[シンポジウム 2 : 遺伝子診断 2007—解析法の進歩と臨床応用への展望]

DNA メチル化異常の発がんにおける役割と DNA メチル化検出法による
診断・治療への応用豊田 実¹・鈴木 拓²・篠村恭久²・今井浩三³

SUMMARY

DNA methylation plays an important role in silencing cancer related genes. Recent studies have revealed that genes involved in cell cycle regulation, apoptosis, DNA repair, invasion, metastasis, and immune response, are shown to be aberrantly methylated in cancers. Subsets of cancers show simultaneous methylation of multiple genes, indicating that these tumors have CpG island methylator phenotype (CIMP). Colorectal and gastric cancers with CIMP show distinct clinicopathological features, and appear to be caused by increased rate of de novo methylation. DNA methylation changes can be detected with a high degree of sensitivity, and can potentially be important for diagnosis of cancer. Various types of cancer can be detected by analyzing methylation in DNA obtained from serum, stool, and pancreatic juice. Because DNA methylation is an epigenetic change, expression of silenced genes can be reversed by treating cells with DNA methyltransferase inhibitors such as 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine).

Key words: DNA methylation, cancer, gene expression, molecular marker.

はじめに

DNA メチル化は遺伝子発現の制御機構として重要である。DNA メチル化の生理的役割として、X 染色体の不活化やゲノムインプリンティング、Alu や LINE などの繰り返し配列の発現抑制などがあげられる。がんにおいてしばしば DNA メチル化の異常がおこり、がんの発生と進展に重要な役割を果たすと考えられる。遺伝子の低メチル化はゲノム不安定性を誘発する一方、遺伝子の高メチル化はがん抑制遺伝子の不活化を引き起こす。網羅的ゲノム解析の結果、様々ながんにおいて数百の遺伝子が異常メチル化により発現が消失していると考えられるが、個々の遺伝子のがんの発生と進展における役割に関しては不明な点が多い。本稿では、エピジェネティックな異常の発がんにおける役割と診断・治療への応用について述べる。

1. 発がんにおけるエピジェネティックな異常の役割

われわれは、がんにおける DNA メチル化の網羅的に解析により、メチル化により不活化している遺伝子を同定し、がん化における役割について解析した。その結果、細胞周期チェックポイント遺伝子 p16INK4A, p57KIP2, 14-3-3sigma, CHFR が大腸がんや胃がんにおいて異常メチル化により不活化されていることを明らかにした^{1~4}。また、アポトーシス関連遺伝子 DAP-kinase, HRK, BNIP3 の異常メチル化は腫瘍細胞の抗がん剤抵抗性や低酸素誘導性アポトーシスに関与することを明らかにした^{5~7}。腫瘍細胞においては、しばしば腫瘍抗原の提示に関する遺伝子の発現が低下あるいは消失している。われわれは、HLA-DR 遺伝子の転写活性化遺伝子である CIITA などが大腸がんにおいて異常メチル化により不活化されていることを明らかにした⁸。また、Ras の負の制御遺伝子 RASSF 遺伝子群の解析

The role of DNA methylation in carcinogenesis, and application of DNA methylation detection for diagnosis and therapy.

¹ Minoru Toyota; 札幌医科大学化学講座

² Hiromu Suzuki, Yasuhisa Shinomura; 札幌医科大学内科学第一講座

³ Kohzoh Imai; 札幌医科大学学長

Correspondence address: Minoru Toyota; Department of Biochemistry, Sapporo Medical University, South-1, West-17, Chuo-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8556, Japan.

第 58 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

(受付 2008 年 7 月 11 日, 受理 2008 年 9 月 11 日, 刊行 2008 年 12 月 15 日)

Fig. 1. Detection of DNA methylation from stool DNA by MethyLight.

DNA was isolated from stool, and treated with Na-bisulfite. Real-time PCR was performed using methylation specific primers/probe to detect methylation. X-axis: PCR cycles. Y-axis: intensity of fluorescence. Different colors indicate specimens examined. Each color represents the specimen. Genes analyzed are shown below the column.

により, RASSF2 が大腸がんにおいて異常メチル化によりサイレンシングされていること, Ras の活性化には, K-ras や BRAF の遺伝子変異だけでなく, Ras の負の制御遺伝子がエピジェネティックな異常により不活化されていることが重要であることを明らかにした⁹⁾.

2. CpG アイランドメチレーターフェノタイプ

従来, DNA メチル化の異常がランダムにおき, 遺伝子が不活化された細胞が選択されていくと考えられてきた. われわれは, 一部の大腸がんにおいてゲノムワイドなメチル化の異常, CpG island methylator phenotype (CIMP) により遺伝子の異常メチル化がおこること, CIMP 陽性大腸がんの一部で, ミスマッチ修復酵素 hMLH1 の異常メチル化により, マイクロサテライト不安定性が誘発されることを明らかにした¹⁰⁾. また, 胃がんにおいて, Epstein-Barr ウィルスが CIMP の原因として重要であることを明らかにした¹¹⁾. メチル化の制御異常が起こるメカニズムは不明であるが, 遺伝子プロモーター領域をメチル化する因子と, メチル化から防御している因子のバランスが破綻して起こると考えられる.

3. DNA メチル化を標的としたがん診断法の開発

DNA メチル化はがん特異的な異常であり, 便や血清などからメチル化を検出することにより, がんの早期診断が可能と考えられる. われわれは, 高感度かつ高特異度を有するメチル化検出を可能にするため, プライマーとプローブの両方にメチル化特異的アレルのみを検出するよう,

MethyLight 法の条件設定を行い, 大腸がん患者の便由来の DNA から RASSF1, RASSF2 および RASSF5 の異常メチル化を検出する試みを行った (Fig. 1). これら遺伝子の便中における DNA 異常メチル化は大腸がん症例中, 65%, 40%, 15% に検出された. また, 早期胃がんにおける内視鏡的胃粘膜切除後の残存病変や再発の検出に, 胃洗浄液からの DNA メチル化の検出が有効であることを明らかにした (論文投稿準備中). また, 膵がんや胆道がんの検出には膵液や胆汁中の DNA メチル化の検出が有効であることを明らかにした (論文投稿準備中).

4. DNA メチル化を指標とした発がん感受性予測

H. pylori により誘発される皺襞肥大型胃炎は, 胃がんの高リスク群である. 皺襞肥大型胃炎における E-cadherin 遺伝子のメチル化について Bisulfite-sequencing 法により 60 名の患者からの 600 アレルについて解析したところ, H. pylori 陽性皺襞肥大型陽性群では, H. pylori 陽性皺襞肥大型陰性群に比べ, E-cadherin 遺伝子のメチル化が有意に高いことを明らかにした¹²⁾. Bisulfite-sequencing 法の労力を軽減しつつ, 高い定量性を得るため pyrosequence 法を導入した. 現在, Prospective study により E-cadherin 遺伝子のメチル化が, 慢性活動性胃炎の発がんリスク予測因子となるか検討中である.

5. DNA メチル化を指標とした抗がん剤感受性予測

DNA メチル化は抗がん剤感受性予測にも有用である. われわれは分裂期チェックポイント遺伝子 CHFR が DNA メ

チル化により不活化されていることを明らかにした⁴⁾。CHFR がメチル化されている腫瘍細胞は、タキソールなどの微小管阻害剤により、細胞周期の停止が起こらず、分裂期に進行しその後アポトーシスを起こす。CHFR 異常メチル化による微小管阻害剤感受性予測のマーカーとして重要であることが示唆された¹³⁾。Glioma においては、DNA 修復酵素である、O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) 遺伝子のメチル化がアルキル化剤感受性と関連することを示した¹⁴⁾。Shen らによって、p73 遺伝子の異常メチル化がシスプラチン感受性と関連することが報告されている¹⁵⁾。

6. エピジェネティックな異常を標的としたがん治療法の開発

DNA メチル化は遺伝子の一次構造に変化を与えない、エピジェネティックな変化であり、脱メチル化により、遺伝子発現の回復が可能である。DNA メチル化酵素阻害剤として 5-azacytidine (Vidaza) と 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine: Dacogen) の 2 剤が骨髄異型性症候群の治療薬として使用されている。DNA メチル化酵素阻害剤メカニズムとして、アポトーシス関連遺伝子の発現誘導によるアポトーシス誘導や腫瘍抗原提示に関与する遺伝子の発現誘導による、腫瘍免疫の活性化が考えられる。一方、シトシンの代わりにゲノム DNA に取り込まれる、5-aza-2'-deoxycytidine は DNA 損傷を誘発することにより、細胞障害性を発揮する可能性も示唆される。

おわりに

エピジェネティックな異常の発がんにおける役割と診断・治療への応用について概説した。DNA メチル化の標的遺伝子が次々と明らかになる一方、メチル化の解析技術も定量性、簡便性に優れた方法が登場しつつある。今後臨床応用へ向けて、最適な遺伝子の組み合わせを明らかにすること、微量な DNA からの検出技術の改良などが行われることが必要と考えられる。

文 献

- 1) Kikuchi T, Toyota M, Itoh F, Suzuki H, Obata T, Yamamoto H, Kakiuchi H, Kusano M, Issa JP, Tokino T, Imai K. Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene* 2002;21:2741-2749.
- 2) Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Hinoda Y, Imai K. Distinct methylation pattern and microsatellite instability in sporadic gastric cancer. *Int J Cancer* 1999; 83:309-313.
- 3) Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Imai K. Inactivation of the 14-3-3 sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res* 2000;60:4353-4357.
- 4) Toyota M, Sasaki Y, Satoh A, Ogi K, Kikuchi T, Suzuki H, Mita H, Tanaka N, Itoh F, Issa JP, Jair KW, Schuebel KE, Imai K, Tokino T. Epigenetic inactivation of CHFR in human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7818-7823.
- 5) Murai M, Toyota M, Suzuki H, Satoh A, Akino K, Mita H, Tokino T, Imai K. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:1021-1027.
- 6) Obata T, Toyota M, Satoh A, Sasaki Y, Ogi K, Akino K, Mita H, Tokino T, Imai K. Identification of HRK as a target of epigenetic inactivation in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:6410-6418.
- 7) Satoh A, Toyota M, Itoh F, Kikuchi T, Obata T, Sasaki Y, Suzuki H, Yawata A, Kusano M, Fujita M, Hosokawa M, Yanagihara K, Tokino T, Imai K. DNA methylation and histone deacetylation associated with silencing DAP kinase gene expression in colorectal and gastric cancers. *Br J Cancer* 2002;86:1817-1823.
- 8) Satoh A, Toyota M, Ikeda H, Morimoto Y, Akino K, Mita H, Suzuki H, Sasaki Y, Kanaseki T, Takamura Y, Soejima H, Urano T, Yanagihara K, Hinoda Y, Endo T, Fujita M, Hosokawa M, Sato N, Tokino T, Imai K. Epigenetic inactivation of class II transactivator (CIITA) is associated with the absence of interferon-gamma-induced HLA-DR expression in colorectal and gastric cancer cells. *Oncogene* 2004;23:8876-8886.
- 9) Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M, Issa JP, Hinoda Y, Imai K, Toyota M, Tokino K. The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005;129:156-169.
- 10) Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8681-8686.
- 11) Kusano M, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Aoki F, Fujita M, Hosokawa M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Genetic, epigenetic, and clinicopathologic features of gastric carcinomas with the CpG island methylator phenotype and an association with Epstein-Barr virus. *Cancer* 2006;106:1467-1479.
- 12) Yamamoto E, Toyota M, Suzuki H, Kondo Y, Imai K, Sanomura T, Murayama Y, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Ashida M, Fujii K, Sasaki Y, Hayashi N, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in Helicobacter pylori-related enlarged fold gastritis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:2555-2564.
- 13) Satoh A, Toyota M, Itoh F, Sasaki Y, Suzuki H, Ogi K, Kikuchi T, Mita H, Yamashita T, Kojima T, Kusano M, Fujita M, Hosokawa M, Endo T, Tokino T, Imai K. Epigenetic inactivation of CHFR and sensitivity to microtubule inhibitors in gastric cancer. *Cancer Res* 2003;63:8606-8613.
- 14) Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000;343:1350-1354.
- 15) Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez N, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton

生物物理化学 2008 ; 52 : 192

SR, Issa JP. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. Proc

Natl Acad Sci USA 2007;104:18654–18659.