

Aberrant DNA methylation and cancer

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/2297/17251

【総説】

DNAメチル化の異常とがん

Aberrant DNA methylation and cancer

金沢大学がん研究所・分子標的がん医療研究開発センター
腫瘍制御研究分野

川 上 和 之

はじめに

がんはジェネティックおよびエピジェネティックな異常の蓄積により発生することが明らかとなっている。前者はDNA配列上の変異であり、異常な配列情報とその表現型が細胞分裂後も保持され、がん形質を維持していることは容易に理解できる。一方後者は、塩基配列に依存しない表現型の遺伝様式として総称される。その本体は未だ不明な部分が多いが、DNAのメチル化とヒストン蛋白の修飾が中心的役割を担っていると考えられる。エピジェネティックな調節異常によりがん固有の遺伝子発現パターンが形成され、細胞世代を超えて継承される結果、がん形質が維持されている。本稿では、特にDNAメチル化の異常とがんの関連に焦点を絞り概説する。

1. DNAメチル化の異常による遺伝子発現、染色体構造の変化
メチル化シトシンは1948年にウシ胸腺ゲノムDNAから発見されたが、その生理的意義は長らく不明であった。シトシンの5位炭素へメチル基が付加されたものが5-メチルシトシン分子であり、ゲノムDNAではシトシン塩基の次にグアニン塩基が続くCpG配列中に認められる。ほ乳類のゲノムDNAにおけるCpG配列はランダムに出現した場合の期待数の約1/5程度しか存在しない。一方で、CpGアイランドと呼ばれるCpGが密に存在する領域が主に遺伝子のプロモーター領域に認められ、遺伝子発現における役割が予想されていた。1990年代に入り、がん抑制遺伝子でのプロモーター領域CpGアイランドのDNAメチル化と遺伝子発現の関連が報告され、DNAメチル化の異常とがんの関連が広く知られるようになった。遺伝子プロモーター領域のCpGアイランドにおいてはDNAメチル化が発現のスイッチとして機能しており、非メチル化の状態では遺伝子発現が認められるが、高度のメチル化により遺伝子発現は抑制される(図1)。大腸がんではp16(CDKN2A), hMLH1, APCなどのがん抑

制遺伝子プロモーター領域に高頻度のDNAメチル化が認められている。それぞれの遺伝子発現抑制が遺伝子変異の蓄積や異常な細胞増殖につながり、癌化を誘発していると考えられる(図2)。がん抑制遺伝子の不活化機構として突然変異と染色体欠失が知られていたが、複数の癌腫におけるDNAメチル化の解析により、一部のがんではむしろプロモーター領域における局所的なDNAの高メチル化が抑制遺伝子不活化の主要な機構であることが明らかとなった。

遺伝子プロモーター領域のCpGアイランドにおけるDNAメチル化と遺伝子発現の関連は機構として理解しやすく、多くの研究がなされている。しかし、がんではプロモーター領域における局所的な高メチル化の一方で、ゲノム全体の低メチル化が高頻度に観察される。ゲノム全体の低メチル化に関してはその研究数が絶対的に少なく、未だ癌化との関連において明確な説明は得られていないが、1つの機序としてLINE, Aluなどの繰り返し配列の関与が指摘されている。これらの配列はトランスポゾンとして知られ、ゲノム上での位置を転移することができる配列であることから転位因子とも呼ばれる。トランスポゾンは進化の過程でウイルス起源の配列がゲノム中に寄生したものと考えられている。LINE, Alu配列はCpG部位に富み、ゲノム中の非遺伝子領域に反復して出現するが、正常細胞ではDNAメチル化によりトランスポゾンの転移は抑制されている。がんではこれらの配列が低メチル化状態になり、トランスポゾンの転移が活性化されると同時にゲノム全体の低メチル化が観察されると考えられている。トランスポゾンの活性化はゲノムの切断や組み換えを誘発するためゲノムの不安定化を招き、癌化を促進すると理解される(図2)。しかし、これらの関連は主に培養細胞を用いて観察されたものであり、実際の臨床的ながんで同様の機序が存在するのか、今後さらなる検討が必要である。

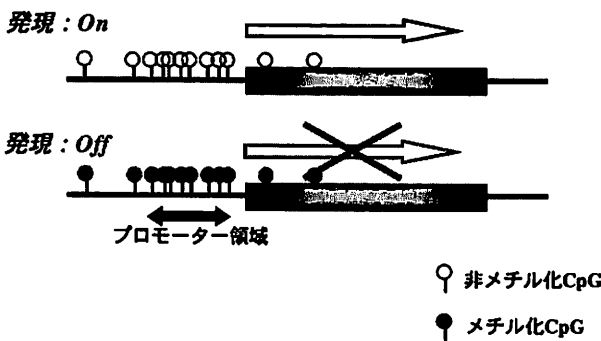


図1. プロモーター領域のDNAメチル化による遺伝子発現制御

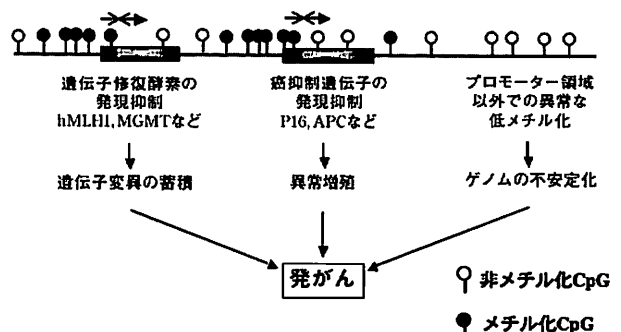


図2. 発がんにおけるDNAメチル化異常の関与

2. DNAメチル化異常の獲得機序

プロモーター領域でのDNAメチル化による遺伝子発現の調節機構には、ヒストンの化学修飾や転写因子のリクルートが複雑に相互関連している。その機構を非常に単純化して図3に示す。転写が活性化した染色体領域ではDNAは非メチル化の状態であり、同時にヒストンはアセチル化を受け、クロマチン構造が緩んだユークロマチン構造をとる。このような状態であれば容易に転写因子がリクルートされ遺伝子が発現する。一方、DNAがメチル化された領域ではヒストンの脱アセチル化が起こり、クロマチン構造が凝縮したヘテロクロマチン構造となる。このような状態では転写因子をリクルートできず、遺伝子発現は抑制される。ヒストンの修飾にはアセチル化以外にメチル化、リン酸化、SUMO化などが知られ、さらに複雑な調節を受けている。このように、遺伝子発現の活性化と抑制に伴ってクロマチンの構造が変化するが、DNAメチル化、ヒストン修飾、転写因子のそのいずれれもが状態変化の誘導因子となり得るため、何が原因で何がその結果なのかは一概に記述できない状況である。例えば、DNAメチル化によりヒストン脱アセチル化酵素がリクルートされ、その結果ヒストンが脱アセチル化を受けるとの報告、すなわち、DNAメチル化がヒストンの脱アセチル化に先行するとの報告がある。その一方で、ヒストンの脱アセチル化がDNAメチル化に先行して観察されるとの報告もある。また、転写因子の持続的な不足がヘテロクロマチン構造の誘導に関与し、その結果、受動的にDNAメチル化が起こるとの報告も認められる。このように、遺伝子プロモーター領域におけるDNAメチル化の獲得は、ヒストンの化学修飾や転写因子のリクルートと相互に関連・影響し、複数の連鎖反応がその時々

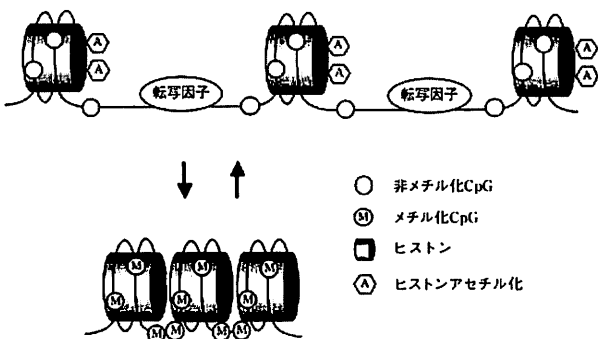


図3. DNAメチル化とクロマチン構造の変化

において使い分けられている様である。がんにおいて、何がトリガーとなってがん抑制遺伝子のDNAメチル化、ヒストン脱アセチル化が固定されるのかは未だに解決されていないが、一旦固定されたDNAメチル化は細胞世代を超えて継承される。その機序は、DNA複製後のヘミメチル化 (2本鎖のDNAで、一方にのみメチル化が存在する状態) 部位をDNAメチル化酵素であるDNMT1が認識し、速やかにメチル化する機能によると考えられる (図4)。

クロマチンレベルでの複雑な調節機構の異常によりがん抑制遺伝子のDNAメチル化が獲得されると考えられるが、単一細胞におけるDNAメチル化の獲得から臨床的ながんに至るまでの過程では、細胞内外の環境因子もDNAメチル化の維持に重要である。このような因子の1つとして葉酸代謝が予想される (図5)。実際、我々は大腸がん組織内の葉酸量としてtetrahydrofolate (THF)とmethylenetetrahydro folate (methyleneTHF)を測定し、複数のプロモーター領域CpGアイランドに高メチル化が認められるがんでは、組織内の葉酸量が多いことを報告した⁹⁾。後述するCpG island methylator phenotype (CIMP)陽性の大腸がんは複数の遺伝子プロモーター領域に共通してDNAメチル化を認めるがんとして定義される。したがって、CIMP陽性大腸がんは組織内に高濃度の葉酸を保持していると示唆される。葉酸は細胞内でメチル基の蓄積・運搬・供与体として機能しており、その質的・量的変化が少なからずDNAメチル化に影響を与えているものと考えられる。このことは、食事や薬剤による葉酸供給の調節によりある種のがんを治療・予防できる可能性を示唆しており、臨床的に興味深い。

プロモーター領域でのDNAメチル化に比較して、ゲノム全体の低メチル化の発生機序に関する研究は少なく、その詳細は不明である。がんではプロモーター領域における局所的な高メチル化と、ゲノム全体の低メチル化が同時に観察されているこ

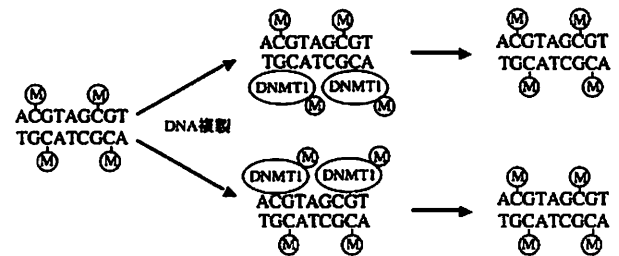


図4. DNAメチル化の細胞世代を超えた維持機構

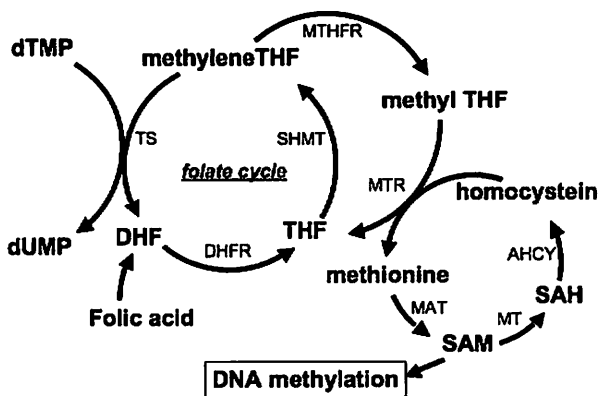


図5. 葉酸代謝とDNAメチル化の関連

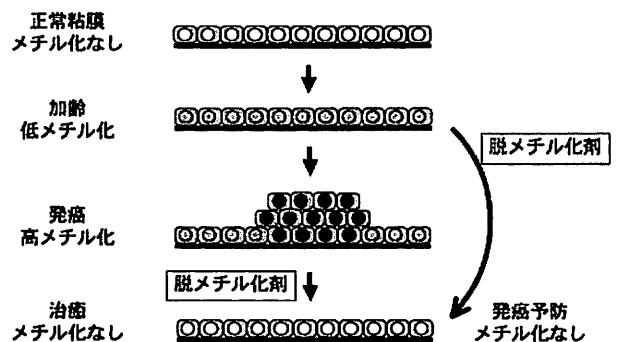


図6. 脱メチル化剤による癌治療・予防

とから、その機序も相互に関連すると予想されていた。ところが、大腸がんを対象とした複数の研究で、プロモーター領域DNAメチル化の程度とゲノム全体の低メチル化の程度に相関は認められず、現在ではそれぞれに独立した機序であると考えられるに至っている。しかし、最近我々は正常大腸粘膜組織ではこの両者間に相関を認め、さらに加齢に伴いプロモーター領域DNAメチル化は高く、ゲノム全体のメチル化は低くなることを観察した⁹⁾。このことは、正常細胞におけるプロモーター領域メチル化とゲノム全体のメチル化は相互に協調した調節を受ける一方で、癌化によりその協調性が消失することを示している。プロモーター領域のメチル化は癌化の過程において固定・維持されると考えられており、これに対しゲノム全体のメチル化は癌化の過程で比較的不安定なのかもしれない。

3. DNAメチル化異常の診断的意義

DNAメチル化の臨床応用として、がんの存在診断や個性診断への利用が考えられている。DNAのメチル化はメチル化特異的PCRにより高感度に検出可能である。このため、正常細胞由来の非メチル化DNAが多量に存在するような検体においても微量のがん細胞由来のメチル化DNAを検出可能である。具体的な検体としては、癌患者から採取した血液、喀痰、尿、便中などからDNAを抽出して異常なDNAメチル化を検出できたとの報告がみられる。我々もDNAメチル化解析の初期において、食道がん患者の血液中に存在する遊離DNAから癌由来と考えられるAPC遺伝子プロモーター領域の高メチル化を検出し、癌患者の予後との関連を報告した⁹⁾。しかし、その後大腸癌においても同様の検討を行ったが、異常なDNAメチル化の検出率は低く、臨床応用できる程度のものではなかった。食道癌は比較的浸潤性に増殖し、進行したものが多いのに対し、大腸癌は限局性に増殖し、病期の進んでいないものが多いことがその一因と考えられる。比較的早期の癌においても検出可能な診断技術として確立するためには、適切な対象遺伝子の探索と、より高感度な検出技術の開発が不可欠であると考えられる。

遺伝子の発現レベルが癌の性質を規定している場合があるのと同様に、DNAメチル化の有無やその程度が癌患者の予後や治療感受性などのがん個性に関連している場合があると考えられる。このような考えに基づき、我々はp16(CDKN2A)やMYOD1のメチル化と大腸癌の予後との関連を観察してきた^{9a)}。しかし、単一遺伝子のメチル化で癌の性質を決定することは不可能であり、複数の遺伝子のメチル化パターンから癌の個性を決定することが望ましい。大腸癌では複数の遺伝子プロモーター領域に共通してDNAメチル化を認めるCIMPが提唱されている。CIMPの存在自体に否定的な報告もあり、DNAメチル化の解析方法や解析対照とする遺伝子により異なる結果が得られていると推測されていた⁷⁾。最近、大規模な遺伝子プロモーター領域DNAメチル化解析の結果CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1がマーカー遺伝子として選択され、CIMP陽性癌の存在も確定的となった⁹⁾。CIMP陽性癌は右側結腸に多く、ムチン産生腫瘍や低分化型腺癌の頻度が高く、BRAF変異を高頻度に伴う特徴を有する⁹⁾。また、CIMP陽性癌は前述したように、組織内に高濃度の薬酸を保持していると考えられ、5-FUに対し高感受性を有すると予測される。CIMPの判定によりオーダーメイド化学療法が構築できる可能性もあると考えている。

DNAメチル化は癌化の前段階から認められる場合があり、がんのリスク診断に応用できる可能性がある。我々は、大腸がん

患者から得たがん組織と対照正常粘膜組織を解析し、CIMP陽性がん患者の正常粘膜組織にはCIMP陰性がん患者の正常粘膜組織に比較して高いレベルのプロモーター領域DNAメチル化が認められることを報告した¹⁰⁾。今後さらに非胆がん患者の正常粘膜を解析する必要はあるが、正常粘膜のDNAメチル化解析によりCIMP癌の発症前診断が可能になるかもしれない。

4. DNAメチル化異常のがん治療・予防への応用

DNAメチル化は可逆的な変化であることから、がん治療・予防薬の開発に期待が寄せられている(図6)。DNAメチル化により発現抑制されている癌抑制遺伝子を脱メチル化剤投与により再発現させるとのコンセプトである。脱メチル化剤として複数の薬剤が開発され、すでに臨床試験が行われているものも多い。今後多くの脱メチル化剤が臨床応用されてくると考えられるが、現在臨床開発中の薬剤はいずれもDNA配列非特異的な脱メチル化剤であり、癌抑制遺伝子の脱メチル化と再発現を誘導すると同時に、正常ではメチル化を受けているトランスポソンの脱メチル化と活性化をも誘導することが危惧される。脱メチル化剤の長期投与による有害事象の解析と、より配列特異的な脱メチル化剤の開発が望まれる。また、前述したようにDNAメチル化は形態学的には正常な組織においてもすでに認める場合があり、がんの発症前診断とともに、このような症例に対しては脱メチル化剤による発癌予防も可能になると考えられる。

おわりに

DNAメチル化の異常とがんの関連を概説するとともに、我々の研究の一部を紹介した。DNAメチル化は、がんだけでなく個体発生や細胞分化など生物学的に興味深い現象と密接な関わりを持つ。また、がんの予防・診断・治療のすべての領域でDNAメチル化の特徴を利用可能であり、臨床的にも応用範囲の広い現象であることを感じ取っていただければ幸いである。DNAメチル化は可逆的な変化であることから、これをターゲットとしたがん治療薬が積極的に臨床開発・導入されてくるであろう。しかし、臨床的ながん組織内でのDNAメチル化獲得・維持のメカニズムはまだ不明な部分が多く、DNAメチル化をターゲットとした薬剤を適正かつ理論的に使用できるようさらなる解析が必要である。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、金沢大学大学院医学系研究科心臓病態制御学、金沢大学がん研究所腫瘍制御学において多くの大学院生、教室員の協力により行われ、西オーストラリア大学腫瘍学との共同研究により達成されたものです。ここにお礼申し上げます。

文 献

- 1) Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415-428, 2002
- 2) Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Watanabe G, Iacopetta B. The Folate Pool in Colorectal Cancers Is Associated with DNA Hypermethylation and with a Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase. *Clin Cancer Res* 9: 5860-5865, 2003
- 3) Iacopetta B, Grieco F, Phillips M, Ruszkiewicz A, Moore J, Minamoto T, Kawakami K. Methylation levels of LINE-1 repeats and CpG island loci are inversely related in normal colonic

mucosa. *Cancer Sci* in press

- 4) Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ, Yin J, Fleisher AS, Abraham JM, Beer DG, Sidransky D, Huss HT, Demeester TR, Eads C, Laird PW, Ilson DH, Kelsen DP, Harpole D, Moore MB, Danenberg KD, Danenberg PV, Meltzer SJ. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 92: 1805-1811, 2000
- 5) Maeda K, Kawakami K, Ishida Y, Ishiguro K, Omura K, Watanabe G. Hypermethylation of the CDKN2A gene in colorectal cancer is associated with shorter survival. *Oncol Rep* 10: 935-938, 2003
- 6) Hiranuma C, Kawakami K, Oyama K, Ota N, Omura K, Watanabe G. Hypermethylation of the MYOD1 gene is a novel prognostic factor in patients with colorectal cancer. *Int J Mol Med* 13: 413-417, 2004
- 7) Iacopetta B, Grieu F, Li W, Ruzskiewicz A, Caruso M, Moore J, Watanabe G, Kawakami K. APC gene methylation is inversely correlated with features of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int J Cancer* 119: 2272-2278, 2006
- 8) Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38: 787-793, 2006
- 9) Li WQ, Kawakami K, Ruzskiewicz A, Bennett G, Moore J, Iacopetta B. BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer* 5: 2, 2006
- 10) Kawakami K, Ruzskiewicz A, Bennett G, Moore J, Grieu F, Watanabe G, Iacopetta B. DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 94: 593-598, 2006