

2021 年度臨床研究推進研究費報告書

提出年月日: 2023 年 2 月 7 日

代表者	氏名	安井 博宣	所属	放射線学教室		
	内線	5236	e-mail	yassan@vetmed.hokudai.ac.jp		
研究課題	臨床検体から樹立したイヌ腫瘍細胞における ストレス誘導性上皮間葉転換のエピジェネティック解析					
研究チーム 参加者	氏名	所属		役割		
	安井博宣	放射線学教室		研究統括、細胞生物実験		
	山崎淳平	附属動物病院		エピジェネティック解析、分子生物学 的実験		
	木之下怜平	附属動物病院		疾患診断、サンプル収集および解析		
研究期間	2021 年 7 月 ~ 2022 年 3 月					
研究目的と 成果の概要 (400 字以内)	腫瘍の悪性化や治療抵抗性に関わる上皮間葉転換(EMT)について、伴侶動物においては依然として不明な点が多く、効果的な治療法の開発に至っていない。本研究では、DNA メチル化などのエピジェネティックな変化に着目し、昨年度、樹立したイヌ腫瘍細胞を用いて、広範囲に渡る DNA メチル化ゲノムワイド解析により、EMT におけるエピジェネティック異常の機能的関連性を探索することとした。研究期間内に、樹立した 2 つの細胞株について、放射線照射前後の細胞から DNA を抽出し、DNA メチル化の網羅的解析を行った。その結果、照射群において 285 の遺伝子で高メチル化が、243 の遺伝子で DNA 脱メチル化が確認され、そのうち幾つかは EMT との関連が報告されているものであった。加えて DNA メチル化阻害剤ボリノスタットの効果についても検討したところ、X 線で上昇した細胞遊走能の低下が示され、メチル化修飾に影響することで転移能獲得など悪性化を抑制できる可能性が示唆された。					

研究方法、結果、考察、成果の公表（上記書式、図表を含めて 3 ページ以内に纏めて下さい）

【方法】

本学動物医療センターで悪性黒色腫と診断された臨床検体からイヌ悪性黒色腫細胞株を二種類樹立し(CaMela-4 および CaMela-6)、X 線照射を行い EMT マーカーの発現と細胞遊走能を評価した。また、照射前後の細胞から DNA を抽出し RRBS(Reduced Representation Bisulfite Sequencing)による DNA メチル化の網羅的解析を行った。

【結果】

CaMela-4 および CaMela-6 に 5 Gy あるいは 10 Gy の X 線照射を行い、Migration assay による細胞遊走能の評価を行ったところ、X 線照射群において細胞遊走能の上昇が示された。また、ウェスタンブロッティング法による間葉系マーカーであるビメンチン(Vimentin)の発現評価を行ったところ、X 線照射群においてビメンチンの発現上昇が示された。DNA メチル化解析の結果、照射群において 285 の遺伝子で高メチル化が、243 の遺伝子で DNA 脱メチル化が確認され、そのうち幾つかは EMT との関連が報告されているものであった。

続いて、イヌ悪性黒色腫における X 線照射により誘導される表現型転換への新規アプローチを開拓する目的でボリノスタット(Vorinostat)による表現型転換への影響を評価した。ボリノスタットはヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(HDACi)に分類されるが、DNA メチル基転移酵素 1(DNMT1)の発現にも抑制作用を示すことが報告されている。ボリノスタット処理群において X 線で上昇した細胞遊

走能の低下が示された。RT-qPCR による DNA メチル基転移酵素群である DNMT1 および DNMT3A の発現を評価したところ、いずれもポリノスタット処理群で発現が減少していた。

【考察】

以上の結果から、イヌ悪性黒色腫においても X 線による表現型転換が誘導され、また、そのメカニズムには DNA メチル化が関与している可能性が示唆された。加えて、X 線照射で起こるイヌ悪性黒色腫の表現型転換には DNA メチル化といったエピジェネティックな遺伝子調節が関与していること、またポリノスタットがメチル化修飾に影響することでがん細胞の転移能獲得など悪性を抑制できる新規治療薬として作用を持つ可能性が示唆された。

今後の方針としては、EMT に特異的なエピジェネティック変化を標的とした遺伝子介入を行うことで新規治療法に繋げることや、DNA メチル化阻害剤と既存療法の併用による治療効率化への展開を目指す。

【成果の公表（代表的なもの）】

- ・論文発表
なし
- ・学会発表
なし