

<特集「エピジェネティクスと疾患」>

癌とエピジェネティクス

曾和 義広, 酒井 敏行

京都府立医科大学大学院医学研究科分子標的癌予防医学*

Epigenetic Mechanisms for Carcinogenesis

Yoshihiro Sowa and Toshiyuki Sakai

Department of Molecular-Targeting Cancer Prevention

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

抄 録

様々な疾患とゲノムの関係においては, genetic な遺伝子情報だけでなく, epigenetic な遺伝子情報が強く関与することから, エピジェネティクス研究が精力的に進められることとなった. 発癌は, 癌遺伝子及び癌抑制遺伝子の異常により発生する遺伝子の疾患であることは広く受け入れられている事実であるが, エピジェネティクス研究の成果により, 塩基配列の変異や欠失による genetic な遺伝子異常だけでなく, メチル化に代表される塩基への修飾による epigenetic な遺伝子異常によっても発癌することが明らかとなってきた. 癌とエピジェネティクス研究の歴史やその成果を踏まえ, epigenetic な異常による発癌機構と, それを標的とした治療方法の開発について述べる.

キーワード: Epigenetic, DNA のメチル化, ヒストンの修飾.

Abstract

In correlation between genome and various diseases, not only genetic information but also epigenetic information is strongly involved. Therefore, epigenetic research has been energetically promoted in life science research. Cancer is known to be a genetic disease, which is caused by abnormalities of oncogenes and tumor-suppressor genes. Genetic abnormalities mean mutation, deletion or amplification of DNA sequences. In addition to genetic abnormalities, epigenetic abnormalities, represented by DNA methylation also cause cancer. Based on the results of the research and the history of epigenetics in malignant tumors, we refer epigenetic mechanisms for carcinogenesis and the idea for the development of molecular-targeting therapy.

Key Words: Epigenetic, DNA methylation, Histone modification.

はじめに

2003年4月14日にヒトゲノムプロジェクトの終了が宣言されたことにより、それまで精力的に実施されてきたゲノム研究は一段落した。そして、ゲノム研究に引き続くポストゲノム研究として、プロテオミクス研究やバイオインフォマティクス研究が盛んになったが、疾患や生命現象とゲノムの関係においては、geneticな遺伝子情報だけでなく、epigeneticな遺伝子情報も強く関与することから、エピジェネティクス研究もまた精力的に進められることとなった。

発癌は、癌遺伝子及び癌抑制遺伝子の異常により発生する遺伝子の疾患であることは広く受け入れられている事実であるが、エピジェネティクス研究の成果により、塩基配列の変異、欠失によるgeneticな遺伝子異常だけでなく、塩基への修飾によるepigeneticな遺伝子異常によっても発癌することが明らかとなってきた。

これらepigeneticな遺伝子への影響は、主に遺伝子の転写制御機構に作用すると考えられており、実際、epigeneticな遺伝子制御機構としては、ゲノムDNAのメチル化修飾と、ゲノムDNAと複合体を形成するヒストンタンパク質のアセチル化修飾やメチル化修飾に大別される。本稿では前者を中心に、本学発の成果も含め述べることにする。

癌とDNAのメチル化

ヒト癌と遺伝子へのepigeneticな影響の関係が示唆されたのは、1983年に大腸癌組織でDNAの「低メチル化」が生じていることが報告されたのが最初である¹⁾。その後も、様々な癌組織でのDNAの「低メチル化」が見出されることから、発癌と低メチル化の間には因果関係が存在することが示唆された。さらに、DNAの低メチル化は遺伝子発現を活性化させることから、DNAの低メチル化により癌遺伝子の発現が増強し、その結果として発癌に至るといふ仮説が立てられた。例えば、原癌遺伝子であるH-RAS遺伝子の低メチル化等が報告されたが²⁾、

それらは必ずしも、DNAの低メチル化による遺伝子発現の増強が発癌の原因となりうることを説明できるものではなかった。

1986年、肺小細胞癌のマーカーであったcalcitonin遺伝子において、DNAの「高メチル化」とその発現抑制が報告されたことから³⁾、癌におけるDNAの「高メチル化」に対する注目も集まった。しかし、calcitoninは癌抑制遺伝子ではなかったため、DNAの高メチル化による遺伝子の発現抑制が発癌の原因となる証明にはならなかった。

そして1991年、本総説共著者の酒井らが、留学先であったハーバード医科大学Dryja准教授の研究室において、散発性の網膜芽細胞種において、網膜芽細胞種の単一の原因遺伝子であり、また代表的な癌抑制遺伝子であるRB遺伝子のプロモーター領域が高メチル化していることを報告した⁴⁾。これは、癌抑制遺伝子の高メチル化が発癌に寄与していることを示唆する報告であった。しかしながら、RB遺伝子プロモーター領域の高メチル化が発癌の原因である証明にはならなかった。酒井らは、帰国後もこの研究を続け、高メチル化されたRB遺伝子プロモーターは、主要転写因子が解離することによりそのプロモーター活性が著しく減少することを見出し報告した⁵⁾。すなわち、この結果は、癌抑制遺伝子であるRB遺伝子が高メチル化を受けることで、その遺伝子発現が抑制され、その結果、RB遺伝子が量的に不活性化され発癌することを証明しており、DNAの高メチル化が発癌の原因であることを直接証明した最初の報告となった(図1)。

発癌における質的異常と量的異常

当時、RBやp53に代表される癌抑制遺伝子の不活性化機構に関しては、そのタンパク質コード領域における塩基変異による、まさにgeneticな発癌機構が世界中で精力的に実施されていたが、上記の一連の研究は、DNAのメチル化というepigeneticな発癌機構を解明するものであった。また酒井らは、この報告⁵⁾以前に、網膜芽細胞種が、RB遺伝子プロモーター領域の塩基

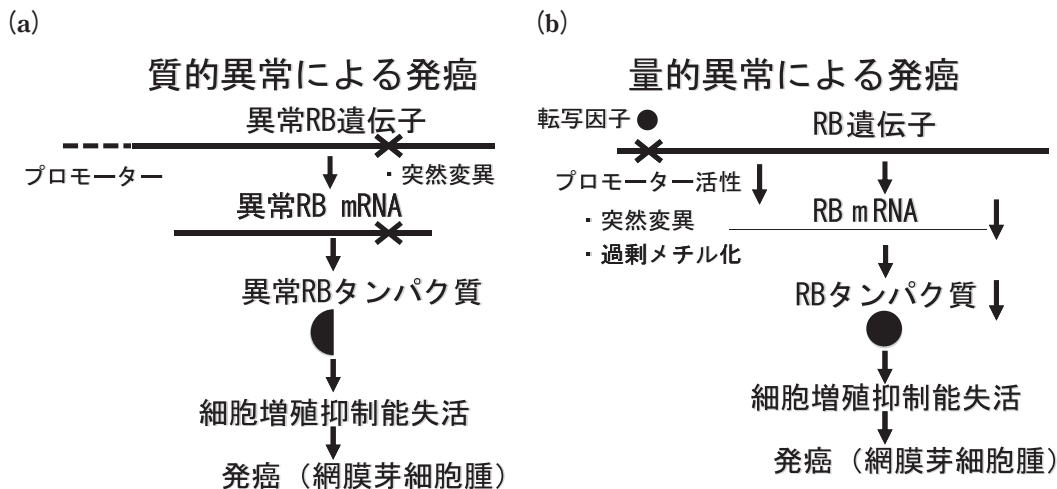


図1 発癌における質的

変異によりプロモーター活性が低下し、その結果、量的に不活性化され、発癌することを証明しており⁶⁾、これらの成果は、癌抑制遺伝子の「質的異常」だけでなく、「量的異常」(プロモーター領域の変異や高メチル化による活性低下と、その結果生じる発現低下)も、発癌機構に重要であるとの視点を与える成果となった(図1)。

その後、RB 遺伝子の高メチル化に引き続き、同じく癌抑制遺伝子である p16 遺伝子の高メチル化も報告されたが⁵⁷⁾⁸⁾、p16 遺伝子は、CDK 阻害分子として RB を脱リン酸化状態にすることで活性化に働くことから、p16 遺伝子の高メチル化は、p16 の発現低下による CDK 活性の増強を引き起こし、その結果、RB の不活性化を介し

た発癌機構を示すこととなった。

また RB や p16 以外にも p14^{ARF}、DNA のミスマッチ修復に働く hMLH1、von Hippel-Lindau (VHL)、E-cadherin のプロモーター領域における高メチル化が、癌組織や癌細胞で見出されている(表1)。

すなわち、癌における DNA の異常メチル化には、当初見出されたようにゲノムワイドな DNA の低メチル化と、特異的遺伝子に対する DNA の高メチル化があると考えられている(表2)。

DNA 異常メチル化の分子機構

DNA のメチル化に働く酵素であるメチルトランスフェラーゼは、DNMT1、DNMT3a、

表1 癌細胞で高メチル化を受ける遺伝子

遺伝子	遺伝子の役割
RB	細胞周期
p16	細胞周期
p14 ^{ARF}	細胞周期、アポトーシス
hMLH1	DNA 修復
VHL	血管新生
E-cadherin	細胞接着

表2 正常細胞と癌細胞のDNAメチル化パタンの違い

	正常細胞	癌細胞
ゲノム全体	メチル化	低メチル化
特異的遺伝子（癌抑制遺伝子等）のプロモーター領域	低メチル化	高メチル化

DNMT3bなどが知られており、DNMT3a及びDNMT3bは、新規にDNAにメチル基を導入する機能を有しており、DNMT1はDNAのメチル化状態をDNA複製時に維持する機能を有する分子と考えられている。DNMT1の発現が、癌組織において亢進していることから⁹⁾、DNMT1発現量と部位特異的な高メチル化との因果関係が注目されるが、未だに結論には至っていない。またこれらメチル基転移酵素に対して、脱メチル化酵素の存在も予想されてはいるが、未だに特定されておらず、癌におけるDNAの異常メチル化の原因は、今なお未知な点が多く存

在する。

癌とヒストン修飾

DNAの高メチル化が発癌の原因とされるメカニズムに関しては、上述のように、癌抑制遺伝子に代表される特定遺伝子のプロモーター領域が高メチル化され、その結果、転写因子のプロモーター領域への結合が阻害されたり、あるいは転写抑制複合体がメチル化されたプロモーター領域に結合することで、その遺伝子の発現が抑制されることにある（図2）。すなわちepigeneticな変化は、「転写発現」に影響を及ぼ

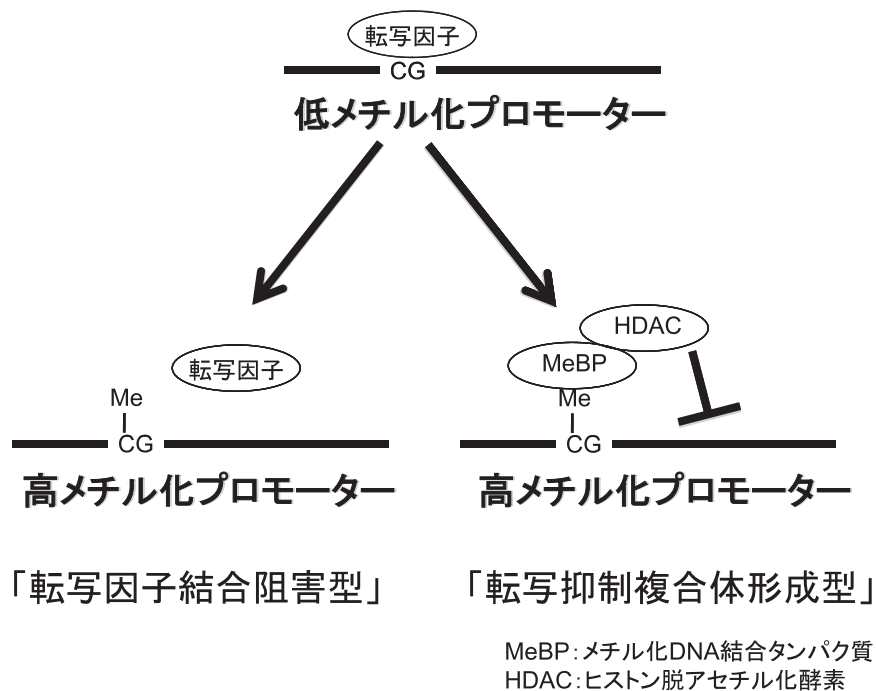


図2 DNAの高メチル化による転写抑制機構

すと考えられている。

もう一つの epigenetic な変化は、DNA と複合体を形成するヒストンタンパク質の翻訳後修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化）であるが、このヒストンのアセチル化メチル化及びリン酸化も、クロマチン構造の制御を介して、やはり「転写発現」に影響を及ぼすことが分かっている。

microRNA と epigenetics

DNA の異常メチル化やヒストンの修飾が転写発現に影響を及ぼすことは上述した通りであるが、その転写発現される分子には、従来のタンパク質をコードする mRNA だけでなく、non-coding RNA もまた同様の機構により調節されている。Non-coding RNA の中でも、microRNA と呼ばれる RNA は、標的となる mRNA の 3'-UTR 領域に結合することで、標的 mRNA の翻訳阻害や、あるいは siRNA と同様に mRNA の切断に寄与することで、標的分子の発現制御に関与していることが明らかとなり、近年の生命科学研究所の大きなトピックスとなっている。従って、この microRNA も epigenetic な発現制御を受けていることが予想され、実際に癌で高メチル化により発現が低下している microRNA として、miR-127 や mir-34b/c が報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。今後は、mRNA だけでなく、microRNA の発現に対する異常メチル化の影響も、epigenetic な発癌機構の解明には注目する必要がある。

高メチル化による発癌に対する治療法

DNA のメチル化に働く DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) に対する阻害剤は、DNA が高メチル化することによる遺伝子の発現抑制を再活性化することで抗腫瘍効果を示すことが

予測され、米国では既に、5-アザシチジン (Vidaza) 及び 5-アザ-2'-デオキシシチジン (デシタピン, Dacogen) が、FDA から承認されている。5-アザシチジン、デシタピンとも、骨髄異形成症候群に対する適用である。

また DNA の高メチル化による遺伝子発現の抑制の分子機構の一つに、高メチル化した DNA に転写抑制複合体が結合することが知られており、この転写抑制複合体を構成する因子であるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が、転写抑制に働くことが分かっていることから¹²⁾¹³⁾ (図 2)、HDAC 阻害剤によっても、高メチル化された DNA からの発現抑制が再活性化することが示唆され、実際、その効果は、DNMT 阻害剤と HDAC 阻害剤を組み合わせることで更に増強することが報告されている¹⁴⁾。現在、米国で認可されている HDAC 阻害剤である SAHA (ポリノスタット, Zolinza) や、抗癲癇薬として既に広く使用されており HDAC 阻害活性が認められた¹⁵⁾、バルプロ酸を用いた高メチル化による転写抑制が発癌の原因となっている癌への治療法が試みられている。

おわりに

genetic な異常だけでなく、epigenetic な異常による発癌の分子機構を説明し、その epigenetic 異常による発癌に対しての治療も既に始まってきていることを紹介したが、このような epigenetic 異常による発癌は、文字通り「後天的」な発癌の分子機構であることから、治療研究だけでなく、epigenetic 異常を引き起こす環境的要因やその予防法を研究することは、今後の癌予防研究を考える上では極めて重要な課題である。

文 献

- 1) Feinberg AP & Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301: 89-92.
- 2) Feinberg AP & Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 111: 47-54.
- 3) Baylin SB, Höppener JW, de Bustros A, Steenbergh PH, Lips CJ, Nelkin BD. DNA methylation patterns of

- the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res* 1986; 46: 2917-2922.
- 4) Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 880-888.
 - 5) Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD, Sakai T. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene* 1993; 8: 1063-1067.
 - 6) Sakai T, Ohtani N, McGee TL, Robbins PD, Dryja TP. Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene. *Nature* 1991; 353:83-86.
 - 7) Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA. 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* 1995; 55: 4531-4535.
 - 8) Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Med* 1995; 1: 686-692.
 - 9) Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, Kitano S, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol* 2004; 164: 689-699.
 - 10) Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006; 9 :435-443.
 - 11) Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 4123-4132.
 - 12) Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genet* 1998; 19: 187-191.
 - 13) Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl- CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-389.
 - 14) Cameron EE, Bachman KE, My-h-nen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999; 21: 103-107.
 - 15) Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 2001; 276: 36734-36741.

著者プロフィール



曾和 義広 Yoshihiro Sowa

略 歴：1990年3月 京都府立大学大学院農学研究科・修士課程修了
 1996年3月 京都府立医科大学大学院医学研究科・博士課程修了
 1996年4月 中外分子医学研究所・研究員
 1999年4月 京都府立医科大学・公衆衛生学教室・学内講師
 2000年4月 京都府立医科大学・公衆衛生学教室・講師
 2003年8月 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center・研究員
 2008年4月 京都府立医科大学大学院・分子標的癌予防医学・准教授
 2004年～2007年 文部科学省・科学技術政策研究所・客員研究員

専門分野：分子標的抗癌剤及び予防法の研究開発

分子機構に基づいた抗癌剤の併用療法及び予防法の研究開発

- 業 績：1. Shindoh N, Mori M, Terada Y, Oda K, Amino N, Kita A, Taniguchi M, Sohda KY, Nagai K, Sowa Y, Masuoka Y, Orita M, Sasamata M, Matsushime H, Furuichi K, Sakai T. YM753, a novel histone deacetylase inhibitor, exhibits antitumor activity with selective, sustained accumulation of acetylated histones in tumors in the WiDr xenograft model. *Int J Oncol* 2008; 32: 545-555.
2. Yamaguchi T, Yoshida T, Kurachi R, Kakegawa J, Hori Y, Nanayama T, Hayakawa K, Abe H, Takagi K, Matsuzaki Y, Koyama M, Yogosawa S, Sowa Y, Yamori T, Tajima N, Sakai T. Identification of JTP-70902, a p15^{INK4b}-inductive compound, as a novel MEK1/2 inhibitor *Cancer Sci* 2007; 98: 1809-1816.
3. Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, Ngo L, Holmgren A, Jiang X, Marks PA. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 673-678.
4. Sowa Y, Orita T, Minamikawa-Hiranabe S, Mizuno T, Nomura H, Sakai T. Sp3, but not Sp1, mediates the transcriptional activation of the p21/WAF1/Cip1 gene promoter by histone deacetylase inhibitor. *Cancer Res* 1999; 59: 4266-4270.
5. Sowa Y, Orita T, Minamikawa S, Nakano K, Mizuno T, Nomura H, Sakai T. Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 142-150.
6. Sowa Y, Shiio Y, Fujita T, Matsumoto T, Okuyama Y, Kato D, Inoue J, Sawada J, Goto M, Watanabe H, Handa H, Sakai T. Retinoblastoma binding factor 1 site in the core promoter region of the human RB gene is activated by hGABP/E4TF1. *Cancer Res* 1997; 57: 3145-3148.