

氏 名	福 井 太 郎
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 551 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	細胞内スpermin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 審 査 委 員	(委員長) 教 授 黒 尾 誠 (委 員) 教 授 浜 本 敏 郎 教 授 石 橋 俊

論文内容の要旨

1 研究目的

第一級アミノ基が複数個結合した直鎖脂肪族炭化水素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様々な細胞機能に必要な不可欠な物質であるが、細胞外からも供給される。代表的なポリアミンとして、アミノ基がそれぞれ 3 つ結合した Spermidine(Spd) と 4 つ結合した Spermine(Spm)がある。遺伝子のメチル化とポリアミン代謝には密接な関係があることが知られている。遺伝子のメチル化は転写の制御、遺伝子発現の調整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る。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。本研究ではポリアミンの合成能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関わる物質濃度や酵素活性に及ぼす影響を検討し、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及ぼす影響を検討することを目的とした。

2 研究方法

Jurkat 細胞とヒト乳腺上皮細胞を実験に用いた。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 Ornithine Decarboxylase (ODC)の活性低下を再現するため ODC を阻害する D,L-alpha-difluoromethylornithine hydrochloride (DFMO)を用いた。DFMO と Spm を用いて、①通常の培養、②DFMO を混じた条件、③Spm を混じた条件、④DFMO と Spm を混じた条件の以上 4 つの条件下で 72 時間培養を行い、細胞を回収し実験に用いた。

各培養条件での細胞内ポリアミン（Spermine）濃度を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した。

遺伝子にメチル基を供与する S-adenosyl-L-methionine(SAM)は、Adenosylmethionine decarboxylase (AdoMet DC)により decarboxylated S-adenosylmethionine (dcSAM) へ変換される。dcSAM はポリアミンが合成される際に Aminopropyl 基の供与源となる。遺伝子にメチル基が付与される反応は DNA メチル基転移酵素 (DNMT) により起こる。

本研究では上記 4 つの培養条件での SAM, dcSAM の濃度を HPLC で測定した。また、dcSAM/SAM ratio と DNMT の活性に関する報告があるため併せて計算した。AdoMetDC の活性について RI で

測定した。DNMTには複数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果たすなど働きが異なり、サブタイプ別のDNMTの定量および活性をELISAにより評価した。

各条件で培養したJurkat細胞より抽出したDNAを使用してMethylation EPIC BeadChip (Illumina) microarrayによりゲノム上に約86万カ所設定されたCpG siteのメチル化状態をメチル化率(β 値)で評価し、ゲノム全体的なメチル化状態の変化および加齢や生活習慣病、発がんに関わる遺伝子のプロモーター領域についてメチル化状態の変化を調べた。また、培養条件間での変化が大きい遺伝子を検索した。

3 研究成果

細胞内ポリアミン濃度について、Jurkat細胞ではDFMO投与によりSpd濃度は検出感度以下まで減少したが、Spm濃度はControlと大きな変化はなかった。Spmを加えるとDFMO投与に関わらずSpm濃度は有意に上昇し、Spd濃度は有意に減少した。一方、HMEpCはDFMO投与によりSpdとSpmの濃度は有意に低下した。Spmを加えるとDFMOに関わらずSpd濃度は著明に減少したが、Spm濃度の変化は大きく変化しなかった。

AdoMet DC 活性、SAM・dcSAM 定量、dcSAM/SAM ratio について、Jurkat 細胞では AdoMet DC 活性は DFMO の投与により通常培養に比べ著明に上昇し、Spm の投与により DFMO の有無に関わらず減少した。dcSAM の濃度は DFMO により有意に上昇し、Spm の投与により DFMO の有無に関わらず著明に減少した。SAM 濃度は DFMO により減少したが、Spm により DFMO の有無に関わらず通常培養と変化はなかった。dcSAM/SAM ratio は DFMO 投与により上昇し、Spm により減少した。

HMEpC では、Jurkat 細胞と異なり AdoMetDC 活性については DFMO 投与による上昇がみられなかったが、Spm による強い抑制があった。dcSAM の定量では DFMO や Spm による抑制はいずれの条件でも見られず、SAM の定量では DFMO による低下が Spm の有無に関わらず認められた。dcSAM/SAM ratio は DFMO により Spm の有無に関わらず上昇した。

DNMT に関する評価は十分な細胞数の確保できた Jurkat 細胞で行った。DNMT 1、3A および 3B 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。しかし、酵素量が同一になるように調整し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 の酵素活性が、通常培養細胞と比較すると著明に低下した (いずれも $p=0.005$)。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、DNMT3A と 3B は活性化される傾向にあった。また、DFMO とともに培養した細胞に Spm を加えると、DNMT1 の酵素活性は変化が見られなかったが、DNMT3A は活性化され、DNMT3B は著明に活性化された。

メチル化アレイで DFMO と Spm がゲノムワイドなメチル化に及ぼす影響について評価した。Illumina 社の CG データベースに基づいた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。過去に Aging や悪性疾患に関連する遺伝子や Autophagy に関わるもの、また、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 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が、 β 値の変化は概ね数%程度と微小であった。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、HEATR4、

CDKN2A、CDKN2B、CDKN2B-AS1、DMRTA1、KLHL9、MTAP といった癌抑制遺伝子や細胞の代謝に関わる遺伝子が抽出された。

4 考察

HPLCでの細胞内ポリアミン濃度測定結果より培養細胞である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。SpmによりAdoMet DC活性が著明に低下し、Spmの細胞内への取り込みに伴う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過去報告と同様であった。

SpmによるDNMT3Bの活性化について、過去にポリアミン合成阻害でDNMT3Bのタンパク質発現レベルの低下が認められた報告があるが、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はなく、各DNMT活性が著明に抑制された。一方、SpmはDNMTのタンパク質量に影響を及ぼさず、DNMT3Bの活性を著明に上昇させた。

一度付けられたゲノム上のメチル化の様子は安定的に次世代の細胞に受け継がれるとされるが、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。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、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、DNMTの活性も低下するが、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。

CpG island は遺伝子発現の調節に大きく関わるが、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、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遺伝子は有意な変化に乏しかった。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。そのため、わずかなメチル化の変化でもタンパク質レベルは明確な変化が認められることを考慮すると、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ぶことが示唆された。

5 結論

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。今後、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を検討したい。

論文審査の結果の要旨

本研究は、地中海食や和食等に多く含まれるポリアミンが健康長寿に寄与するメカニズムを理解することを長期目標に設定し、その目標達成に向けた短期目標として、ポリアミンによって誘導される遺伝子発現変化のメカニズムの解明を目指している。

具体的には、二種類の培養細胞（Jurkat 細胞とヒト正常乳腺上皮細胞）を用いて、内因性のポリアミン合成を抑制したり、培地にポリアミンを添加して外因性にポリアミンを補充したりすることで、1) 細胞内のポリアミン代謝産物（スペルミジンとスペルミン）の量、2) ポリアミン合成に必要な基質である dcSAM の合成酵素（AdoMetDC）の活性、3) AdoMetDC の基質である SAM の量、を解析した。また、Jurkat 細胞を用いて、4) SAM を基質とする DNA メチル化酵素（DNMT1, 3A, 3B）の量と活性、5) ゲノムワイドの DNA メチル化の変化、を解析した。

その結果、以下の3点が新たに明らかとなった。1) 培地にポリアミン合成の律速酵素である ODC の阻害剤（DFMO）やスペルミンを添加すると、細胞内のポリアミン量や AdoMetDC 活性は増減するが、Jurkat 細胞とヒト正常乳腺上皮細胞では異なる反応を示す。2) Jurkat 細胞においては、ポリアミン合成を阻害すると、DNMT の基質である SAM を競合阻害する dcSAM が増加し、特に DNMT3A と 3B の活性が低下する。逆にポリアミンを添加すると、dcSAM が低下して DNMT3A と 3B の活性が上昇する。3) 細胞内のポリアミンの量を変化させると、多数の遺伝子の CpG island における DNA メチル化が変化し、その中には老化や悪性腫瘍で変化する遺伝子がいくつか含まれている。これらの知見は、ポリアミンが健康長寿に寄与するメカニズムの一端に関わる可能性があり、今後は個体レベルの研究へと発展することが期待される。

提出された論文は、申請者のオリジナルな論文であり、学位に十分値する内容であると評価する。ただし、軽微な修正として、1) 本研究の長期目標を追記すること、2) 図の説明をもう少し詳しくすること、の2点を指示した。

最終試験の結果の要旨

提出された学位論文は、研究の背景と本研究における新規の発見が要領良くまとめられており、実験のデザインやデータの解析も適切に行われている。本研究は英語原著論文として投稿中で未だ受理されていないが、その質の高さから考えて、適切な Journal に publish されるのは時間の問題であると考えられる。プレゼンテーションも良く準備されており、審査委員の質問にも的確に回答した。以上、福井氏は学位に値する学識を備えているものと判断され、審査委員の全員一致で合格と判定した。