMおよびdc SAMの濃度に及ぼす変化はこれまでの報告と類似していた。ラットの前立腺細胞にDFMOを投与すると、AdoMetDC活性は7倍増加し、dcSAMは450倍増加したことが報告されている(38)。また、ラットのHepatoma Tissue Culture (HTC) CellsをDFMOとともに培養すると、AdoMet DC活性とdcSAM濃度の上昇とともにSAM濃度が低下することが報告されている(39)。さらに、Ehrlich ascites-carcinoma細胞をDFMOとともに培養するとAdoMet DCが活性化され、Spmによりその活性が抑制されることも報告されている(40)。DFMOとSpmがポリアミン合成に関わる物質や酵素活

性に及ぼす影響はこれまでの報告と同様の所見を得ることができた。

さらに今回、DFMOによるポリアミン合成阻害とSpmの細胞外からの供給によって生じるこれらのポリアミン代謝の変化による、DNMTの活性と遺伝子のプロモーターのメチル化状態におよぼす影響を明らかにすることができた

dcSAMはSAMを競合阻害するが(24)、結晶構造解析ではDNMT上にSAMの結合部位が存在し(41)、dcSAMが競合することによって活性化を抑制していることが推測される。通常、生体内におけるdcSAM濃度は、SAMの濃度の数パーセント程度であるが(42)、DFMOによってdcSAM濃度が著明に上昇することも報告されている(43)。今回の、Jurkat細胞内のdcSAM濃度はSAMの約1000分の1程度の濃度でしか検出できなかったが、DFMOによってdcSAM濃度は著明に上昇した。さらに、Spmと培養した細胞内dcSAM濃度は、かろうじて検出できる程度まで著明に低下した。Jurkat細胞ではDFMOとSpmによってdcSAMのダイナミックな濃度変化を確認でき、dcSAM濃度の変化とDNMT活性の変化には負の関係が認められた。しかし、HMEpCではdcSAMの濃度変化は顕著ではなく、dcSAM/SAM濃度比の変化とDNMT活性の変化の関係がより明確であった(24)。

ポリアミン合成の律速酵素であるOrnithine decarboxylase (ODC) を分解して、その活性を抑制するODC antizyme-1 (OAZ) 遺伝子の導入によってポリアミン合成を阻害すると、Human oral cancer cell lineのDNMT3Bのタンパク質発現レ

ベルの低下が認められたことが報告されている(44)。しかし、今回の検討では、ODCを抑制するとDNMTのタンパク量には影響を及ぼさず、測定したいずれのsubtypeでもDNMT活性が著明に抑制された。一方、Spmは検討したDNMTのタンパク量に影響を及ぼさずに、DNMT3Bを著明に活性化した。また、DNMT3Aも活性化させたが、DNMT1への影響はなかった。いったん付けられたゲノム上のメチル化模様は安定的に次世代の細胞に受け継がれるとされているが(45)、メチル化修飾は可逆的に変化する部位のあることも報告されている(46, 47, 48)。DNMTにはいくつかのサブタイプがあるが、DNMT1は主にDNA複製時のメチル化の維持に働き、DNMT3AおよびDNMT3Bは*de novo*メチル化において重要な役割を有していると考えられている(44)。加齢に伴いポリアミン合成酵素の律速酵素であるODC活性が低下し(49, 50, 51)、体内の濃度を反映する血液細胞内のSpm濃度も低下傾向を示し(15)、DNMTの活性も低下する(52, 53, 54)。DFMOでポリアミン合成を阻害することで、加齢に伴うこれらの変化と同じ変化を認めた。一方、高ポリアミン食を継続すると血液細胞内のSpm濃度が上昇する(30, 31)。今回の検討では、その生理的濃度変化の範囲内のSpm濃度の上昇によって遺伝子の*de novo*メチル化に関与するDNMT3Aおよび3B（とくに3B）が活性化されることがわかった。過去、DFMOおよびSpermine投与によるDNMTの活性をsubtype別に検討した報告はない。

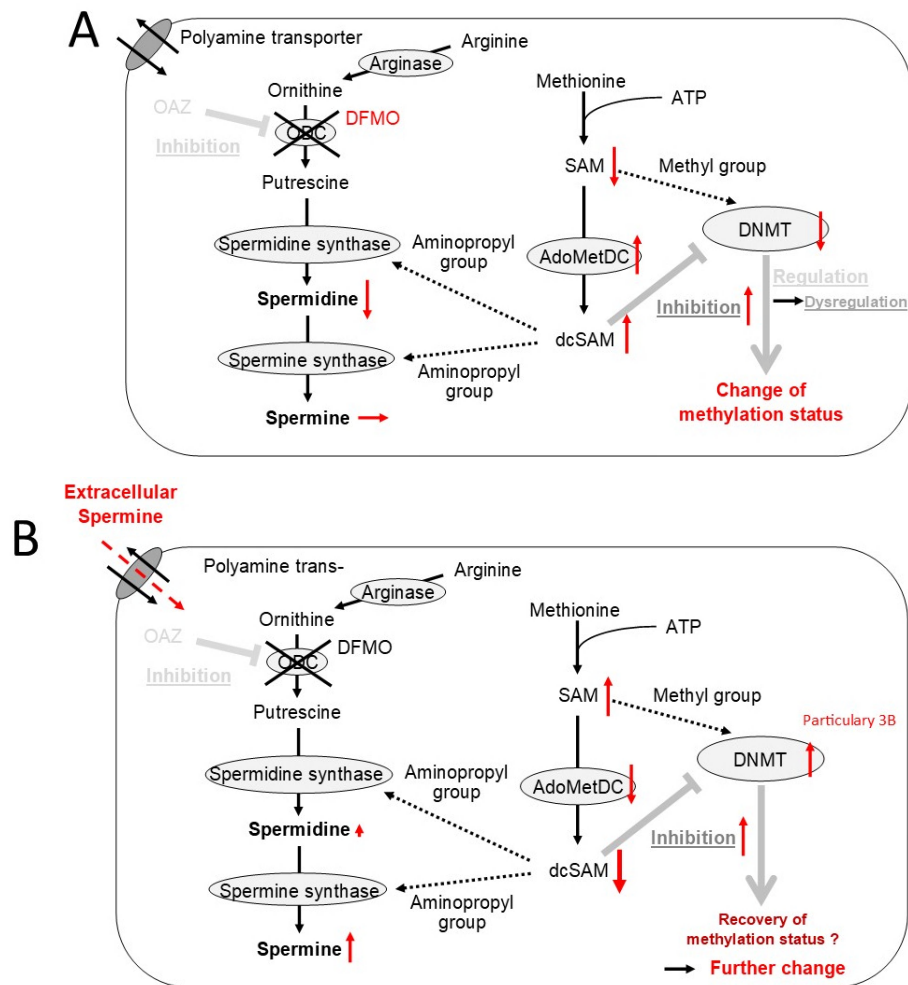


図7 ポリアミン濃度の変化による細胞内の物質や酵素活性およびDNMT活性に与える影響

(A)DFMOによるポリアミン産生の抑制による変化

(B)細胞外Spermine投与による変化

DNA上に存在するシトシンとグアニンの繰り返し配列であるCpG island

は、通常よりも多いCpGジヌクレオチドを含む高GC含量を有するDNAの領域

であるが、遺伝子プロモーターの約70%に密接に関連し、遺伝子発現の調節に大きくかかわっている(22)。高メチル化がCpG islandに生じると遺伝子発現の不活化を生じさせ、低メチル化によって遺伝子発現が活性化される。今回のプロモーター領域でのCpG siteのメチル化検索でポリアミン合成阻害およびSpm添加によってメチル化が有意に影響を受けた遺伝子として、MTAP、CDKN2A、CDKN2Bなどの癌抑制遺伝子や細胞の代謝に係る遺伝子などが拾い上げられた。しかし、近年報告されている老化や寿命との関連が指摘されているATGやITGALは拾い上げられなかった。我々の以前の検討でも、SpmによるITGALのメチル化の変化は最大でも10%程度にとどまっていたが、この程度のメチル化の変化でもITGALのタンパク質レベルでは明確な変化が認められた(28)。以上を考慮すると、ポリアミン代謝の変化が遺伝子プロモーターのメチル化と遺伝子発現へ及ぼす影響は、数多くの遺伝子に及んでいることを示唆する結果であった。

おわりに

本研究ではスペルミンの細胞内での濃度上昇によりDNMT3Bの活性化が起こり、また、DNAのメチル化状態が変化することを明らかにした。

今回抽出された癌抑制遺伝子や細胞の代謝に係る遺伝子についてBisulfite

sequenceによるプロモーター領域のメチル化状態のvalidation、および発現の解析を今後加えていきたい。

近年、Gene body methylationと呼ばれるプロモーター領域ではなくmRNAとして転写される領域のメチル化が遺伝子発現の活性化に関わり、加えて、このGene body methylationにDNMT3Bが関連するという報告がなされている(55)。また、Gene bodyのメチル化にはDNMT3Bが特定のリジン残基がメチル化したヒストンと結合して作用することも同文献で報告されている。

本研究の意義として、ポリアミンが活性化に特に関与するDNMTのサブタイプが3Bであることがわかり、ポリアミンと遺伝子メチル化の関連について、ヒストンタンパク質との関連や、本研究では以前より遺伝子発現に関連があるとされている遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を検索したが、Gene body領域のメチル化検索の必要性を見出すことができた。

ポリアミンのメチル化に関わる遺伝子は数多くの遺伝子に及んでいると推察されるが、今回の研究結果より新たな対象を加えてポリアミンの濃度変化がDNMT3Bの活性化に及ぼす機序の解明、およびポリアミンによりメチル化が影響をうける遺伝子とその発現の検討を深めたい。



## 謝辞

DFMOを供与いただいた株式会社アミンファーマ研究所代表取締役社長（千葉大学名誉教授）五十嵐一衛（igarashi kazuei）先生、AdoMetDC活性の指導と測定機器の使用に際してご指導いただいた東京慈恵会医科大学分子生物学の松藤千弥（matsufuji senya）教授と大城戸真喜子（okido makiko）先生に対して、深謝いたします。

この研究は文部科学省科学研究費助成事業、および本庄食と健康研究助成「食と健康プログラム」からの研究費で行いました。

This work was supported by JSPS KAKENHI (Grants-in-Aid for Scientific Research) (Grant Number 26500015) and Honjo Food and Health Research grant.

## Competing Interests

開示すべきCOIはありません。

None of the authors has a conflict of interest regarding the work in the manuscript.

## 文献

1. Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr Rev.* 55(11 Pt 1):383-9 1997
2. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med.* 348(26):2599-608 2003
3. Lasheras C, Fernandez S, Patterson AM. Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people. *Am J Clin Nutr.* 71(4):987-92 2000
4. Kouris-Blazos A, Gnardellis C, Wahlqvist ML, Trichopoulos D, Lukito W, Trichopoulou A. Are the advantages of the Mediterranean diet transferable to other populations? A cohort study in Melbourne, Australia. *Br J Nutr.* 82(1):57-61 1999
5. Soda K. Polyamine intake, dietary pattern, and cardiovascular disease. *Med Hypotheses.* 75(3):299-301 2010
6. Ozawa M, Ninomiya T, Ohara T, Doi Y, Uchida K, Shirota T, Yonemoto K, Kitazono T, Kiyohara Y. Dietary patterns and risk of dementia in an elderly Japanese population: the Hisayama Study. *Am J Clin Nutr.* 97(5):1076-82 2013
7. Toledo E, Salas-Salvado J, Donat-Vargas C, Buil-Cosiales P, Estruch R, Ros E, Corella D, Fito M, Hu FB, Aros F, Gomez-Gracia E, Romaguera D, Ortega-Calvo M, Serra-Majem L, Pinto X, Schroder H, Basora J, Sorli JV, Bullo M, Serra-Mir M, Martinez-Gonzalez MA. Mediterranean Diet and Invasive Breast Cancer Risk Among Women at High Cardiovascular Risk in the PREDIMED Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med.* 175(11):1752-60 2015
8. Nishimura K, Shiina R, Kashiwagi K, Igarashi K. Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *J Biochem.* 139(1):81-90 2006
9. Cipolla BG, Havouis R, Moulinoux JP. Polyamine contents in current foods: a basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients. *Amino Acids.* 33(2):203-12 2007
10. Nishibori N FS, Akatuki T:. Amounts of polyamines in foods in Japan 29 and intake by Japanese. *Food Chem.* 100(491-7 2006
11. Upp JR, Jr., Saydjari R, Townsend CM, Jr., Singh P, Barranco SC, Thompson JC. Polyamine levels and gastrin receptors in colon cancers. *Ann Surg.* 207(6):662-9 1988
12. Bardocz S, Duguid TJ, Brown DS, Grant G, Pusztai A, White A, Ralph A. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Br J Nutr.* 73(6):819-28 1995

13. Jung IL, Oh TJ, Kim IG. Abnormal growth of polyamine-deficient *Escherichia coli* mutant is partially caused by oxidative stress-induced damage. *Arch Biochem Biophys*. 418(2):125-32 2003
14. Chattopadhyay MK, Tabor CW, Tabor H. Polyamine deficiency leads to accumulation of reactive oxygen species in a *spe2Delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 23(10):751-61 2006
15. Soda K, Kano Y, Nakamura T, Kasono K, Kawakami M, Konishi F. Spermine, a natural polyamine, suppresses LFA-1 expression on human lymphocyte. *J Immunol*. 175(1):237-45 2005
16. Zhang MH, Caragine T, Wang HC, Cohen PS, Botchkina G, Soda K, Bianchi M, Ulrich P, Cerami A, Sherry B, Tracey KJ. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: A counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *Journal of Experimental Medicine*. 185(10):1759-68 1997
17. Williams JR, Casero RA, Dillehay LE. The effect of polyamine depletion on the cytotoxic response to PUVA, gamma rays and UVC in V79 cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 201(1):1-7 1994
18. Snyder RD, Sunkara PS. Effect of polyamine depletion on DNA damage and repair following UV irradiation of HeLa cells. *Photochem Photobiol*. 52(3):525-32 1990
19. Snyder RD, Schroeder KK. Radiosensitivity of polyamine-depleted HeLa cells and modulation by the aminothiol WR-1065. *Radiat Res*. 137(1):67-75 1994
20. Courdi A, Milano G, Bouclier M, Lalanne CM. Radiosensitization of human tumor cells by alpha-difluoromethylornithine. *Int J Cancer*. 38(1):103-7 1986
21. Semba RD, Ferrucci L, Bartali B, Urpi-Sarda M, Zamora-Ros R, Sun K, Cherubini A, Bandinelli S, Andres-Lacueva C. Resveratrol levels and all-cause mortality in older community-dwelling adults. *JAMA Intern Med*. 174(7):1077-84 2014
22. Meydani M, Lipman RD, Han SN, Wu D, Beharka A, Martin KR, Bronson R, Cao G, Smith D, Meydani SN. The effect of long-term dietary supplementation with antioxidants. *Ann NY Acad Sci*. 854(352-60 1998
23. Strong R, Miller RA, Astle CM, Baur JA, de Cabo R, Fernandez E, Guo W, Javors M, Kirkland JL, Nelson JF, Sinclair DA, Teter B, Williams D, Zaveri N, Nadon NL, Harrison DE. Evaluation of resveratrol, green tea extract, curcumin, oxaloacetic acid, and medium-chain triglyceride oil on life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 68(1):6-16 2013
24. Heby O, Persson L, Smith SS. Polyamines, DNA Methylation and Cell Differentiation. In: Zappia V. PAE, editor. *Progress in Polyamine Research Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 250: Springer, Boston, MA; 1988. p. 291-9.
25. Christman JK, Sheikhejad G, Dizik M, Abileah S, Wainfan E. Reversibility of changes

in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency. *Carcinogenesis*. 14(4):551-7 1993

26. Bhawe MR, Wilson MJ, Poirier LA. c-H-ras and c-K-ras gene hypomethylation in the livers and hepatomas of rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis*. 9(3):343-8 1988

27. Garcea R, Daino L, Pascale R, Simile MM, Puddu M, Ruggiu ME, Seddaiu MA, Satta G, Sequenza MJ, Feo F. Protooncogene methylation and expression in regenerating liver and preneoplastic liver nodules induced in the rat by diethylnitrosamine: effect of variations of S-adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine ratio. *Carcinogenesis*. 10(7):1183-92 1989

28. Kano Y, Soda K, Konishi F. Suppression of LFA-1 expression by spermine is associated with enhanced methylation of ITGAL, the LFA-1 promoter area. *PLoS One*. 8(2):13 2013

29. Soda K, Kano Y, Chiba F, Koizumi K, Miyaki Y. Increased polyamine intake inhibits age-associated alteration in global DNA methylation and 1,2-dimethylhydrazine-induced tumorigenesis. *PLoS One*. 8(5):2013

30. Soda K, Dobashi Y, Kano Y, Tsujinaka S, Konishi F. Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Exp Gerontol*. 44(11):727-32 2009

31. Soda K, Kano Y, Sakuragi M, Takao K, Lefor A, Konishi F. Long-term oral polyamine intake increases blood polyamine concentrations. *J Nutr Sci Vitaminol*. 55(4):361-6 2009

32. Tsujinaka S, Soda K, Kano Y, Konishi F. Spermine accelerates hypoxia-initiated cancer cell migration. *Int J Oncol*. 38(2):305-12 2011

33. Marce M, Brown DS, Capell T, Figueras X, Tiburcio AF. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 666(2):329-35 1995

34. Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics*. 8(3):389-99 2016

35. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone marrow transplantation*. 48(3):452-8 2013

36. Illumina I. CpG Loci Identification A guide to Illumina's method for unambiguous CpG loci identification and tracking for the GoldenGate® and Infinium® Assays for Methylation. 2010; Available from: [https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote\\_cpg\\_loci\\_identification.pdf](https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote_cpg_loci_identification.pdf).

37. Eisenberg T, Abdellatif M, Schroeder S, Primessnig U, Stekovic S, Pendl T, Harger A, Schipke J, Zimmermann A, Schmidt A, Tong M, Ruckenstein C, Dammbroek C, Gross AS, Herbst V, Magnes C, Trausinger G, Narath S, Meinitzer A, Hu Z, Kirsch A, Eller K, Carmona-Gutierrez D, Buttner S, Pietrocola F, Knittelfelder O, Schrepfer E, Rockenfeller P, Simonini C,

- Rahn A, Horsch M, Moreth K, Beckers J, Fuchs H, Gailus-Durner V, Neff F, Janik D, Rathkolb B, Rozman J, de Angelis MH, Moustafa T, Haemmerle G, Mayr M, Willeit P, von Frieling-Salewsky M, Pieske B, Scorrano L, Pieber T, Pechlaner R, Willeit J, Sigrist SJ, Linke WA, Muhlfeld C, Sadoshima J, Dengjel J, Kiechl S, Kroemer G, Sedej S, Madeo F. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat Med*. 22(12):1428-38 2016
38. Danzin C, Claverie N, Wagner J, Grove J, Koch-Weser J. Effect on prostatic growth of 2-difluoromethylornithine, an effective inhibitor of ornithine decarboxylase. *Biochem J*. 202(1):175-81 1982
39. Mamont PS, Danzin C, Wagner J, Siat M, Joder-Ohlenbusch AM, Claverie N. Accumulation of decarboxylated S-adenosyl-L-methionine in mammalian cells as a consequence of the inhibition of putrescine biosynthesis. *Eur J Biochem*. 123(3):499-504 1982
40. Alhonen-Hongisto L. Regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase by polyamines in Ehrlich ascites-carcinoma cells grown in culture. *Biochem J*. 190(3):747-54 1980
41. Chikan NA, Bhavaniprasad V, Anbarasu K, Shabir N, Patel TN. From natural products to drugs for epimutation computer-aided drug design. *Appl Biochem Biotechnol*. 170(1):164-75 2013
42. Hibasami H, Hoffman JL, Pegg AE. Decarboxylated S-adenosylmethionine in mammalian cells. *J Biol Chem*. 255(14):6675-8 1980
43. Seiler N, Knodgen B. Determination of Polyamines and Related-Compounds by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography - Improved Separation Systems. *J Chromatogr*. 339(1):45-57 1985
44. Yamamoto D, Shima K, Matsuo K, Nishioka T, Chen CY, Hu G, Sasaki A, Tsuji T. Ornithine Decarboxylase Antizyme Induces Hypomethylation of Genome DNA and Histone H3 Lysine 9 Dimethylation (H3K9me2) in Human Oral Cancer Cell Line. *PLoS One*. 5(9):0012554 2010
45. Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics*. 2(5):657-69 2010
46. Yamamoto D, Shima K, Matsuo K, Nishioka T, Chen CY, Hu GF, Sasaki A, Tsuji T. Ornithine decarboxylase antizyme induces hypomethylation of genome DNA and histone H3 lysine 9 dimethylation (H3K9me2) in human oral cancer cell line. *PLoS One*. 5(9):0012554 2010
47. Kangaspeska S, Stride B, Metivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, Benes V, Gannon F, Reid G. Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature*. 452(7183):112-5 2008
48. Kim SH, Kang YK, Koo DB, Kang MJ, Moon SJ, Lee KK, Han YM. Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun*. 324(1):58-63 2004

49. Yoshinaga K, Ishizuka J, Evers BM, Townsend CM, Jr., Thompson JC. Age-related changes in polyamine biosynthesis after fasting and refeeding. *Exp Gerontol.* 28(6):565-72 1993
50. Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. Polyamines in aging and disease. *Aging.* 3(8):716-32 2011
51. Beyer HS, Ellefson M, Sherman R, Zieve L. Aging alters ornithine decarboxylase and decreases polyamines in regenerating rat liver but putrescine replacement has no effect. *J Lab Clin Med.* 119(1):38-47 1992
52. Romanenko EB, Demidenko ZN, Vanyushin BF. RNA-polymerase, DNA-polymerase, DNA-methyltransferase and sphingomyelinase activities in liver nuclei of rats of different Age. *Biochemistry.* 63(2):159-63 1998
53. Lopatina N, Haskell JF, Andrews LG, Poole JC, Saldanha S, Tollefsbol T. Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J Cell Biochem.* 84(2):324-34 2002
54. Oliveira AM, Hemstedt TJ, Bading H. Rescue of aging-associated decline in Dnmt3a2 expression restores cognitive abilities. *Nat Neurosci.* 15(8):1111-3 2012
55. Baubec T, Colombo DF, Wirbelauer C, Schmidt J, Burger L, Krebs AR, Akalin A, Schubeler D. Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation. *Nature.* 520(7546):243-7 2015