

エピジェネティックス解析法の開発, 診断（と治療？）への応用

藤原 浩

新潟大学教育研究院医歯学系皮膚科学分野

Epigenetics, Its Development for the Diagnostic Analyses and for the Treatment

Hiroshi FUJIWARA, MD, PhD

*Department of Dermatology
Niigata University School of Medicine*

Abstract

'Epigenetics' is an old school of biology; even older than 'genetics'. In this two decades epigenetics has become popular along with the development of analysis technologies. Today epigenetical gene regulation is classified in three, namely, DNA methylation, histone acetylation, and miRNA.

The author developed non-isotopic cytosine extension assay to measure whole genome methylation. Through bisulfite PCR and sequence, promoter methylation of CDH1 and several genes were demonstrated in skin cancers. The author developed methylation detection-in situ hybridization to visualize DNA methylation in situ. Combined with mRNA in situ hybridization and protein immunodetection, DNA methylation-mRNA/protein suppression axis was clearly demonstrated.

Then pharmacological treatment on primary culture of skin tumor was successfully carried out, and methylation-suppressed gene was re-expressed in situ.

Epigenetics can be applied for clinical diagnostics any time; for the therapeutic use of epigenetics more breakthrough is warranted.

Key words: DNA methylation, histone acetylation

生物学の一分野としての「エピジェネティックス」の歴史は古い。ワトソン・クリックによるDNA二重らせん構造理論（ジェネティックスの時代の始まり）よりも古く、1950年代までは、器官形成のメカニズムを研究する分野として発展していた。50年あまり前にセントラルドグマの中心

としてのDNAが発見されジェネティックスの時代が始まると、ジェネティックスでないもの、ゲノムの変化を伴わずに遺伝子発現を制御するメカニズムとして、日陰の存在となった。1990年代から、研究手法の開発が進み、手軽に研究成果が出るようになった結果、研究手段にエピジェネティ

ックスを用いた論文は急速に増加している。ここでターゲットにされたのは、まずDNAメチル化、次にヒストン蛋白のアセチル化、メチル化であり、さらにこの数年間はmiRNAが加わってきた。

筆者がエピジェネティックスに関わることになった最初の実験は、androgen receptor gene polymorphismを用いた、腫瘍のクローナリティーの検索である(HUMARA assay)。androgen receptor geneはX染色体上にあり、Lyonの仮説によると、女性はX染色体を必要量より1本余分に持つため、この余分なX染色体(に乗っているandrogen receptor gene)は不活化されている。これを現在の解釈に置き換えると、胎生初期にX染色体上のXist geneが転写されると、そのX染色体上の遺伝子全部がメチル化され、発現が抑制されている。つまり、1個の細胞の中では、父由来(または母由来)のX染色体全体がメチル化状態、もう1本のX染色体は非メチル化状態であり、それが父方、母方のどちらになるかは、ランダムとされている。androgen receptor geneのpolymorphismを用いることにより、90%以上の女性で、父由来と母由来のandrogen receptor geneを見分けることができる。この遺伝子のメチル化状態が、父方ないし母方に(五分五分でなく)7:3-9:1に偏っているとき、その腫瘍はクローナル増殖をしていると判断される。

当初、良性悪性の区別(polyclonal vs monoclonal)のためHUMARA assayを行ったのであるが、まずコントロールとして行った、良性腫瘍(先天性および後天性色素性母斑)で1割、正常皮膚でも1割、特に60歳以上に限れば3割がモノクローナルと判断されてしまう、つまりfalse positiveとなることが判った。このような現象が起きる原因として、人間の体表皮膚では父方X染色体、母方X染色体それぞれが不活化されている場所が幅5mmから3cmくらいの縞状に分布している、つまり完全にランダムなわけではないためとされている。(未だにこの方法で良性腫瘍のクローナリティーを証明している論文も存在している。)

DNAメチル化の解析法は、ゲノム全体のメチル化を定量的に調べる方法と、個々の遺伝子のメチル化を調べる方法とに大別できる。まず、ゲノム全体のメチル化状態を調べる方法であるが、放射性同位元素でラベルしたCH₃の取り込み量の定量、HPLCによる解析、メチル化感受性制限酵素による切断と放射性同位元素でラベルしたCH₃の取り込みを組み合わせたcytosine extension assayがある。いずれもμg単位のDNAを必要とし、小さい組織の解析には用いることができない。筆者は、上記のものより感度を3けた向上させたnon-isotopic cytosine extension assay(NICEA)を開発した。NICEAを用いて解析したところ、メラノサイト系良性/悪性腫瘍、後天性色素性母斑と悪性黒色腫では、ゲノム全体のメチル化に違いがないことがわかった。また、全身性エリテマトーデスでは、皮膚特異的エリテマトーデスよりも末梢血リンパ球ゲノムのメチル化が強いことが分かった。

DNAのメチル化の候補遺伝子を見つける方法としては、まず複数の制限酵素を使い、DNA二次元電気泳動を行う方法、arbitrary primed PCR, ligase chain reactionによる方法がある。これら3つの方法はいずれも制限酵素の認識配列に頼っており、実際にはこれらの方法では見つけられないDNAメチル化部位が多い。また、抗メチル化シトシン抗体を用いて免疫沈降を行い、シークエンスを行う、またはマイクロアレイを使用する方法もある。この方法では、メチル化シトシンが集積している場所しか捉えることができない。

現在、頻用されているのはbisulfite処理により、メチル化/非メチル化DNAを分け、PCR、シークエンスに持って行く方法である。DNAの処理にコツのいる実験法であるが、最近キットが発売されており、かなり簡便に施行することが可能になっている。筆者は皮膚腫瘍のp16, p15, p14, CDH1(E-cadherin), von Hippel-Lindau 遺伝子などについてプロモーター部位のメチル化を検討した。その結果、ほとんどの皮膚悪性腫瘍でCDH1(E-cadherin)遺伝子のプロモーター部位がメチル化していること、一部の悪性黒色腫で

p16 遺伝子のプロモーター部位がメチル化していること, それとほぼ一対一対応で組織内での E-cadherin 発現が減弱していることを見いだした。

さらに, さまざまな遺伝子のメチル化を, 組織切片上で直接検出するために, methylation detection - in situ hybridization (MDISH) 法を開発した。この方法はプロモーター内のホットスポットを認識するプローブと制限酵素の組み合わせにより, メチル化された細胞を検出するものである。

ここまでの既存, 新開発の手法の組み合わせにより, 腫瘍の特定部位 (通常, 悪性腫瘍全体が均一な形質を持った細胞集団であることはない) の癌抑制遺伝子のプロモーターのメチル化, mRNA 発現の減少, 蛋白発現の減少を組織切片上で可視化することに成功した。

しかし, 本当にプロモーターのメチル化が mRNA/蛋白発現の減少の原因なのだろうか。それとも, これらは直接に原因, 結果の関係ではなく, 両方とも何か別のメカニズムによって引き起こされた結果を見ているに過ぎないのだろうか。

前記の bisulfite 処理によるメチル化解析が頻用されるようになり, その意味づけのために通常行われているのが, cell line を用い, DNA メチル化, ヒストンアセチル化を薬剤で制御する方法である。DNA メチル化は 5-aza-cytidine, 5-aza-2'-deoxycytidine によって解除することができる。(この 2 種の薬剤は MDS に対する唯一の治療薬として米国 FDA が認可している。) また, ヒストンのアセチル化は trichostatin A, バルプロ酸により促進することができる。これらの薬剤を培養液中に添加することにより, mRNA/蛋白発現が増

加すれば, その癌抑制遺伝子はエピジェネティックな制御を受けていたとして扱われる。

ここで問題は, 通常 cell line 化するとエピジェネティックな形質は, 元の腫瘍からかなり異なったものになってしまうところである。筆者は, 培地組成, 培養条件を幅広く検討し, 炎症性疾患, 良性, 悪性腫瘍などさまざまな疾患の初代培養組織内で, メチル化されていた癌抑制遺伝子の mRNA を再発現させることに成功した (残念ながら蛋白発現する前に組織は壊死してしまうが)。興味深いことに, cell line の実験では, 数種の薬剤を添加すると mRNA 発現はさらに増強することが多いが, 固形腫瘍の初代培養では, かえって発現が減弱することもあった。また, 初代培養後の mRNA を抽出しマイクロアレイにかけることも可能だった。(発現が変化する遺伝子が多すぎて訳がわからなくなってしまうが, DNA メチル化を完全に抑制すると全遺伝子の 1/3 は影響を受けると言われている。)

DNA メチル化による癌抑制遺伝子の発現制御に関し, かなりクリアーカットに証明できるようにはなった。だが, 実際に治療への応用ということになると, まだ見通しは暗い。MDS に対する 5-aza-cytidine にしても, 遺伝子特異的な発現制御を行うのではない。謂わば分裂の盛んな細胞に対し効果の強い抗癌剤のようなものである。(抗癌剤に意味がないとは言わないが。) エピジェネティクスは, 研究, 診断に関しては実用化のレベルに達しているが, 治療に関しては, まだまだと言わざるをえない。