

341 2001.

- 2) Kominami R, Saito Y, Shinbo T, Matsuki A, Kosugi-Okano H, Ochiai Y, Kodama Y, Wakabayashi Y, Takahashi Y, Mishima and Niwa O: Genetic analysis of radiation-induced thymic lymphoma. International Congress Series 715: 224-231 2001.

司会 どうもありがとうございました。先生は非常に

難しいご研究なさってらっしゃるわけですが、今日は大変分かりやすいお話を下さりまして、私にも良くわかりました。ご質問もたくさんあると思いますが、さっき申し上げたとおり一通りお話をお伺いしてから意見交換をしたいと思います。ご質問がある方は、お忘れにならないようにメモなどをお取りいただければと思います。では続きまして「遺伝子のメチル化：発がんを新たな視点で考える」という講演を稲野助手にお願いします。

## 2 遺伝子のメチル化

### — 発がんを新たな視点で考える —

稲野 浩一

新潟大学医学部附属病院検査部

### The Methylation of Genes

#### — Its Relationship to Carcinogenesis —

Koichi INANO

*Clinical Laboratory Division*

*Niigata University Medical Hospital*

#### Abstract

In vertebrates, the 5th position of the cytosine residues in CpG sequences in genomic DNA are often methylated. The DNA methylation is catalyzed by the DNA methyltransferases, Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b, and it functioned in numerous physiological phenomena including carcinogenesis. In numerous cancer, CpG islands are often hypermethylated abnormally, and so that the expression of genes located in their down-stream are suppressed. These suppressed genes are mostly related to the cell proliferation, cell differentiation, tumor suppression and cell adhesion, etc. On the other hand, 5-methylcytosine residue is thought to be an endogenous mutagen. Because 5-methylcytosine can be easily converted to thymidine by deamination reaction under the physiological condition. This C:T transition conversion is one of origins of the point mutagenesis of genes. Recently, there are several reports that the methylation states of the interest genes in cancer patients were analyzed by the MSP (methylation specific PCR) method

Reprint requests to: Koichi INANO  
Clinical Laboratory Division  
Niigata University Medical Hospital  
1-754 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8520 Japan

別刷請求先：〒951-8520 新潟市旭町通り1-754  
新潟大学医学部附属病院検査部 稲野 浩一

using patient's serum or plasma DNA prepared from their peripheral blood. In the future, these tests are possible to be a new tumor marker test or a metastasis marker test in the laboratory medicine area.

**Key words:** DNA methylation, Carcinogenesis, 5-methylcytosine, DNA methyltransferase, Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b

## はじめに

ほ乳類における DNA の唯一の生理的・化学修飾であるシトシン残基のメチル化は、遺伝子発現の後天的制御 (エピジェネティクス) の中心を担っていることがわかってきた。ほ乳類における DNA メチル化は、遺伝子刷り込み、X 染色体の不活性化、DNA 複製のタイミング、抗体遺伝子の再構成、発がん、組織特異的な遺伝子の発現など様々な生命現象に重要な役割を担っている。現在までにメチル化反応を触媒する酵素は、Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b の 3 遺伝子が知られている。さらに、メチル化した DNA に結合する蛋白質群 (メチル化 DNA 結合蛋白質; MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MeCP2) や、それらを介して結合するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) らの役者も加わって遺伝子の発現を複雑に制御している機構が少しずつ分かってきた。本稿では、この DNA メチル化と発がんの関連について概説する。

## DNA メチル化

### 1. DNA methyltransferases

#### 1) Dnmt1

DNA メチル化酵素として最初にクローニングされたのは Dnmt1 である<sup>1)</sup>。Dnmt1 はいわゆる維持型のメチル化酵素と考えられており、DNA 複製の時にヘミメチル化 DNA (鋳型鎖がメチル化されていて新生鎖が未メチル化の状態) を標的にして DNA のメチル化状態を娘細胞に正確に伝える役割を担っている。一般に、本酵素の発現は細胞分裂の盛んな細胞において高く、しかも S 期においてその活性が最も高いことが知られている<sup>2)3)</sup>。本酵素を欠損したマウスでは胎生致死であり、メチル化シトシンの量は正常の 1/3 にまで減少して

いた<sup>4)</sup>。しかし、本酵素の欠損マウスにおいてもメチル化シトシン残基はゼロにならないことから、本酵素の他にメチル化酵素 (*de novo* DNA methyltransferases) が存在することが示唆された。一方、本酵素には組織特異的なエキソン 1 のスプライシングバリエーションが存在し、体細胞型 (Dnmt1s)、卵母細胞型 (Dnmt1o)、バキテン期精母細胞型 (Dnmt1p) が知られている<sup>5)</sup>。筆者らは Dnmt1 が成体マウス脳の神経細胞においても高発現しており、かつ Dnmt1p が少量ながら発現していることを見いだしており<sup>6)</sup>、Dnmt1 の神経系における役割についても関心がもたれている。

#### 2) Dnmt3a, Dnmt3b

最近になって Dnmt3a と Dnmt3b の 2 つの新しい DNA メチル化酵素遺伝子が同定された<sup>7)</sup>。Dnmt3a の欠損マウスは生後 4 週間以内に致死となるが、Dnmt3b の欠損マウスでは胎生致死であった。どちらの欠損マウスも形態学的な発生異常が認められた。またこれらのマウスの胚では内在性のレトロウイルス由来配列や minor サテライト DNA のメチル化が起こっておらず、これらの酵素が *de novo* のメチル化に重要な働きを担っていることが示された。この酵素の発見と同時に本酵素の欠損が ICF (immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies) 症候群の原因遺伝子であることも示されている<sup>7)</sup>。

### 2. DNA メチル化反応

DNA のメチル化反応はシトシン残基の 5 位の炭素にメチル基 (CH<sub>3</sub>-) を導入する反応で、メチル基ドナーとしては S-アデノシルメチオニンが使われる。DNA 上のアクセプター部位は CpG 配列であり、ゲノム中の全 CpG 配列の約 70% のシトシン残基がメチル化されている<sup>8)</sup>。しかし、正常細胞の CpG アイランドでは遺伝子発現の有無に関わらずメチル化を受けていないのが一般的

表1 がん細胞で CpG アイランドのメチル化によって発現が抑制されている遺伝子<sup>11)</sup>

Pathway affected	Genes silenced by CpG island methylation
Cell cycle control	Rb, p16INK4 $\alpha$ , p15, p14ARF, p73
DNA repair	MLH1, O6MGMT, GST $\pi$ , BRCA1
Inhibiting apoptosis	DAP-kinase, Caspase-8, TMS1
Invasion tumor architecture	E-cadherin, VHL, APC, LKB1, TIMP3, Trombospondin1
Growth factor response	Estrogen receptor, RAR $\alpha$ , Androgen receptor, Endothelin B receptor

である。維持型メチル化 (Dnmt1による) では少なくともヘミメチル化部分を認識していると考えられるが, *de novo* メチル化では (Dnmt3a, 3bによる) そのアクセプター部位に共通の塩基配列等は見いだされておらず, メチル化部位の識別機構を含めた詳細なメチル化反応機序は不明である。

一方, メチル化反応による遺伝子転写抑制の機構は段々と明らかになってきている。転写因子には, a) メチル化 DNA そのものに直接結合できなくなる転写因子群 (E2F, CREB, AP2, cMyc/Myn, NF- $\kappa$ B, cMyb, ETS) と, b) 本来メチル化 DNA そのものへの結合活性はあるが, メチル化 DNA 結合蛋白質 (MBDs) が結合したことによって, その結果 DNA へのアクセスが不可能となる転写因子群 (Sp1, CTF, YY1), の2つのタイプが存在する。したがってこのどちらの場合でも DNA メチル化は転写抑制に働くことになる<sup>9)</sup>。さらに, MBDs や Dnmt1 にはヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が結合することが知られており<sup>10)</sup>, さらにこの酵素の働きでメチル化 DNA 付近のクロマチン構造をヘテロクロマチン構造に変換することで転写不活性な状態にする機構が示唆されている。このように, DNA メチル化は主に転写の抑制を通して DNA レベル, クロマチンレベルの両面から遺伝子発現を制御しているといえよう。

### 発がん と DNA メチル化の関係

#### 1. がん細胞における DNA メチル化状態

一般にがん細胞の DNA は「特定の領域が高メチル化状態」にある場合が多く, 正常ではメチル

化されていない CpG アイランドのメチル化によって様々な遺伝子の発現が消失していることが知られている。それらの多くは細胞周期調節因子や癌抑制遺伝子, 細胞接着因子, ミスマッチ修復因子などである (表1)<sup>11)</sup>。これらの遺伝子発現の低下は, 細胞の異常増殖や突然変異の誘発を招き, 発がんへの出発点の一因となることが示唆されている。

#### 2. 内在性の変異源物質としての5-メチルシトシン

DNA メチル化酵素によってメチル化修飾を受けたシトシン残基 (5-メチルシトシン) は, 脱アミノ化反応によって容易にチミジンに変化する。しかし, この変異は DNA 修復系による認識・修復がされにくいいため, CpG 配列では C  $\rightarrow$  T transition 率が上昇することがわかっている (図1)<sup>12)</sup>。実際, がん抑制遺伝子の一つ, P53 遺伝子の変異ホットスポットがしばしば CpG 配列にある<sup>13)</sup>。さらに benzo[o]pyrene や UV などの発がん物質存在下では5-メチルシトシン由来の C  $\rightarrow$  T transition 率は数倍~10倍に促進されることがわかっている<sup>13)</sup>。このように DNA メチル化によってできた5-メチルシトシンは, それ自身が変異源となりうる可能性を併せ持っている。

#### 3. メチル化 DNA 検出のがん関連臨床検査としての応用の可能性

DNA methyltransferases (Dnmts) の発現量とがん細胞における DNA のメチル化との因果関係を調べた研究は多く, がん細胞では Dnmt1 と Dnmt3b が協同して遺伝子の発現抑制に働いているという報告がある。しかし, 必ずしも Dnmts の発現量と DNA のメチル化の程度との間に相関関

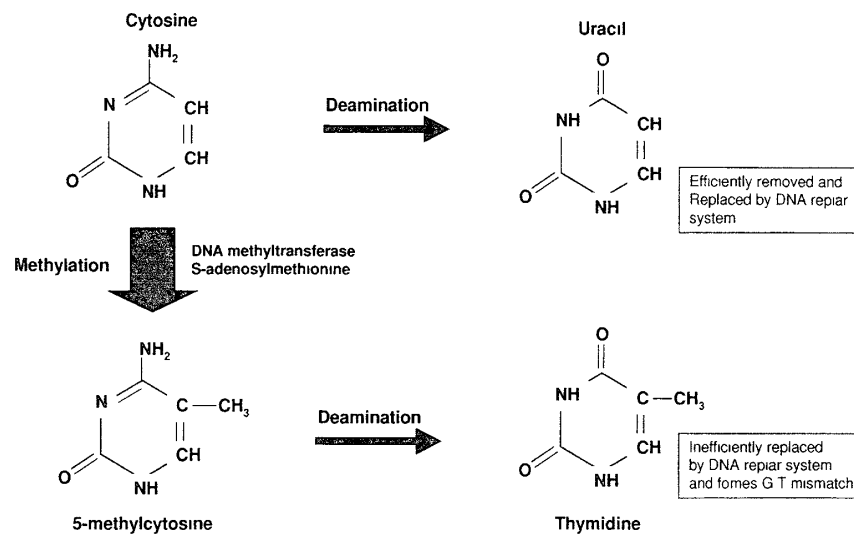


図1 5-メチルシトシンの生合成と脱アミノ化反応

係が見られるわけではなく、現在のところ Dnmts の発現量とがん細胞の関係は明らかになっていない。

一方、がんに関連した遺伝子側のメチル化状態を簡便にかつ感度良く調べる方法がいくつか開発されている。中でも臨床検査法として注目されるのは、Methylation Specific PCR (MSP) 法である<sup>14)</sup>。同法は DNA を Sodium bisufite で処理すると、5-メチルシトシンはそのままだが、修飾されていないシトシン残基がウラシルに変換されることを利用する。検体の DNA を Sodium bisufite で処理した後、調べたい遺伝子部分を PCR 法で増幅する。この時、メチル化特異的プライマーと非メチル化特異的プライマーを使ってそれぞれを増幅することによって、メチル化の有無を増幅産物の有無によって判定する。最近、がん組織における遺伝子のメチル化状態を調べるために、がん患者の末梢血の血清または血漿から得た DNA を使って MSP 法を行う方法が報告されている<sup>15)16)</sup>。この方法は、新しい腫瘍マーカー検査、もしくは転移マーカー検査となる可能性があり非常に興味深いところである。

## おわりに

発がんのメカニズムの一部は DNA メチル化を中心としたエピジェネティクスの立場からも理解されるとともに、将来的には遺伝子のメチル化状態の検索が新しい腫瘍マーカーまたは転移マーカーとなる可能性があり、今後の研究の発展が期待される。

## 参考文献

- 1) Bestor TH, Laudano A, Mattaliano R and Ingram V: Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. *J Mol Biol* 203: 971-983 1988.
- 2) Syf M, Bozovic V and Tanigawa G: Growth regulation of mouse DNA methyltransferase gene expression. *J Biol Chem* 266: 10027-10030 1991.
- 3) Liu Y, Sun L and Jost JP: In differentiating mouse myoblasts DNA methyltransferase is posttranscriptionally and posttranslationally regulated. *Nucleic Acids Res* 24: 2718-2722 1996.
- 4) Li E, Bestor TH and Jaenisch R: Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926

- 1992.
- 5) Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM and Bestor TH: Sex - specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* 125: 889 - 897 1998.
  - 6) Inano K, Suetake I, Ueda T, Miyake Y, Nakamura M, Okada M and Tajima S: Maintenance - type DNA methyltransferase is highly expressed in post - mitotic neurons and localized in the cytoplasmic compartment. *J Biochem* 128: 315 - 321 2000.
  - 7) Okano M, Bell DW, Haber DA and Li E: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247 - 257 1999.
  - 8) Yoder JA, Walsh CP and Bestor TH: Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trns Genet* 13: 335 - 340 1997.
  - 9) Tate PH and Bird AP: Effects of DNA methylation on DNA - binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3: 226 - 231 1993.
  - 10) Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes - Davies L and Kouzarides T: DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature* 24: 88 - 91 2000.
  - 11) Rountree MR, Bachman KE, Herman JG and Baylin SB: DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 20: 3156 - 3165 2001.
  - 12) Laird PW and Jaenisch R: DNA methylation and cancer. *Hum Mol Genet* 3: 1487 - 1495 1994.
  - 13) Scmutte C and Jones PA: Involvement of DNA methylation in human carcinogenesis. *Biol Chem* 379: 377 - 388 1998.
  - 14) Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD and Baylin SB: Methylation - specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9821 - 9826 1996.
  - 15) Esteller M, Saez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB and Herman JG: Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 59: 67 - 70 1999.
  - 16) Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, Jeronimo C, Harden S, Engles J, Danenberg PV, Yang S and Sidransky D: Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer. *Cancer Res* 62: 371 - 375 2000.

司会 ありがとうございます。少し難しいお話が出てきたかもしれませんが、後でまたお話の整理を一緒にさせていただきたいと思います。続きまして古川先生より「白血病の治療効果判定における遺伝子マーカー」というお話をいただきます。お願いします。