

グリオーマにおけるDNAメチルトランスフェラーゼ mRNAの発現

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9186

グリオーマにおける DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現

金沢大学医学部医学科脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

岡 田 由 恵

グリオーマにおける分子生物学的異常の一つを解明するために、腫瘍の悪性度と DNA メチルトランスフェラーゼの発現との関係を調べた。定量的逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法により、微量な標本中の DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現量を測定することが可能であった。対象は、手術的に摘出されたグリオーマ組織12例 (星状細胞腫 4例, 退形成性星状細胞腫 6例, 膠芽腫 2例), グリオーマ培養細胞 4系列および正常脳 2例であった。正常脳組織と比較して DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現量は、悪性度の低いグリオーマでは16倍から55倍, 悪性度の高いグリオーマ (退形成性星状細胞腫および膠芽腫) では80倍から450倍と有為に上昇しており, また培養細胞では450倍以上と著明に上昇していた。パラフィン包埋した組織標本を用いて行った DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA に対する組織内ハイブリダイゼーションの結果でも悪性度の高いグリオーマでシグナル強陽性の所見を認めた。以上二つの方法で, DNA メチルトランスフェラーゼの遺伝子は悪性度の低いグリオーマでも高いレベルで発現しており, 特に悪性のグリオーマでは過剰発現していることが示された。このような DNA メチルトランスフェラーゼの過剰発現は, DNA の異常なメチル化をもたらし, グリオーマにおける遺伝子不安定性の一役を担っている可能性がある。

Key words glioma, DNA methyltransferase, CpG methylation, quantitative RT-PCR, in situ hybridization

動物細胞の DNA を構成する 4 種類の塩基のうち CG 配列を持つシトシンの 60-70% はメチル化されていることが知られている¹⁾。この CG 配列を持つシトシンの 5 位を選択的にメチル化する酵素として、哺乳動物で唯一知られているのが DNA メチルトランスフェラーゼである²⁾。メチル化を受けたシトシンは脱アミノ化によりチミンに変異しやすい。またクロマチン構造変化により転写因子結合に影響を及ぼすため、DNA のメチル化は遺伝子発現を抑制する。さらに近年 DNA のメチル化による遺伝子発現調節はゲノムインプリンティング (母方由来と父方由来の対立遺伝子が区別され、異なる発現レベルを示す現象) の原因として注目されている³⁾。このように DNA のメチル化に関しては様々な生物学的意義が考えられている⁴⁾⁻¹⁵⁾。発癌との関係についても、肺癌、大腸癌、乳癌などで DNA のメチル化のパターンや程度の異常が報告され、腫瘍抑制遺伝子や分化抗原の発現抑制との関連が示唆されている¹⁶⁾⁻²⁸⁾。

臨床的にグリオーマと診断されたものの中には様々な分化段階のものが存在し、癌遺伝子の増幅、癌抑制遺伝子の異常や染色体の欠失といった幾つかの異常が多段階に作用し、腫瘍の発生・増殖に関与していると考えられている³⁰⁾⁻³⁴⁾。グリオーマにおいても DNA メチル化の異常は報告されており (東北大上野ら, 佐賀医大福山ら, 私信), 遺伝子の変異や発現異常に DNA メチル化の異常が関与している可能性が十分にある。本研究ではグリオーマにおける分子生物学的異常の一端を解明す

るために、DNA メチルトランスフェラーゼに着目し、定量的逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法および組織内ハイブリダイゼーション法を用い、DNA メチルトランスフェラーゼの mRNA を特異的に検出することによって、DNA メチルトランスフェラーゼとグリオーマの悪性度との関係を解析した。

材料および方法

1. 材 料

1994年から1995年の間に当科および関連病院で手術切除されたグリオーマ12例を用いた。その病理組織学的悪性度分類については、世界保健機関 (World Health Organization, WHO) 脳腫瘍分類 (1993年)³⁵⁾に従った。内訳は、星状細胞腫 (astrocytoma, grade II) 4例, 退形成性星状細胞腫 (anaplastic astrocytoma, grade III) 6例, 膠芽腫 (glioblastoma, grade IV) 2例であった。RNA 抽出用標本は手術摘出後速やかに液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃にて保存した。組織内ハイブリダイゼーション用標本は、4%パラホルムアルデヒドにて固定後パラフィン包埋した。ヒトグリオーマ由来の細胞株として U87MG, U251MG, U373MG, T98G の 4 種類を使用した。各細胞の培養には、10% (v/v) 牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (GIBCO, Grand Island, NY, USA), 0.3mg/ml グルタミン (日本製薬, 東京), 100U/ml ペニシリン (和光純薬, 大阪), 100μg/

平成 7 年 12 月 12 日 受付, 平成 8 年 1 月 11 日 受理

Abbreviations: bp, base pair; EGFR, epidermal growth factor; G3PDH, Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase; LOH, loss of heterozygosity; PBS, phosphate-buffered saline; RT, reverse transcription; SSPE, saline sodium phosphate ethylenediamine tetraacetic acid; TBS, tris-buffered saline; TNE, Tris-HCl-NaCl-EDTA; WHO, World Health Organization

ml ストレプトマイシン (和光純薬) を含んだダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) (日本製薬) を用い、5% CO₂ 濃度、37℃の条件下で培養した。

対照としては、脳腫瘍以外の手術で得られた正常脳組織を用いた。

II. RT-PCR 反応

全 RNA は ISOGEN (ニッポンジーン, 東京) を用いての抽出し、RT-PCR 反応は GeneAmp ThermoStable rTth Reverse Transcriptase PCR キット (Perkin-Elmer Cetus, New York, USA) を用いて行った。反応には遺伝子増幅装置 ASTEC PC-800 (サイメディア, 東京) を使用した。ヒト DNA メチルトランスフェラーゼ cDNA の塩基配列²⁾よりセンスプライマーとして 5'-TAGAGTGGGAATGGCAGATG-3' (351-370), アンチセンスプライマーとして 5'-GCGGTCTAGCAACTCGTTC-3' (627-646) を設計した。合成は日本バイオサービス (埼玉) に依頼した。グリセルアルデヒド-3-リン酸塩脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, G3PDH) のプライマーは市販のもの (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, USA) を使用した。その塩基配列はセンスプライマーは 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (586-605), アンチセンスプライマーは 5'-TCCACCACCTGTTGGCTGTA-3' (1018-1037) であった。PCR 反応の温度条件は、94℃で1分間、60℃で2分間の2ステップを1サイクルとした。mRNA の発現量を定量するために、各試料につき反応サイクル数が 5, 10, 15, 20, 25, 30 のものを作成した。

III. サザンブロット分析

サザンブロットのためのプローブ用オリゴヌクレオチドは、DNA メチルトランスフェラーゼに対しては 5'-TAGCCCCA-GGATTACAAGGAAAAGCACCAG-3' (456-485), G3PDH に対しては 5-TCTCCTCTGACTTCAACACGCGACCCACT-3' (3388-3417) を設計し、合成は日本バイオサービスに依頼した。

プローブ DNA 0.1 μ g に対し 2mM 塩化マグネシウム、0.1M カロジル酸ナトリウム (pH7.0), 50 μ Ci [α -³²P] デオキシチジン三リン酸 (Amersham, Buckinghamshire, UK), 10単位ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼおよび滅菌蒸留水を加えて全量 20 μ l とし、37℃にて2時間反応させ 3' 末端を標識した後、80 μ l の 10mM トリス塩酸 (Tris-HCl) (pH7.5)-100mM 塩化ナトリウム-1mM EDTA (TNE) を加え、Sephadex G-50 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) にてゲル濾過し、ハイブリダイゼーションに使用した。

増幅後の DNA を 2% アガロースゲルにて電気泳動し、ナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N⁺) (Amersham) に転写し、紫外線にて固定した。ついでフィルターを 5 \times 食塩リン酸ナトリウム-エチレンジアミン四酢酸液 (saline sodium phosphate ethylenediamine tetraacetic acid, SSPE), 5 \times デンハルト液 (0.1% ポリビニールピロリドン, 0.1% ウシアルブミン, 0.1% フィコール), 0.5% SDS, 20 μ g/ml 変性サケ精子 DNA (和光純薬) からなる溶液で 55℃, 1 時間プレハイブリダイゼーションした後、標識プローブ液 0.4% (v/v) を加えて 55℃, 16 時間のハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、フィルターを 2 \times SSPE, 0.1% (w/v) SDS で室温, 10 分間, 1 \times SSPE, 0.1% (w/v) SDS で 55℃, 15 分間, 1 \times SSPE, 0.1% (w/v) SDS で 55℃, 10 分間洗浄し、バイオイメージアナ

ライザー FUJIX BAS2000 (富士フィルム, 東京) にて放射活性を測定した。

IV. 組織内ハイブリダイゼーション

1. プローブの作成

RT-PCR により増幅した DNA メチルトランスフェラーゼ cDNA を精製し、pGEM-T ベクター (Promega, Madison, USA) にクローン化した。オートシーケンサー (ALF DNA Sequencer, Pharmacia) で塩基配列を調べ、正しい方向に目的の配列が欠損なく挿入されていることを確認した。RNA カラーキット (Amersham) を用いて DNA メチルトランスフェラーゼの mRNA に対するセンスおよびアンチセンス RNA プローブを合成し、蛍光標識されたデオキシウリジン三リン酸で標識した。

2. 切片の作成と前処理

4% パラホルムアルデヒド入りリン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.2) で 4℃ 固定後、パラフィン包埋したブロックをマイクロームを用いて厚さ 4 μ m に薄切し、あらかじめポリ-L-リジン (和光純薬) でコーティングしておいたスライドガラスに張り付け 37℃ で乾燥した。乾燥した切片をキシレンで脱パラフィン後、エタノール系列を通し PBS で洗浄後、10 μ g/ml プロテアーゼ K (宝酒造, 大津) で 37℃, 20 分処理した。次に 4% パラホルムアルデヒド入り PBS で再び固定し、0.2M 塩酸で 10 分間, 0.1M トリエタノールアミン塩酸 (pH8.0) で 1 分間, 0.25% 氷酢酸入り 0.1M トリエタノールアミン塩酸で 10 分間処理し、エタノール系列で脱水後、風乾した。

3. ハイブリダイゼーション

85℃, 3 分処理した標識済みプローブを 500ng/ μ l になるようにハイブリダイゼーション緩衝液 (Amersham) に希釈し、切片の上のせ 60℃, 16 時間, 湿箱中でハイブリダイゼーションを行った。

4. 洗浄

ハイブリダイゼーション後の洗浄は、まず 50% ホルムアミド入り 2 \times SSC で 50℃, 30 分行った後、10mM トリス塩酸 (pH7.5)-500mM 塩化ナトリウム-1mM EDTA で 37℃, 10 分行い、次に RNA 分解酵素 (ribonuclease A, 宝酒造) 10 μ g/ml 入り TNE で 37℃, 30 分行い、再び TNE に 37℃, 10 分戻した後、最後に 2 \times SSC で 50℃, 20 分 1 回, 0.2 \times SSC で 50℃, 20 分 2 回行った。

5. 発色

まず 100mM トリス塩酸 (pH7.5)-400mM 塩化ナトリウム (tris-buffered saline, TBS) に 5 分間なじませた後、0.5% (w/v) ブロッキング溶液 (Amersham) 入り TBS で室温, 1 時間ブロッキングし、再び TBS に 5 分間なじませた後、0.5% (w/v) 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) で 1000 倍希釈した抗体 (anti-fluorescein alkaline phosphatase conjugate) (Amersham) をのせ、湿箱中で 1 時間反応させ、TBS で洗浄した。次に発色用緩衝液 (100mM トリス塩酸 (pH9.5), 100mM 塩化ナトリウム, 50mM 塩化マグネシウム) に 5 分間なじませた後、ニトロ青テトラゾリウム (nitroblue tetrazolium, NBT) とプロモクロロインドキシルリン酸 (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate, BCIP) を発色緩衝液で希釈した発色液をのせ斜光湿箱中で 24 時間反応させた。最後に蒸留水で反応を止め、メチルグリーンで核染色を行い、グリセリン-PBS で封入した。封入

後速やかに検鏡，撮影した。

成 績

1. RT-PCR による解析

1. ヒトグリオーマ由来培養細胞 U251MG より抽出した全 RNA に対し RT-PCR を行い反応条件の検定を行った。反応産物をアガロースゲルに電気泳動した結果，DNA メチルトランスフェラーゼでは296塩基対 (base pair, bp), G3PDH では452bp の目的とするバンドが検出された。各バンドに対する長さ 20bp のプローブを用いたサザンブロットハイブリダイゼーションの結果，DNA メチルトランスフェラーゼおよび G3PDH ともに増幅 DNA 断片が単一バンドとして検出された。検出された増幅 DNA 断片を，相補結合したプローブ DNA の放射活性を測定することによって定量した。図1は DNA メチルトランスフェラーゼに対するプライマーで RT-PCR を行い反応産物を定量した場合の，反応サイクル数依存性を見たものである。横軸に反応サイクル数，縦軸に増幅産物のシグナル強度をプロットしてある。図に示すとおり増幅反応は25サイクルまでは直線的に進行し，25サイクル以上ではプラトーに達した。次にグリオーマ切除標本より抽出した全 RNA に対する RT-PCR を，増幅反応が直線的に進行すると考えられた15・20・25サイクルにて行い，3例についてグラフにしたものが図2である。図に示す如く15から25サイクルの間では増幅反応は直線を描き，その傾きはサンプルによらず一定であった。手術的

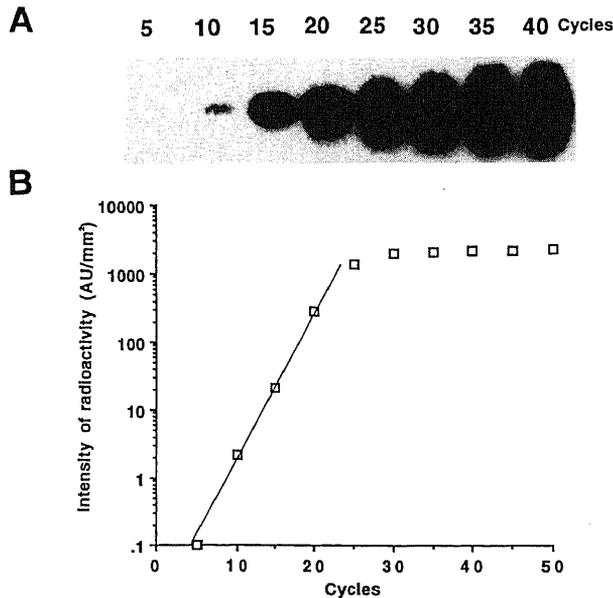


Fig. 1. Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of DNA methyltransferase mRNA for the determination of the exponential range of cycle numbers. All sequential cycles were initiated with 200 ng of total RNA from U251MG glioma cells. (A) Autoradiograms of Southern blots performed on RT-PCR products with 5-40 cycles. (B) Signal intensities of RT-PCR products are expressed as the arbitrary logarithm values of intensity of radioactivity and plotted against the numbers of amplification cycles. Radioactivities of hybridization bands were measured with as Fuji BA100 BioImage analyzer and described in arbitrary units (AU) per mm².

に抽出されたグリオーマ12例の腫瘍組織，ヒトグリオーマ由来培養細胞4種類，正常脳2例より抽出した全 RNA に対し RT-PCR を行い，DNA メチルトランスフェラーゼおよび G3PDH の mRNA の発現を検討した。図3は，DNA メチルトランスフェラーゼおよび G3PDH に対するプライマーを用い，RT-PCR 反応を20サイクル行った後，各々に対する特異的プローブを用いてサザンブロットングを行った結果である。サザンブロットングにより全例において G3PDH の mRNA に由来する452塩基対の増幅 DNA 断片が検出された。DNA メチルトランスフェラーゼの mRNA に由来する296塩基対の増幅 DNA 断片は1-5および17, 18ではわずかしら認められなかったが，全例において検出された。ここで DNA メチルトランスフェラーゼの mRNA に由来する増幅 DNA 断片の放射活性を直接比較することは，鑄型に用いる全 RNA 量のわずかな誤差が RT-PCR という手法で増幅されるとい理由で正確さを欠くので，補正比較の方法として，どのような組織でも一定の発現レベルを保っている G3PDH をコントロールとして用い，G3PDH に対する DNA メチルトランスフェラーゼの比を算出し，その値を比較検討した。検出された断片の放射活性を測定し，各サンプルについて G3PDH に対する DNA メチルトランスフェラーゼの放射活性比を求めた結果が表1である。正常脳では DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現量は G3PDH の1000分の1しか発現していなかったが，グリオーマでは悪性度の低い星状細胞腫 (astrocytoma, WHO grade II) では G3PDH の50分の1から20分の1程度，悪性度の高い退形成性星状細胞腫 (anaplastic astrocytoma, WHO grade III) や膠芽腫 (glioblastoma, WHO grade IV) では G3PDH の5分の1から4倍以上と，正常脳組織の16倍から450倍以上上昇しており，しかも悪性のものほど DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現が高い傾向にあった。また培養細胞では DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現量は G3PDH の4倍以上，なかには30倍もの高値を示すものもあり，過剰発現を認めた。これは正常脳組織と比較すると450倍以上の高値であった。WHO 分類で grade II 以下の星状細胞腫を良性，WHO 分類で

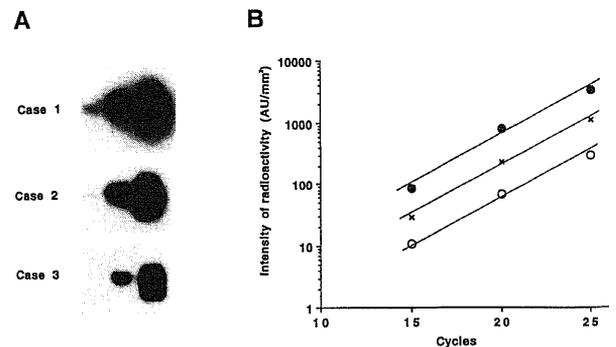


Fig. 2. Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of DNA methyltransferase mRNA levels in surgical specimens from 3 patients. (A) Autoradiograms of Southern blots performed on RT-PCR products with 15-25 cycles. (B) Signal intensities of RT-PCR products are expressed as the arbitrary logarithm values of intensity of radioactivity and plotted against the numbers of amplification cycles. Radioactivities of hybridization bands were measured with a Fuji BA100 BioImage analyzer and described in arbitrary units (AU) per mm²: ●, case 1; ×, case 2; ○, case 3.

grade III 以上の退形成性星状細胞腫および膠芽腫を悪性として 2 群に分け, DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現量と悪性度との相関を検討した結果, 有意差を認めた (図 4).

Table 1. Sample lists and relative amount of DNA methyltransferase (MTase) mRNA

Sample	Relative amount of DNA MTase mRNA ^{e)}
Glioma	
Astrocytoma ^{a)}	
1 ^{b)}	0.055
2	0.030
3	0.016
4	0.035
Anaplastic astrocytoma	
5	0.325
6	1.042
7	0.217
8	0.687
9	1.324
10	4.540
Glioblastoma	
11	0.823
12	2.009
Glioma cell line	
U373MG ^{c)}	4.493
T98G	4.955
U251MG	7.652
U87MG	30.868
Normal human brain	
A ^{d)}	0.001
B	0.001

a) World Health Organization (WHO) classification.
 b), d) Case number.
 c) Name of cell line.
 e) The relative amount of DNA methyltransferase mRNA was analyzed by quantitative reverse transcriptase PCR method and standardized by the amount of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase mRNA as an internal control.



Fig. 3. Autoradiograms of Southern blots performed on reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) products from 200 ng of total RNA from surgical specimens and cultured glioma cells. Each sample was transcribed and amplified by 20 cycles of PCR. Upper lanes are 296 base pair (bp) fragments of DNA methyltransferase mRNA and lower lanes are 452 bp fragments of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) as an internal control: lanes 1-12, the lane numbers are the same as the glioma case numbers listed in Table 1; lane 13, U373MG glioma cell line; lane 14, T98G glioma cell line; lane 15, U251MG glioma cell line; lane 16, U87MG glioma cell line; lane 17, normal human brain case A; lane 18, normal human brain case B.

II. 組織内ハイブリダイゼーション

RT-PCR による半定量の結果と一致して, 悪性のもでは DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA に対する組織内ハイブリダイゼーションにおいてシグナル陽性所見を認めた (図 5).

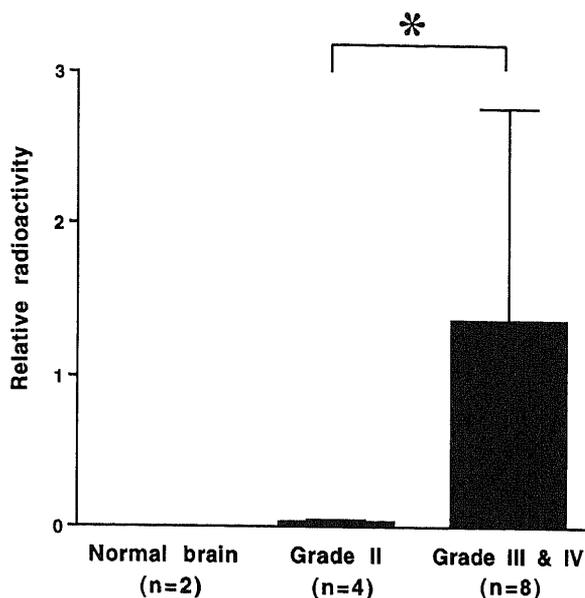


Fig. 4. Comparison of tumor grade and DNA methyltransferase mRNA expression. The relative amount of DNA methyltransferase mRNA were analyzed by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) method and standardized by the amount of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) mRNA as an internal control. Malignant grading is according to the classification determined by the World Health Organization. Columns, mean values of each group; bars, SD; *, P < 0.05 by T-test.

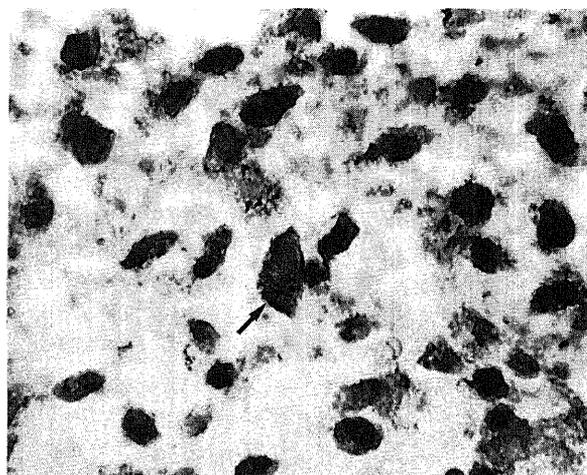


Fig. 5. *In situ* hybridization with antisense RNA probe for DNA methyltransferase mRNA in glioblastoma. Positive hybridization is seen in tumor cells (arrow). Original magnification, $\times 400$.

考 察

DNA メチルトランスフェラーゼは、DNA のシトシン残基を 5-メチルシトシンにメチル化する酵素である²⁾。しかもこのシトシンのメチル化は、5'-C-p-G-3' というパリンδροーム配列を形成する相補鎖 DNA のシトシンに限られている。哺乳動物では約 5×10^7 個の CG 配列が存在する⁴⁾が、この CG 配列中のシトシンの約 60% がメチル化されているといわれている¹⁾。脊椎動物の CG 配列は、ゲノムの中できわめて不均一に分布しており、CG 島と呼ぶ長さ 1000 から 2000 塩基対の特定の領域に、平均の 10 から 20 倍の密度で存在する⁵⁾。CG 島はいわゆるハウスキーピング遺伝子 (housekeeping gene, 細胞の存在に不可欠な多数の蛋白質をコードし、そのためほとんどの細胞で発現される遺伝子) などの遺伝子の 5' 上流プロモーター周辺にある。このプロモーター部分の CG 配列のシトシンのメチル化は、クロマチンの構造変化をもたらしたり、転写因子の接近を阻害して、遺伝子発現を抑制すると考えられている^{6)~10)}。したがってメチル化の程度の低い CG 島を 5' 上流に持つ遺伝子は転写発現され、一方 CG 島のシトシンが過剰にメチル化されている遺伝子の発現は抑制される。このようにメチル化の程度を変化させることで、ある種の遺伝子の発現は調節されているらしい。たとえば発生途中では、受精後一旦ゲノム全体が脱メチル化された後、ハウスキーピング遺伝子以外の多くの遺伝子は新たなメチル化を受ける。その後再び各遺伝子に固有の組織・時期特異的メチル化パターンを獲得する¹¹⁾。DNA メチルトランスフェラーゼをノックアウトした変異マウスが胚発生中期に致死となることも、DNA メチル化による遺伝子発現調節機構が、発生過程で重要な役割を果たしていることの反映と考えられている⁹⁾。また、メチル化されたシトシンは脱アミノ化によりチミンへの突然変異を起こしやすい¹²⁾⁹⁾。例えばある種の癌では、癌抑制遺伝子 p53 の点突然変異の 80% が CG 配列のシトシンからチミンへの変異であり、DNA メチル化による遺伝子発現異常の機序の一つとして注目されている¹⁴⁾¹⁵⁾。癌細胞における DNA メチル化の異常はこれまでも報告されていたが、近年になってゲノムインプリンティング (父方由来と母方由来の対立遺伝子が区別され、異なる発現レベルを示す現象) に DNA のメチル化が関係していることが明らかになり⁹⁾、その遺伝子発現調節機序の研究が再び注目されるようになり、詳細な検討がなされ始めてきた。文献的に CG 配列のシトシンのメチル化亢進が報告されているものは、大腸癌および卵巣癌の染色体 17 番短腕^{16)~18)}、肺癌の染色体 17 番短腕および 3 番短腕とカルシトニン遺伝子¹⁹⁾¹⁹⁾、リンパ腫のカルシトニン遺伝子¹⁹⁾²⁰⁾、乳癌のエストロゲン受容体遺伝子の CG 島²¹⁾²²⁾、網膜芽細胞腫の癌抑制遺伝子のプロモーター部分²³⁾ などである。新しい細胞周期抑制遺伝子として注目されている CDKN2/p16/MTS1 遺伝子に関しても、種々の癌細胞で CG 島のメチル化と p16 遺伝子の mRNA 発現抑制が報告されている^{24)~26)}。またグリオーマにおいては、グリオーマの分化抗原の一つと考えられ悪性度が高いほどその発現が低下すると考えられている神経膠原線維性酸性蛋白質 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) のプロモーター部分の CG 配列でシトシンのメチル化亢進が明らかにされている (佐賀医大福山ら、私信)。このような腫瘍細胞における癌抑制遺伝子や分化抗原のプロモーター部分のシトシンのメチル化亢進は、それらの遺伝子発現の抑制をもたらすものであり、癌化の

メカニズムの一端を担っているものと考えられている。それと同時に CG 配列でのシトシンのメチル化を触媒する酵素である DNA メチルトランスフェラーゼもいくつかの腫瘍で過剰発現していることが報告されている。1986年には Kautinainen らが、培養細胞についての調べたところ、腫瘍細胞では非腫瘍細胞に比べ DNA メチルトランスフェラーゼの活性が 4 倍から 3000 倍も高いものがあったことを報告している²⁷⁾。その後 Baylin らは大腸癌において、正常大腸粘膜・腺腫性ポリープ・癌組織の DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA レベルを比較したところ、悪性度に比例して DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現が上昇していることを見出した²⁸⁾。またこの mRNA の発現量が DNA メチルトランスフェラーゼの酵素活性と比例していることは同グループによって既に証明されている²⁹⁾。今回著者らはグリオーマの手術摘出組織における DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現レベルを定量的 RT-PCR 法にて測定し、腫瘍の悪性度との関係を検討した結果、グリオーマにおける DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現量は悪性度の低いものでも正常組織と比較すると増加しており、また腫瘍の悪性度に相関して増加していることが判明した。定量的 RT-PCR 法は、微量の標本から抽出した全 RNA から、ある遺伝子の発現量を間接的に測定できる方法であり、特に本研究の脳腫瘍標本のように、場合によってはごくわずかな標本しか入手できない時には有用な方法である^{30)~33)}。DNA メチルトランスフェラーゼの遺伝子は染色体第 19 番に存在する²³⁾³⁴⁾。その cDNA 配列はマウスのものが Bestor らによって 1988 年に決定され³⁴⁾、続いて 1992 年にヒトの cDNA 配列が Baylin らのグループによって決定された²⁾。DNA メチルトランスフェラーゼが CG 配列のシトシンをメチル化することにより遺伝子の発現調節をしていることは以前より明らかであったが、DNA メチルトランスフェラーゼ自信の発現調節機構や、本酵素と発癌の関係および腫瘍における働きはまだ一部がわかった程度であり、その全容は解明されていない^{36)~39)}。そもそも DNA メチルトランスフェラーゼは DNA のメチル化を維持するための酵素であるから、その遺伝子の発現は細胞周期に依存しており、細胞増殖が盛んであればその発現は促進される⁴⁰⁾⁴¹⁾。よって細胞分裂能の高い悪性のグリオーマで、本酵素がある程度増加しているのは当然のことかもしれない。しかしながら本酵素の発現量増加の程度は腫瘍によって様々で、わずかの増加しか示さないものから著明に増加しているものまであり²¹⁾²⁷⁾ 各腫瘍の増殖能と特に相関関係の認められないことから、単に増殖能の差のみを反映しているだけとは考えられない。更に正常大腸粘膜のように細胞分裂が非常に盛んと考えられる組織における本酵素の発現量はごくわずかで、腫瘍細胞の比ではないことも知られている²⁹⁾。また、本酵素の発現量の増加と腫瘍の悪性度との相関が明らかに示されたのは、現在までのところ Baylin らの報告した大腸癌²⁸⁾²⁹⁾ と本研究のグリオーマのみである。本研究ではいくつかの症例については増殖中の細胞に見られる核抗原 Ki-67 に対すモノクローナル抗体である MIB-1 の陽性率も調べ、DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現量と比較したが、必ずしも正の相関を示すわけではなかった。また MIB-1 陽性細胞をほとんど認めないものでも正常脳と比較すると明らかに DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現量は増加していたが、これは腫瘍の初期における変化の一つかもしれない。臨床的にグリオーマと診断されたものにも

様々な悪性度・分化度のものが存在する。WHO 分類³⁹⁾では4つの grade に分類されている。一般に膠芽腫 (WHO grade IV) は、最初から悪性のもので発生したものと、退形成性星状細胞腫 (WHO grade III) や星状細胞腫 (WHO grade II) から悪性化したものがあると考えられている。一方、同じ星状細胞に起源を持つものでも、毛様性星状細胞腫 (WHO grade I) の悪性化は稀であると言われている⁴⁰⁾。また、グリオーマは分子生物学的にも様々な遺伝子異常を呈する。頻度の多い遺伝子異常としては、癌抑制遺伝子 p53 変異や欠失、染色体 17p・10q・9p・19q のアレルの欠失 (loss of heterozygosity, LOH) や上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 遺伝子の増幅、MDM2 遺伝子の異常が報告されている^{41)~46)}。これらの異常を腫瘍の grade 別に整理すると、p53 の異常や 17p の LOH は比較的早期に起るらしく、10q や 9p の LOH は退形成性星状細胞腫から膠芽腫に悪性化する段階で、また EGFR 遺伝子の増幅は膠芽腫形成の比較的遅い時期に起こっているようである。Lang らはグリオーマ65例の分子生物学的検討により、悪性化への3つの経路を提唱している⁴⁶⁾。第1は進行経路 (progression pathway) で、もともと p53 遺伝子に変異を持っていたものが、もう一方の 17pLOH をおこしたために腫瘍化し、9p・13q・19q の LOH を経て悪性化し、第10染色体の LOH・EGFR 遺伝子の増幅・MDM2 遺伝子の増幅によって最も悪性となる経路である。第2は新経路 (de novo pathway) で、p53 遺伝子は正常であったが第10染色体・19q・17p・9p の LOH や EGFR 遺伝子の増幅を重ねて行くうちに悪性化するものである。第3は別経路 (alternate pathway) で、前者2経路以外の様々な LOH により悪性化するものである。このように、癌遺伝子の増幅・癌抑制遺伝子の異常・染色体の欠失といったいくつかの異常が多段階に作用し、腫瘍の発生や悪性化に関与していると考えられている。DNA メチルトランスフェラーゼの過剰発現がもたらした DNA メチル化の異常は、先に述べたように遺伝子発現抑制や点突然変異を引き起こし、遺伝子の不安定性 (genomic instability) をもたらす。グリオーマの初期の生物学的変化の一つとして DNA メチルトランスフェラーゼの発現増加が存在し、それによる DNA メチル化の異常が起れば、この変化は以後続いて発生する様々な遺伝子異常の原因若くは誘因の一つになっている可能性も十分ある。そして何らかの機序で DNA メチルトランスフェラーゼがさらに増加すると、DNA メチル化の異常とそれに伴う遺伝子異常が次々と惹起され、悪性度の高いグリオーマへと変化していくのかもしれない。例えば培養細胞系の実験で NIH3T3 細胞に DNA メチルトランスフェラーゼを強制発現させると細胞のトランスフォーメーションが誘導されることが既に報告されている⁴⁷⁾。通常は DNA メチル化の維持のみに働く DNA メチルトランスフェラーゼが過剰発現する機序および過剰発現した結果、新たに異常なメチル化をもたらす機序の解明は、腫瘍化シグナルの一端の解明でもあると考えられる。

本研究の結果、グリオーマにおいても DNA メチルトランスフェラーゼが過剰発現していることが明らかになり、本酵素がグリオーマの多様な遺伝子異常の誘因となっている可能性が示唆された。培養細胞系では、DNA メチル化の阻害剤である 5-アザシチジンを投与したり DNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子に対するアンチセンス DNA を発現させることによる腫瘍抑制効果が認められている⁴⁸⁾⁴⁹⁾。細胞分裂の起こらない神経細

胞では DNA メチルトランスフェラーゼは必要ないと考えられるので、グリオーマに対し、DNA メチルトランスフェラーゼアンチセンス DNA やアンチセンス DNA 発現ベクターを局所投与することによって、神経細胞には影響を及ぼさず、腫瘍細胞を選択的に抑制することができるかもしれない。また悪性度の低いグリオーマに投与することによって、悪性化を予防することができるかもしれない。これらの治療応用は、今後、動物実験で検証する必要がある。いずれにしても DNA メチルトランスフェラーゼの過剰発現と DNA のメチル化の異常は、個々の癌抑制遺伝子の発現抑制を一元的に説明できるもののひとつの可能性があり今後の研究が期待される。

結 論

グリオーマにおける DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現を、定量的 RT-PCR 法および組織内ハイブリダイゼーションを用いて検討した。

1. 正常脳およびグリオーマ摘出組織全例で、296塩基対 DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA 由来の増幅 DNA 断片を得た。

2. DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現量は星状細胞腫 (grade II) では正常脳の20倍から50倍、退形成性星状細胞腫 (grade III) では200倍から4500倍、膠芽腫 (grade IV) では800倍から2000倍と特に悪性度の高いもので過剰発現が認められた。星状細胞腫を良性、退形成性星状細胞腫および膠芽腫を悪性として比較すると、DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA の発現量に有為差を認めた。

3. DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA に対する RNA プロブを用いた組織内ハイブリダイゼーションの結果、定量結果に一致して悪性のグリオーマで強陽性のシグナルを認めた。

以上の結果から、グリオーマでは DNA メチルトランスフェラーゼ mRNA は良性のものでも発現しており、また悪性のもので過剰発現していることが示された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師金沢大学医学部脳神経外科山下純宏教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導いただいた金沢大学医学部脳神経外科林 裕先生ならびに諸先生方に深く感謝いたします。さらに、RT-PCR 法につき御教示いただいた金沢大学癌研究所化学療法部佐々木琢磨教授、遠藤良夫先生、滝野美佳先生、組織内ハイブリダイゼーション法につき御教示いただいた金沢大学第一解剖学教室沼田雅行先生、金沢大学遺伝子実験施設の皆様に深く御礼申し上げます。

尚、本研究の一部は第54回日本癌学会総会 (1995, 京都)、第54回日本脳神経外科総会 (1995, 名古屋)、第4回日本脳腫瘍カンファレンス (1995, 大津) にて発表した。

文 献

- Bestor, T., Hellewell, S. B. & Ingram, V. M.: Differentiation of two mouse cell lines is accompanied by demethylation of their genomes. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1800-1806 (1984).
- Yen, R. C., Vertino, P. M., Yu, J. J., El-Deiry, W., Kumaraswamy, A., Lennon, G. G., Trask, B. J., Celano, P. & Baylin, S.B.: Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic*

Acids Research, 20, 2287-2291 (1992).

- 3) Li, E., Beard, C. & Jaenisch, R.: Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366, 362-365 (1993).
- 4) Schwartz, M. N., Trautner, T. A. & Kornberg, A.: Enzymatic synthesis of DNA. *J. Biol. Chem.*, 237, 1961-1967 (1962).
- 5) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D.: *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., p448-453, Garland Publishing Inc., New York, 1994.
- 6) Bird, A. P.: CpG-rich island and the function of DNA methylation. *Nature*, 321, 209-213 (1986).
- 7) Lindahl, T.: DNA methylation and control of gene expression. *Nature*, 290, 363-364 (1981).
- 8) Wigler, M. H.: The inheritance of methylation patterns in vertebrates. *Cell*, 24, 285-286 (1981).
- 9) Tighman, S. M.: DNA methylation: a phoenix rises. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8761-8762 (1993).
- 10) Baylin, S. B.: Abnormal regional hypermethylation in cancer cells. *AIDS Res. Hum. Retrovirus*, 8, 811-820 (1992).
- 11) Ueda, T.: DNA methylation and inheritance of its pattern during embryogenesis. *The Tissue Culture*, 21, 135-141 (1995).
- 12) Shen, J., Rideout III, W. M. & Jones, P. A.: High frequency mutagenesis by a DNA methyltransferase. *Cell*, 71, 1073-1080 (1992).
- 13) Smith, S. S., Kaplan, B. E., Sowers, L. C. & Newman, E. M.: Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4744-4748 (1992).
- 14) Tornaletti, S. & Pfeifer, G. P.: Complete and tissue-independent methylation of CpG sites in the p53 gene: implications for mutation in cancers. *Oncogene*, 10, 1493-1499 (1995).
- 15) Gleeson, C. M., Sloan, J. M., McGuigan, J. A., Ritchie, A. J. & Russell, S. E. H.: Base transition at CpG dinucleotide in the p53 gene are common in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 55, 3406-3411 (1995).
- 16) Pieretti, M., Powell, D. E., Gallion, H. H., Conway, P. S., Case, E. A. & Turker, M. S.: Hypermethylation at a chromosome 17 "hot spot" is a common event in ovarian cancer. *Hum. Pathol.*, 26, 398-401 (1995).
- 17) Ribieras, S., Song, W. X., Martin, V., Lointier, P., Frappart, L. & Dante, R.: Human breast and colon cancers exhibit alteration of DNA methylation patterns at several DNA segments on chromosomes 11p and 17p. *J. Cell Biochem.*, 56, 86-96 (1994).
- 18) Makos, M., Nelkin, B. D., Lerman, M. I., Latif, F., Zbar, B. & Baylin, S. B.: Distinct hypermethylation patterns occur at altered chromosome loci in human lung and colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1929-1933 (1992).
- 19) Baylin, S. B., Hoppener, J. W. M., Bustros, A., Steenbergh, P. H., Lips, C. J. M. & Nelkin, B. D.: DNA methylation pattern of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res.*, 46, 2917-2922 (1986).
- 20) Tulchinsky, E., Grigorian, M., Tkatch, T., Georgiev, G. & Lukanidin, E.: Transcriptional regulation of the mst1 gene in human lymphoma cells: the role of DNA methylation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1261, 243-248 (1995).
- 21) Ottaviano, Y. L., Issa, J., Parl, F. F., Smith, H. S., Baylin, S. B. & Davidson, N. E.: Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 54, 2552-2555 (1994).
- 22) Falette, N. S., Fuqua, S. A. W., Chamness, G. C., Chesh, M. S., Greene, G. L. & McGuire, W. L.: Estrogen receptor gene methylation in human breast tumors. *Cancer Res.*, 50, 3974-3978 (1990).
- 23) Ohtani-Fujita, N., Fujita, T., Osifichin, N. E., Robbins, P. D. & Sakai, T.: CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene*, 8, 1063-1067 (1993).
- 24) Merlo, A., Herman, J. G., Mao, L., Lee, D. J., Gabrielson, E., Burger, P. C., Baylin, S. B. & Sidransky, D.: 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Medicine*, 1, 686-692 (1995).
- 25) Herman, J. H., Merlo, A., Mao, L., Issa, J. J., Davidson, N. E., Sidransky, D. & Baylin, S. B.: Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.*, 15, 4525-4530 (1995).
- 26) Gonzalez-Zulueta, M., Bender, C. M., Yang, A. S., Nguyen, T., Beart, R. W., Tornout, J. M. & Jones, P. A.: Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.*, 15, 4531-4535 (1995).
- 27) Kautinainen, T. L. & Jones, P. A.: DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J. Biol. Chem.*, 261, 1594-1598 (1986).
- 28) El-Deiry, W. S., Nelkin, B. D., Celano, P., Yen, R. C., Falco, J. P., Hamilton, S. R. & Baylin, S. B.: High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3470-3474 (1991).
- 29) Issa, J. J., Vertino, P. M., Wu, J., Sazawal, S., Celano, P., Hamilton, S. R. & Baylin, S. B.: Increased cytosine DNA methyltransferase activity during colon cancer progression. *Journal of the National Cancer Institute*, 85, 1235-1240 (1993).
- 30) Wang, A. M., Doyle, M. V. & Mark, D. F.: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9717-9721 (1989).
- 31) Fuqua, S. A. W., Falette, N. F. & McGuire, W. L.: Sensitive detection of estrogen receptor RNA by polymerase chain reaction assay. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 858-861 (1990)

- 32) Murphy, L. D., Herzog, C. E., Rudick, J. B., Fojo, A. T. & Bates, S. E.: Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry*, **29**, 10351-10356 (1990).
- 33) Fuqua, S. A. W., Fitzgerald, S. D. & McGuire, W. L.: A simple polymerase chain reaction method for detection and cloning low-abundance transcriptions. *Biotechnology*, **9**, 206-211 (1990).
- 34) Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. & Ingram, V.: Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. *Mol. Biol.*, **203**, 971-983 (1988).
- 35) Kleihues, P., Burger, P. C. & Scheithauer, B. W.: *Histological Typing of Tumors of the Central Nervous System*, 2nd ed., p11-30, Springer-Verlag, Berlin, 1991.
- 36) Leonhardt, H. & Bestor, T. H.: Structure, function and regulation of mammalian DNA methyltransferase. *In* J. Jost & H. Saluz (eds.), *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*, 1st ed., p109-119, Birkhauser Verlag Base, Switzerland, 1993.
- 37) Bestor, T. H. & Verdine, G. L.: DNA methyltransferase. *Current Opinion in Cell Biology*, **6**, 380-389 (1994).
- 38) Rouleau, J., MacLeod, A. R. & Szyf, M.: Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-AP-1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **270**, 1595-1601 (1995).
- 39) Brqndels, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A. & Cedar, H.: Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*, **371**, 435-438 (1994).
- 40) Leonhardt, H., Page, A. W., Weier, H. & Bestor, T. H.: A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, **71**, 865-873 (1992).
- 41) Blow, J. J.: Methyltransferase in foci. *Nature*, **361**, 684-685 (1993).
- 42) Russell, D. S. & Rubinstein, L. J.: *Pathology of Tumors of the Nervous System*, 5th ed., p129-132, p224-226, Williams & Wilkins, Baltimore, 1989.
- 43) Okazaki, H.: *Fundamentals of Neuropathology. Morphological Basis of Neurological Disorders*, 2nd ed., p205-207, Igaku-Shoin Medical, New York, 1989.
- 44) Schwartz A. M. & Ghatk, N. R.: Malignant transformation of benign cerebellar astrocytoma. *Cancer*, **65**, 333-336, 1989.
- 45) Szenasy, J. & Slowik, F.: Progression of benign cerebellar astrocytomas in children. *Childs Brain*, **10**, 39-47, 1992.
- 46) Lang, F. F., Miller, D. C., Koslow, M. & Newcomb, E. W.: Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J. Neurosurg.*, **81**, 427-436 (1994).
- 47) Wu, J., Issa, J., Herman, J., Bassett, D. E., Nelkin, B. D. & Baylin, S. B.: Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8891-8895 (1993).
- 48) Rainier, S. & Feinberg, A. P.: Capture and characterization of 5-aza-2'-deoxycytidine-treated C3H/10T1/2 cells prior to transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6384-6388 (1988).
- 49) MacLeod, A. R. & Szyf, M.: Expression of antisense to DNA methyltransferase mRNA induces DNA demethylation and inhibits tumorigenesis. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8037-8043 (1995).

High Expression of DNA Methyltransferase Gene in Human Astrocytic Tumors Yoshie Okada, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **105**, 94—101 (1996)

Key words glioma, DNA methyltransferase, CpG methylation, quantitative RT-PCR, *in situ* hybridization

Abstract

To characterize one of the genetic events underlying the development of astrocytic tumor, the relationship between the grade of astrocytic tumor and the expression of DNA methyltransferase gene was examined. The levels of DNA methyltransferase mRNA were studied by quantifying gene expression in small samples of RNA, in surgical specimens of 12 astrocytic tumors (four astrocytomas, six anaplastic astrocytomas and two glioblastomas), four glioma cell lines and two normal brain tissues. In comparison to normal brain tissues, the levels of DNA methyltransferase mRNA were 16- to 55-fold higher in low grade astrocytomas, significantly (80- to 450-fold increased in high grade astrocytomas (anaplastic astrocytomas and glioblastomas) and strikingly (more than 450-fold) increased in glioma cell lines. Using *in situ* hybridization with paraffin-embedded surgical specimens of human astrocytic tumors, DNA methyltransferase mRNA was abundantly expressed in high grade astrocytomas. Thus, it was demonstrated that DNA methyltransferase gene not only expressed in low grade astrocytomas but also expressed prominently in anaplastic astrocytomas and glioblastomas. These prominent expressions of DNA methyltransferase gene may alter DNA methylation patterns and play a role in the genetic instability of human astrocytic tumors.