

学位論文題名

Regulation of Chk2 gene expression in lymphoid malignancies :
involvement of epigenetic mechanisms
in Hodgkin's lymphoma cell lines

(リンパ系悪性腫瘍における Chk 2 遺伝子の調節機構：
ホジキンリンパ腫細胞株におけるエピジェネティック機構の関与)

学位論文内容の要旨

背景：Chk2 は種を超えて構造が広く保存された核内セリン・スレオニンキナーゼで、DNA 傷害下において活性化し、ゲノムの恒常性維持機構の一端を担う分子である。一旦、放射線、抗がん剤等により DNA 損傷が生じると、Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) が速やかにリン酸化され、Chk2 をリン酸化することにより Chk2 は活性化される。活性化された Chk2 はその下流分子である p53、E2F1、PML、cdc25C、Brca1 等を制御し、その結果として細胞周期停止、又はアポトーシスが誘導され、ゲノムの恒常性が維持される。Chk2^{-/-}細胞では DNA 傷害（放射線）に対するアポトーシスの誘導が低下していることが報告されている。また、大多数に p53 の変異を認め家族性に癌を多発する Li-fraumeni syndrome において、p53 に変異のない患者群で germ line に Chk2 遺伝子変異が見つかったことから、p53 同様癌抑制遺伝子の一つとも考えられている。

こうした癌抑制遺伝子の破綻が発癌や病勢の進行に関与すると考えられており、様々な癌細胞において、遺伝子変異や発現異常が報告されてきた。近年、癌抑制遺伝子のエピジェネティックな発現抑制 "gene silencing" が発癌または病勢進行の機序として注目されてきており、遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化またヒストン蛋白の脱アセチル化、メチル化といった修飾によりクロマチン構造が変化し、転写抑制がなされることが知られている。

今回、DNA 傷害下におけるゲノムの恒常性維持機構において重要な役割を果たす Chk2 分子について、リンパ系悪性腫瘍の細胞株を用い、その発現動態、制御機構について検討してみた。

結果

1. 9 種類のリンパ系悪性腫瘍の細胞株 (Hodgkin's disease(HD)3 系統、Follicular lymphoma 2 系統、T cell leukemia 1 系統、B cell lymphoma 2 系統、Burkitt's lymphoma 1 系統)をそれぞれ Western blot、Northern blot で蛋白、mRNA の発現

を比較してみたところ、全ての HD 細胞株でのみ Chk2 の発現が低下していた。

2. Chk2 遺伝子のゲノム解析 (シークエンス) を 2 系統の HD 細胞株について行ったところ、特に Chk2 遺伝子の変異は認められなかった。このことから Chk2 の発現低下にエピジェネティックな制御の関与が考えられた。
3. エピジェネティック制御として、まず Chk2 プロモーター領域の DNA の過剰なメチル化について検討した。HD 細胞を DNA の脱メチル化剤 (5-aza-deoxycytidine) で処理したところ、Chk2 の発現が増強された。このことから Chk2 発現抑制の原因として、DNA の過剰なメチル化の関与が考えられた。
4. 次にヒストン蛋白の脱アセチル化について検討するため、ヒストン脱アセチル化阻害薬 (Trichostatin A, Sodium butylate) で HD 細胞を処理したところ、Chk2 の発現が増強された。このことから、Chk2 発現抑制の原因として、ヒストン蛋白の脱アセチル化も関与することが示唆された。
5. Chk2 プロモーター領域のヒストン脱アセチル化について、クロマチン免疫沈降法 (Chip assay) を用いて検討したところ、Chk2 が発現しているコントロール細胞と比較し HD 細胞でアセチル化は低下していた。更にヒストン脱アセチル化阻害剤処理により、Chk2 プロモーター領域のアセチル化は回復することが認められた。また、ヒストンアセチル化と同様に "gene silencing" の原因となるヒストン H3K9 のメチル化についても、Chip assay を用いて検討したところ、HD 細胞では著明にメチル化されていた。
6. 最後に、ヒストン脱アセチル化阻害剤 (Sodium butylate) による Chk2 発現の上昇が、HD 細胞における放射線感受性に与える影響について検討した。Sodium butylate 処理した HD 細胞では無処理の細胞よりも、放射線によるアポトーシスが強く誘導された。

結論

以上の結果より、今回用いた HD 細胞株において Chk2 の発現はエピジェネティック機構により抑制されており、Sodium butylate 等の薬剤投与によりその抑制機構を解除すると、HD 細胞における放射線感受性が上昇した。このことから、エピジェネティック機構に対する薬剤と従来の放射線や化学療法を組み合わせることにより、抗腫瘍効果を高め、より効果的な治療法になる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

Regulation of Chk2 gene expression in lymphoid malignancies : involvement of epigenetic mechanisms in Hodgkin's lymphoma cell lines

(リンパ系悪性腫瘍における Chk 2 遺伝子の調節機構：
ホジキンリンパ腫細胞株におけるエピジェネティック機構の関与)

Chk2は主に放射線によるDNA損傷時に活性化される核内セリン、スレオニンキナーゼで、アポトーシス、細胞周期停止に関与し、癌抑制因子の一つとして考えられている。近年、発癌や病期進行の要因としてエピジェネティクス機構による癌抑制因子の発現制御が注目されている。申請者は本研究において、リンパ系悪性腫瘍におけるChk2遺伝子の発現動態とエピジェネティクス機構の関与について検討した。

9種類のリンパ系悪性腫瘍細胞株を用い、Northern blotによりChk2 mRNAの発現を比較検討したところHodgkin lymphoma (HL) 由来細胞株(3/3種)で著明な発現低下が認められた。これらの細胞株ではChk2遺伝子異常がない事をゲノムシーケンスで確認した。申請者はエピジェネティクス機構による転写抑制の機序としてDNAのメチル化、ヒストン脱アセチル化について、それぞれDNAメチル化阻害剤5-aza-deoxycytidine(5aza)とHDAC inhibitorであるsodium butyrate (SB)を用い検討したところ、HL由来細胞においてChk2 mRNAの発現上昇が認められた。またChk2遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾の関与を検討するためにアセチル化ヒストンH3、メチル化ヒストンH3K9の抗体を用い、クロマチン免疫沈降法を行った。HL由来細胞L428に対しChk2遺伝子発現の高い細胞株をコントロールとして使用した。L428ではコントロールと比較しヒストンH3は脱アセチル化されており、5aza、SBによりアセチル化の亢進が認められた。また、L428ではコントロールと比較しヒストンH3K9は強くメチル化されており、5aza処理により低下することが認められた。以上の結果から、HL由来細胞株ではDNAのメチル化とヒストン脱アセチル化がChk2 mRNAの発現低下に関与し、Chk2プロモーター領域のヒストンH3の脱アセチル化とH3K9のメチル化の関与が示唆された。更にSBによるChk2 mRNAの発現上昇とHL由来細胞での放射線によるアポトーシス誘導への影響をフローサイトメトリーにより検討した。その結果、SB処

理によりL428細胞の放射線後のアポトーシスの亢進が認められた。本研究ではHLでのChk2遺伝子の発現異常とその機序としてエピジェネティクス機構の関与を明らかにし、HLの病態解明と治療戦略に対し新たな知見が得られ臨床的にも重要であると考えられた。

公開発表にあたって副査秋田弘俊教授からChk2下流分子であるp53のHL由来細胞株での性状について、他の機構によるChk2発現制御の可能性、エピジェネティクス機構に対する薬剤の治療応用への可能性について質問があった。各々の質問に対し申請者は、HL由来細胞でp53 mRNA、蛋白が発現していること、悪性リンパ腫でChk2が蛋白レベルで低下している報告があることからエピジェネティクス以外の機構による制御の可能性があり、SBにより放射線照射の感受性増加を認めることから従来の治療法と組み合わせることにより更なる抗腫瘍効果が得られる可能性について回答した。次いで主査島山鎮次教授より、HL由来細胞株のChk2遺伝子変異、染色体異常についての検討とエピジェネティクス制御に関与するChk2遺伝子プロモーター領域の同定について質問があった。各々の質問に対し申請者は、Chk2の転写開始部よりゲノムシーケンスを行い遺伝子異常が認められなかったこと、HL由来細胞株では数的異常を含め複雑な染色体異常を有していること、Chk2遺伝子プロモーター領域と転写因子結合部位が同定されている旨を回答した。最後に、副査今村雅寛教授より、これまでに報告された悪性リンパ腫でのChk2の発現異常と比較し本研究で得られた新たな知見について、エピジェネティクス機構によるChk2発現制御と悪性リンパ腫以外の癌種との関連性、Chk2と相似的な働きを有するChk1に対する検討、本研究が分子標的療法のターゲットとなる可能性について質問があった。各々の質問に対し申請者は、本研究でHL由来細胞におけるChk2 mRNAの転写制御機構が初めて明らかになったこと、肺癌や腫瘍でもChk2発現制御にエピジェネティクス機構の関与が示唆されていること、本研究ではアポトーシスの誘導を目的としていたためChk1については検討していないこと、今後臨床の場において個々の患者検体のChk2の発現を検討し分子標的療法として有用となる可能性について回答した。

本研究は悪性リンパ腫細胞株において癌抑制因子であるChk2遺伝子の発現制御を明らかにした点に意義を有し、今後分子標的療法のターゲットとなる可能性が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院博士課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。