シンポジウム

2. 幹細胞異常と内科系疾患，現況と展望

5) 幹細胞疾患とエピジェネティクス

下野 洋平

Key words : 組織幹細胞, がん幹細胞, エピジェネティクス, マイクロRNA

はじめに

生命の設計図とされるDNAよりRNAが作られ、それをもとにタンパク質が作られることはセントラルドグマとして提唱された概念ではあるが、DNAのもつ遺伝子情報は個々の細胞の形質と一対一に対応するものではない。例えば、多細胞生物を構成するすべての細胞は、基本的に同じ遺伝子情報をもつにもかかわらず、機能の異なる各種の細胞に機能分化する。また、個体レベルでも、一卵性双生児同士の間質に違いがみられることや、蜂の集団は同じ遺伝子情報を持ちながら女王蜂と働き蜂に分かれることが知られている。このような現象を踏まえ、DNAが遺伝子情報であることも明らかでなかった1942年に、コンラッド・H・ウォディントンが遺伝子の発現に影響を与える、遺伝子情報以外の仕組みについて解析する学問領域を「エピジェネティクス」と名付けた¹⁾。エピジェネティックな遺伝子制御機構においては、細胞周囲の情報を時間

的・空間的に統合し、ヌクレオソームの構造を変化させることで、細胞分裂を経ても継承可能な形で遺伝子発現が変化していく。特に幹細胞では、その周囲環境（ニッチ）からもたらされる情報が重要である。さらに、非コードRNAの一種であるマイクロRNAの機能解析がすすみ、それらが幹細胞の維持および分化に果たす役割も示されるようになった。本稿では、マイクロRNAやエピジェネティックな遺伝子制御機構が、組織幹細胞およびがん幹細胞を制御する分子機構について概説する。

1. エピジェネティクス

「エピジェネティクス」には必ずしも決まった定義があるわけではないが、歴史的には(1)DNAの配列の変化を伴わずに、(2)細胞分裂を経ても継承可能であるという、二つの点を満たす遺伝子発現の制御機構を対象とした学問領域とされてきた²⁾。真核細胞では、ヒストン8量体からなるコアヒストンにDNAが1.75周巻きついてヌ

神戸大学大学院医学研究科分子細胞生物学分野

110th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine : Symposium : 2. Diseases originated from stem cell abnormalities ; 5) Stem cell disorders and epigenetics.

Yohei Shimono : Division of Molecular and Cellular Biology, Kobe University Graduate School of Medicine, Japan.

本講演は、平成 25 年 4 月 13 日（土）東京都・東京国際フォーラムにて行われた。

図 1. エピジェネティック制御の概観

クレオソームを形成し、このヌクレオソームが折りたたまれてクロマチン構造を形成する。エピジェネティックな制御機構は、このクロマチン構造に影響して遺伝子発現を制御するものであり、(1) DNAのメチル化と(2) ヒストン修飾が代表的な因子とされる。アセチル化やメチル化、リン酸化、ユビキチン化などの各種のヒストンの化学修飾のパターンは「ヒストンコード」とよばれる。ポリコーム群およびトライソラックス群タンパク質、ヘテロクロマチン結合タンパク質や、クロマチンリモデリングタンパク質などからなるタンパク質複合体は、ヒストンコードを特異的に認識して結合し、クロマチン構造の変化や遺伝子発現の変化を起こす。さらに近年、ヒストンのアセチル化やメチル化修飾に関わる酵素タンパク質の解明や、非コードRNA(ncRNA)、特にマイクロRNAの機能解析が進んだ。これらのncRNAやプリオンなど遺伝子発現に影響を与える新たな因子をエピジェネティクスに含めるかという点に関しては、統一した見解が得られていない。いずれにせよ、個体の発生や細胞分化の過程では、これらの多岐にわたる因子が遺伝子制御機構に影響して、それぞれの細胞の「運命」を決定する(図1)。

2. マイクロRNA

ncRNAは、タンパク質をコードしないRNAである。ヒトのDNAのうち、mRNAを経てタンパク質に翻訳される領域は2%以下であり、細胞内には各種のncRNAが存在する。マイクロRNAは、近年急速に解析が進んだncRNAの一種であり、ヒトでは2,000種ほど存在するとされる。マイクロRNAの存在は、線虫の発生に関わる遺伝子であるlin-4が22塩基のncRNAであり、RNAの状態でlin-14タンパク質の発現抑制をするという1993年の報告により明らかになった³⁾。当初は、lin-4マイクロRNAによる遺伝子発現制御は線虫に特有の現象と考えられたが、2000年にlet-7が、ウニや線虫からヒトまで広く保存されたマイクロRNAであることが報告され、細胞の遺伝子発現を制御する基本的なメカニズムとしての解明が急速に進んだ⁴⁾。その結果、マイクロRNAは、発生、細胞分化、細胞増殖、細胞死、代謝など細胞の幅広い生命活動に影響する重要な因子であることが明らかになった。それぞれのマイクロRNAは一般に200以上の標的遺伝子を持ち、標的となるmRNAの3'非翻訳領域に結合してタンパク質への翻訳過程を抑制することで遺伝子発現を制御する。そのため、全体としては細胞に発現する遺伝子の約30%がマイクロRNAによる発現制御を受けるとされる。例えば、エピジェネティックな制御因子であるポリコーム群タンパク質EZH2は、miR-101, miR-124, miR-214などにより発現が抑制される。同様に、DNAメチル化酵素DNMT3A/BはmiR-29により、また、ヒストン脱アセチル化酵素1はmiR-449により発現が抑制される。

3. 幹細胞とがん幹細胞

1) 胚性幹細胞と組織幹細胞

幹細胞は、個体や組織を生み出すもととなる

細胞であり、(1) 幹細胞自身と同じ能力をもつ細胞を細胞分裂により生み出す「自己再生能」と(2) 個体又は組織を形作る各種の細胞に変化する能力である「分化能」により特徴づけられる。特に、同じ遺伝子情報を持ちながら、幹細胞から各種の細胞が生み出されていく過程では、エピジェネティックな制御機構が重要な働きをしている。胚性幹細胞(ES細胞)やiPS細胞は、複数の胚葉に分化できる多能性をもつ幹細胞である。一方、「組織幹細胞」は、組織の形成や維持に働く幹細胞であり、血液組織、消化管上皮組織、乳腺上皮組織、皮膚組織、中枢神経組織などで同定されている。組織幹細胞の分化能は、ES細胞などと比べ限定されているが、その個体の生涯にわたり組織の構造を維持するうえで中心的働きをする。特に、血液組織や乳腺上皮組織では、一個の組織幹細胞よりその組織を構成するすべての細胞を再生できることが実験的に示されている⁵⁻⁷⁾。

2) がん幹細胞

がん幹細胞は、「腫瘍組織中に存在し、不均一な細胞からなるがん組織を再生する能力を持つ細胞」と定義されている⁸⁾。特に解析の進んでいる血液組織においては、幹細胞の機能異常が、白血病などの血液疾患の原因になっていることが解明されてきた。一方、固形がんは、長期間にわたる各種の遺伝子異常の蓄積により、異常増殖、細胞死の抑制、免疫反応の回避、血管新生、浸潤・転移能などの特性を獲得することで進展するものであり、がん組織の形成および進展に幹細胞様の細胞の働きが関与するのかは明らかでなかった。しかし、幹細胞学の進展により、固形がんの組織中にも、「がん幹細胞」が存在すると考えられるようになった。2003年にヒト乳がん組織中に細胞表面マーカーCD44とCD24の発現で特徴づけられる特に腫瘍原性が高く、かつ乳がん組織を再生する能力をもつ細胞集団がみつかり、これらの細胞は「ヒト乳がん幹細胞」と提唱された⁹⁾。その後、大腸がん、脳腫瘍

などでも「がん幹細胞」の存在が実験的に示されるようになり、少なくとも特定の固形がんでは「がん幹細胞」ががん組織の維持および進展に関わることが明らかになった。

4. 幹細胞制御に関わる分子機構

1) クロマチン構造の制御

胚性幹細胞および組織幹細胞では、プロモーター領域にH3K4トリメチル化(転写活性化)とH3K27トリメチル化(転写抑制)のヒストン修飾が共存する二価の(bivalent)ヒストン修飾がみられる。これは、分化関連遺伝子の発現の準備状態とされ、特に幹細胞の分化の段階で、速やかに遺伝子発現を調節するうえで重要であると考えられている。また、ポリコーム群タンパク質複合体の構成タンパク質であるBmi-1は、ノックアウトマウスの解析から、血液幹細胞、神経幹細胞、および乳腺幹細胞の自己再生に関わる決定的な制御因子であることが示されている^{10, 11)}。Bmi-1は各種のがんで高発現しているだけでなく、乳がん幹細胞においても自己再生能や腫瘍形成能を制御する重要な幹細胞制御因子である。また、血液幹細胞の異常により起こる骨髄形成症候群や骨髄増殖性疾患において、ヒストンH3K27トリメチル化酵素であるポリコーム群タンパク質EZH2の機能欠失が報告されている。

2) マイクロRNA

幹細胞においてもES細胞や、乳腺や血液の幹細胞で、マイクロRNAと自己再生能や分化能との関連が明らかになっている。例えば、ES細胞には、miR-302クラスターマイクロRNAなどの特有のマイクロRNAが発現しており、自己再生能や分化能の維持に重要な働きをしている。また、マイクロRNAの機能発現に必須の酵素であるDicerのノックアウトマウスは、胎生致死となる。同様に、血液幹細胞や乳腺幹細胞のような組織幹細胞にも特有のマイクロRNAが発現しており、その自己再生能や分化能の維持に重要な

図2. マイクロRNAとエピジェネティックな制御因子の相互作用

働きをする。例えば、乳腺幹細胞および乳がん幹細胞では、両者に共通した37種の一連のマイクロRNAからなるプロファイルが認められる¹²⁾。これらの幹細胞ではmiR-200cをはじめとしたmiR-200クラスターマイクロRNAは全て抑制されており、miR-200cを強制発現させることで乳腺幹細胞の組織再生能は消失し、乳がん幹細胞の腫瘍形成能も消失する¹²⁾。また、乳腺幹細胞および乳がん幹細胞ではmiR-142など一連のマイクロRNAの発現が上昇しており、miR-142を乳腺幹細胞にさらに発現させた場合には乳腺組織が過形成になり、乳がん幹細胞で発現を抑制した場合には、腫瘍形成能が抑制される。このように、幹細胞特異的なマイクロRNAは、ES細胞、組織幹細胞、およびがん幹細胞において幹細胞の自己再生能および分化能の維持に関わる重要な因子となっている。

3) マイクロRNA-200とエピジェネティクス制御因子の相互作用

さらに、幹細胞を特徴づけるマイクロRNAがエピジェネティックな制御因子とも相互作用して幹細胞の自己再生能および分化能を制御する分子機構も明らかになってきた。例えば、乳

腺幹細胞で特異的に発現が抑制されているmiR-200クラスターマイクロRNAは、ポリコーム群タンパク質Bmi-1やSUZ12などのエピジェネティックな制御因子を標的としてその発現を抑制する。一方、マイクロRNAの前駆体となる遺伝子は、ゲノム上にコードされており、タンパクをコードする遺伝子と同様に、エピジェネティックな発現制御を受ける。例えば、miR-200クラスターマイクロRNAは、転写因子p53やZEB1/2による転写制御に加え、プロモーターのメチル化とポリコーム群タンパク質を介したヒストン修飾によりその発現が制御されている¹³⁾。このように、マイクロRNAはエピジェネティックな遺伝子発現制御機構と相互作用しながら、幹細胞の自己再生能や分化能を制御する(図2)。

5. 治療標的としてのエピジェネティクス

血液組織、消化管上皮組織、乳腺上皮組織などでは、正常組織幹細胞とがん幹細胞は細胞表面マーカーの発現、マイクロRNAの発現、SOX2などの遺伝子発現の面でも類似しており、それぞれの組織の形成に重要な役割をもつことが示

されている。したがって、がん以外の老化、血液疾患、神経疾患などの疾患においても、生体を維持するうえで重要な組織幹細胞の異常は、病態形成の根幹に関わることが推測される。エピジェネティックな発現制御機構は、幹細胞の遺伝子発現の基本的制御機構であり、実際に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤やDNAメチル化酵素阻害剤などエピジェネティック制御を標的とした治療薬が、骨髄疾患などを対象にして臨床に用いられている。これは、組織幹細胞の異常により起こる疾患に対し、エピジェネティックな発現制御機構を標的とする治療が有用であることを示している¹⁴⁾。また、各種のがんで過剰発現がみられるEZH2を標的とした治療法は、がんの新規治療法として臨床治験が進んでいる。

おわりに

かつては「がらくた配列」ともよばれたncRNAやヒトのDNAの非コード領域は、クロマチン構造の制御、スプライシング制御、タンパク質の発現制御などの複雑な機能を持ち、幹細胞の自己再生や分化を含む多彩な生命機能に影響することが明らかになってきた。特に、マイクロRNAの発見により、ncRNAの作用機構の一端および重要性が明らかになった。セントラルドグマ、エピジェネティクス、マイクロRNAと遺伝子発現を制御する機構の理解は確実に進んで遺伝子発現に影響を与える分子機構が明らかになってきた。しかし、多細胞生物の遺伝子発現および細胞分化を解明する上では、非コードDNA領域や多くのncRNAの働きの解明など依然未解明の謎が多く残されている。がんのみならず、変性や老化に伴う組織や臓器の機能不全においても幹細胞制御の基本となるエピジェネティックな

制御機構の理解が深まり、エピジェネティック制御因子の阻害剤に加え、それらを制御するマイクロRNAやヒストンコードを標的とした治療法が検討されていくことが期待される。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Slack JM: Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nat Rev Genet* 3: 889–895, 2002.
- 2) Berger SL, et al: An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 23: 781–783, 2009.
- 3) Lee RC, et al: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854, 1993.
- 4) Pasquinelli AE, et al: Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408: 86–89, 2000.
- 5) Kiel MJ, et al: SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121: 1109–1121, 2005.
- 6) Stingl J, et al: Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439: 993–997, 2006.
- 7) Shackleton M, et al: Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439: 84–88, 2006.
- 8) Clarke MF, et al: Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: 9339–9344, 2006.
- 9) Al-Hajj M, et al: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3983–3988, 2003.
- 10) Park IK, et al: Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest* 113: 175–179, 2004.
- 11) Pietersen AM, et al: Bmi1 regulates stem cells and proliferation and differentiation of committed cells in mammary epithelium. *Curr Biol* 18: 1094–1099, 2008.
- 12) Shimono Y, et al: Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 138: 592–603, 2009.
- 13) Lim Y, et al: Epigenetic modulation of the miR-200 family is associated with transition to a breast cancer stem cell-like state. *J Cell Sci* 126: 2256–2266, 2013.
- 14) Simon JA, et al: Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res* 647: 21–29, 2008.