

がんのエピジェネティクス異常の解明と臨床応用

鈴木 拓, 山本博幸, 篠村恭久

札幌医科大学医学部内科学第一講座

Epigenetic alterations in human tumors and their clinical applications

Hiromu SUZUKI, Hiroyuki YAMAMOTO, Yasuhisa SHINOMURA

First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University

ABSTRACT

Cancer is fundamentally a genetic and epigenetic disease that requires the accumulation of genomic alterations that inactivate tumor suppressors and activate proto-oncogenes. Two contradicting epigenetic events coexist in cancer: global hypomethylation, which is mainly observed in repetitive sequences within the genome, and regional hypermethylation, which is frequently associated with CpG islands within gene promoters. Hypermethylation alters the activity in a number of important signaling pathways by silencing expression of genes encoding Wnt antagonists, negative Ras effectors, and p53 targets. The list of genes aberrantly methylated in cancer is growing, and methylation of a p53 target microRNA gene has been recently demonstrated. Global hypomethylation is strongly implicated in chromosomal instability and malignant potential of tumors. Sites of aberrant DNA methylation could be promising markers and targets for risk assessment, early detection and treatment of cancer.

(Accepted October 26, 2010)

Key words: Cancer, Epigenetics, DNA methylation, Tumor suppressor, Hypomethylation

1 はじめに

がんは遺伝子異常が原因と考えられており、遺伝子変異や染色体増幅・欠失などのジェネティックな異常と、DNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな異常の蓄積が発がんを引き起こすとされる^{1, 2, 3)}。がんにおけるDNAメチル化異常には、ゲノム全体の低メチル化と、CpGアイランドの局所的な高メチル化という二面性がある(図1)。多くの真核生物では、CpG配列(動物、植物)やCpNpG配列(植物)のシトシンがメチル化修飾を受ける。ヒトゲノムでは、CpGジヌクレオチドのシトシンの60~90%はメチル化されており、トランスポゾン、ウイルス遺伝子や反復配列などを抑制する働きを持つとされる。

最初に報告されたがんのDNAメチル化異常はゲノムワイドな低メチル化であり、がん遺伝子の活性化や染色体不安定性の原因となると考えられている。次いで発見されたのが、遺伝子転写開始領域の部分的な高メチル化である。約半数の遺伝子のプロモーターから転写開始領域にはCpG配列が密集したCpGアイランドと呼ばれる領域が存在し、通常はメチル化されていない。CpGアイランドがメチル化されるとクロマチン凝集が起こり(ヘテロクロマチン)、その

遺伝子は転写抑制された状態となる(図1)。正常細胞においてこのメカニズムはX染色体や組織特異的な遺伝子不活

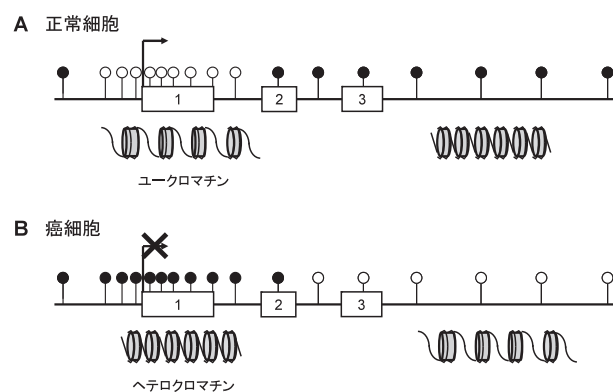


図1 がんにおけるDNAメチル化異常
A: 正常細胞ではCpG配列の多くはメチル化しているが、遺伝子プロモーターのCpGアイランド領域はメチル化されておらず、オープンなクロマチン構造となっている。
B: メチル化されたCpGアイランドは、ヘテロクロマチン構造となり遺伝子転写は抑制される。一方、ゲノムワイドな低メチル化はがん遺伝子の活性化や染色体不安定性につながると考えられている。

化,そして一部のインプリンティング遺伝子の制御などに用いられている. CpG アイランドの高メチル化による転写抑制は,がん抑制遺伝子不活化の主要なメカニズムのひとつと考えられている. RB, VHL, p16 などがん抑制遺伝子の CpG アイランドメチル化とそれに伴う発現低下が発見されたのを契機に,がん細胞でメチル化されている遺伝子が次々と報告された. 現在では,メチル化は細胞周期, DNA 修復, アポトーシス, 転移・浸潤など発がんに関わるほぼあらゆる機能の遺伝子に広く見られることが明らかとなっている.

2 がんエピジェネティクスとシグナル異常

Wnt シグナルや Ras シグナルは発がん極めて重要であり,キーとなる遺伝子の変異が発がんの引き金になる事も明らかにされている. 最近の研究の結果,これらのシグナル経路に関わる複数の遺伝子に高メチル化が起きている事が明らかとなってきた⁴⁾.

2・1 分泌型 Wnt 阻害蛋白遺伝子

Wnt シグナルの活性化は, APC, β -catenin, AXIN 遺伝子の変異が原因であることが知られている. Wnt リガンドは生物種を超えて広く保存された分泌型蛋白であり, Frizzled 受容体 (Fz) および LRP5/6 受容体と結合する (図 2). それに対して複数の分泌型 Wnt 阻害蛋白が存在し, Wnt リガンドに拮抗することで Wnt シグナルを負に制御している (図 2). 分泌型 Frizzled 関連蛋白 (SFRP) と Wnt 阻害因

子 1 (WIF-1) は, Wnt リガンドと Fz 受容体の結合を阻害する. 一方, Dickkopf (DKK) は Wnt と LRP5/6 受容体との結合を阻害することで Wnt シグナルを抑制する. 近年,これらの分泌型 Wnt 阻害蛋白遺伝子が発がんにおいて高頻度にメチル化していることが明らかとなった.

SFRP は 5 種類のファミリー遺伝子が存在するが,我々は, SFRP1, SFRP2, SFRP5 のメチル化が胃がん・大腸がん・肝がん・乳がん・白血病などに高頻度に認められることを報告した⁵⁻¹⁰⁾. WIF-1 のメチル化は食道がん, 胃がん, 大腸がんなどの消化器がんにおいて高頻度に見られる¹¹⁾. また, DKK は 4 つのファミリー遺伝子が同定されているが,我々は DKK1, DKK2, DKK3 が, 胃がん・大腸がんにおいてメチル化されること, 中でも DKK2 と DKK3 のメチル化が高頻度であることを明らかにした¹²⁾.

分泌型 Wnt 阻害蛋白遺伝子の不活化は, Wnt シグナル経路の活性化につながると考えられる. がん細胞に Wnt 阻害蛋白遺伝子を導入することでアポトーシスおよび増殖抑制が誘導される事や, マウスモデルにおいて Sfrp 遺伝子のメチル化が Wnt 経路を活性化する事が確認されている^{6, 7, 11, 12, 13)}. SFRP, WIF1, DKK のメチル化は様々ながんにおいて高頻度に見られる現象であることから, Wnt シグナルは有望ながん治療の標的であると考えられる.

2・2 Ras エフェクター遺伝子

Ras は最初に発見されたがん遺伝子であり, がんにおい

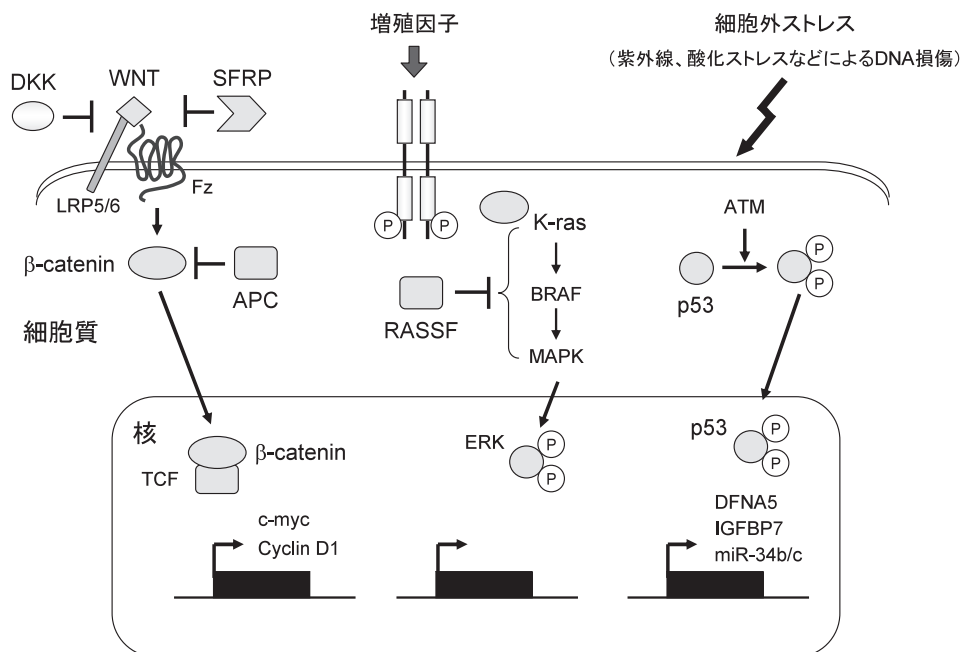


図 2 遺伝子変異およびメチル化により異常を認める細胞内シグナル経路

左から Wnt, Ras, p53 のシグナル経路の簡単な模式図を示す. Wnt リガンドが受容体と結合すると β -catenin 蛋白が安定化し, 下流の標的遺伝子の転写が活性化する. Ras は, チロシキナーゼ型増殖因子受容体を受け取った増殖シグナルを核内へ伝える上で重要な役割を果たす. Ras の下流には MAPK カスケードなどがある. p53 は DNA 損傷によって活性化し, 細胞周期停止やアポトーシスを誘導する標的遺伝子の転写を活性化する. 図中の P はリン酸化を示す.

で最も高頻度に異常を認めるがん遺伝子の一つである。正常細胞において Ras が異常活性化されると、アポトーシスや細胞老化が誘導されることから、Ras の活性を制御している制御因子の存在が示唆されていた。そのような Ras エフェクターとして RA (Ras-associated) ドメインを有する RASSF ファミリーが知られており、発がんにおいて重要な役割を担っていることが明らかとなってきた (図 2)。まず RASSF1A が肺がんにおいてメチル化によって不活化される新規のがん抑制遺伝子として報告され、その後、様々ながんにおける RASSF1A のメチル化が報告された¹⁴⁾。さらに、これまで 8 種類同定されている RASSF ファミリーのうち、6 種類 (RASSF1A, RASSF2A, RASSF4, RASSF5/NORE1, RASSF6, RASSF8) ががんにおいて不活化や発現低下を示すことが報告された。中でも我々は、RASSF2A が大腸がん・胃がんにおいて高率にメチル化していることを明らかにした^{15, 16)}。がん細胞に RASSF2 を遺伝子導入することで強いアポトーシス誘導が見られ、かつ細胞増殖が抑制された。さらに RASSF2A のノックダウンが、K-ras によるトランスフォーメーションを促進する事が実験的に確認された。これらの結果から、RASSF2A は新規のがん抑制遺伝子であると考えられた。RASSF2A による Ras 制御機構を解明することで新しい抗腫瘍薬開発のための重要な情報が得られると期待される。

2・3 p53 標的遺伝子

p53 遺伝子とはがんにおいて最も高頻度 (全がんの約 50%) に変異しているがん抑制遺伝子である。前述のように、p53 の主要な機能は転写因子であり、DNA 損傷にตอบสนองして標的遺伝子の転写を活性化させて DNA 修復やアポトーシスを誘導する (図 2)。従って、標的遺伝子が機能しなくなれば p53 のがん抑制機能が低下すると予想される。このことを裏付けるように、近年いくつかの p53 標的遺伝子のがんにおけるメチル化が見つかった。これまで我々は、p53 の標的遺伝子である 14-3-3sigma や DFNA5 が胃がんにおいてメチル化していることを報告した^{17, 18)}。

近年、がんにおいて microRNA (miRNA) が重要な役割を担っていることが明らかにされ、注目されている。miRNA は 22 塩基程度の短い non-coding RNA であり、相補的な標的 mRNA の 3'UTR に結合して翻訳阻害や mRNA 分解を誘導することで、標的遺伝子の働きを抑制する。がんでは miRNA の発現プロファイルに大きな変化があり、がん遺伝子的あるいはがん抑制遺伝子的に機能する miRNA が複数存在すると考えられている。miR-34 ファミリーは p53 によって誘導され、MET や CDK4 などを標的とすることでがん抑制遺伝子的に機能することが知られている。我々は、大腸がん・胃がんにおいて miR-34b/c の発現が、転写開始点の CpG アイランド高メチル化によりサイレンシングされていることを明らかにした^{19, 20)}。さらに miR-34b/c 遺伝子のメチル化は Helicobacter pylori 陽性の

健常人胃粘膜からも検出されること、多発胃がんの背景胃粘膜からはより高レベルのメチル化が検出されることを明らかにした。これらの結果から、miR-34b/c 遺伝子のメチル化は胃発がんの早期から生じる変化であり、かつ胃がんリスクの予測マーカーとなり得ることが示唆された²⁰⁾。

3 CpG island methylator phenotype(CIMP)

がんの中には、CpG アイランドの同時多発的なメチル化を示す CpG アイランドメチル化形質 (CIMP: CpG island methylator phenotype) の一群が存在するという説が提唱されている^{21, 22)}。CIMP が発生する原因は未だに不明であるが、大腸がんを中心に CIMP に関する研究結果が蓄積された結果、その分子生物学的および臨床病理学的な輪郭が次第に明瞭になってきた。CIMP 陽性がんの中でも、メチル化する遺伝子数が特に多い CIMP-high (CIMP-1) 群と、ややメチル化の少ない CIMP-low (CIMP-2) 群は、異なる性質を示すことが指摘されている。CIMP-high 群は MLH1 のメチル化およびマイクロサテライト不安定性 (MSI) と最も強く相関し、さらに BRAF 変異が高頻度に見られる。また右側結腸に発生する頻度が高く、高齢者に多い傾向があるとされている。一方、CIMP-low は KRAS 変異と強く相関するが、MSI, BRAF 変異, p53 変異はいずれも稀であり、CIMP-high と比べ予後不良とされている。CIMP 陰性癌では p53 変異が高頻度に見られ、MSI や BRAF 変異は少ない。

CIMP-high においてなぜ BRAF 変異が多いのかを考える上で、近年興味深い研究結果が報告された。色素細胞母斑の約 8 割は活性型の BRAF 変異をもつとされるが、BRAF の活性化は細胞老化 (senescence) とアポトーシスを誘導するため、悪性黒色腫に進行するのはわずかである。Wajapeyee らは BRAF-ERK-MEK 経路によって誘導される IGFBP7 がネガティブフィードバックとして働き、細胞老化とアポトーシス誘導に中心的な役割を果たすことを明らかにした²³⁾。我々が大腸がんを検討したところ、IGFBP7 のメチル化は CIMP-high 群に高頻度に見られたことから、BRAF 変異を起こした細胞が CIMP を獲得することで細胞老化を免れてがん化している可能性が考えられる²⁴⁾。

4 ゲノムワイドな低メチル化

ゲノムワイドな低メチル化は染色体不安定性を誘導すると考えられているが詳細なメカニズムは不明な点が多い。最近我々は、消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor; GIST) においてゲノムワイドな低メチル化と染色体コピー数異常との相関を明らかにした²⁵⁾。GIST は消化管から発生する悪性のポテンシャルを有する間質腫瘍である。GIST の大部分に KIT 遺伝子あるいは PDGFRA 遺伝子の機能獲得性変異を認めるが、これらの遺伝子変異のみでは GIST の病態の多様性を説明しきれないことが以前より指摘されていた。GIST の悪性度診断には、腫瘍径および核

分裂像に基づくリスク分類 (Fletcher 分類) が用いられることが多い。我々がゲノムワイドな低メチル化の指標となる LINE-1 反復配列のメチル化を定量的に解析した結果, 高リスク群において有意に低メチル化が認められた (図 3)。また, これまで GIST の悪性度と染色体欠失や増幅との相関が複数の研究者により指摘されている。そこでアレイ CGH 解析を行ったところ, LINE-1 低メチル化とゲノムコピー数異常 (増幅および欠失) との間に強い相関が認められた (図 3)。これらの結果から, ゲノムワイドな DNA 低メチル化により染色体異常が蓄積し, GIST の悪性化につながる可能性が示唆された。また LINE-1 メチル化はリスクや予後を推測するマーカーとして有用であることが示された。

5 おわりに

がんにおけるエピジェネティックな異常について我々の研究結果を中心に概説した。DNA メチル化技術の進歩に伴い, がんにおいて異常メチル化を受けている遺伝子の理解が進んだ。一方でメチル化異常が発生する分子機構については未知の点が多く, 今後の研究課題である。また, 便や血清中からがん特異的なメチル化を検出することで遺伝子診断を行う, あるいは抗がん剤感受性を遺伝子メチル化によって予測する, などの臨床応用への展開が期待される。

参考文献

1. Suzuki H, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Toyota M. DNA methylation and cancer pathways in gastrointestinal tumors. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 1917-1928.
2. Suzuki H, Toyota M, Sato H, Sonoda T, Sakauchi F, Mori M. Roles and causes of abnormal DNA methylation in gastrointestinal cancers. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006; 7: 177-185.
3. Suzuki H, Toyota M, Kondo Y, Shinomura Y. Inflammation-related aberrant patterns of DNA methylation: detection and role in epigenetic deregulation of cancer cell transcriptome. *Methods Mol Biol* 2009; 512: 55-69.
4. Toyota M, Suzuki H, Yamashita T, Hirata K, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. Cancer epigenomics: Implications of DNA methylation in personalized cancer therapy. *Cancer Sci* 2009; 100: 787-791.
5. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijenberg MP, Herman JG, Baylin SB. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 2002; 31: 141-149.
6. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Shuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, van

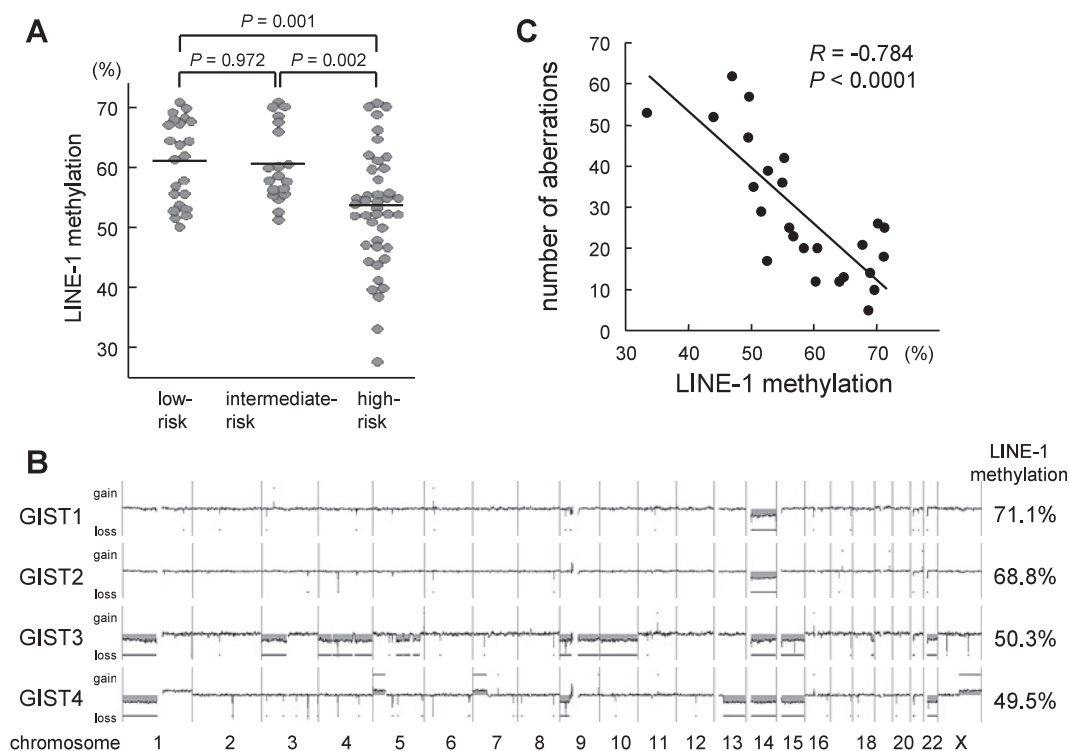


図 3 GIST における LINE-1 低メチル化と染色体異常

A: 84 例の GIST における LINE-1 メチル化をリスク分類ごとにまとめた結果。ハイリスク群において有意に LINE-1 低メチル化が認められる。

B: アレイ CGH 解析結果の代表例。

C: LINE-1 メチル化と染色体異常 (欠失と増幅の合計) との相関。

- Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004; 36: 417-422.
7. Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, Tokino T, Mori M, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* 2007; 26: 4699-4713.
 8. Takagi H, Sasaki S, Suzuki H, Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Yamamoto H, Omata M, Tokino T, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2008; 43: 378-389.
 9. Suzuki H, Toyota M, Carraway H, Gabrielson E, Ohmura T, Fujikane T, Nishikawa N, Sogabe Y, Nojima M, Sonoda T, Mori M, Hirata K, Imai K, Shinomura Y, Baylin SB, Tokino T. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br J Cancer* 2008; 98: 1147-1156.
 10. Jost E, Schmid J, Wilop S, Schubert C, Suzuki H, Herman JG, Osieka R, Galm O. Epigenetic inactivation of secreted Frizzled-related proteins in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2008; 142: 745-753.
 11. Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T, Miyamoto N, Oki M, Noshio K, Adachi Y, Endo T, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene* 2005; 24: 7946-7952.
 12. Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, Takagi H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M, Sonoda T, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis* 2007; 28: 2459-2466.
 13. Samuel MS, Suzuki H, Buchert M, Putoczki TL, Tebbutt NC, Lundgren-May T, Christou A, Inglese M, Toyota M, Heath JK, Ward RL, Waring PM, Ernst M. Elevated Dnmt3a activity promotes polyposis in Apc Min mice by relaxing extracellular restraints on Wnt signaling. *Gastroenterology* 2009; 137: 902-913.
 14. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25: 315-319.
 15. Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M, Issa JP, Hinoda Y, Imai K, Tokino T. The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 129: 156-169.
 16. Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Maruyama R, Kusano M, Nishikawa N, Watanabe Y, Sasaki Y, Abe T, Yamamoto E, Tarasawa I, Sonoda T, Mori M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Identification of DFNA5 as a target of epigenetic inactivation in gastric cancer. *Cancer Sci* 2007; 98: 88-95.
 17. 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.
 18. Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Maruyama R, Kusano M, Nishikawa N, Watanabe Y, Sasaki Y, Abe T, Yamamoto E, Tarasawa I, Sonoda T, Mori M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Identification of DFNA5 as a target of epigenetic inactivation in gastric cancer. *Cancer Sci* 2007; 98: 88-95.
 19. 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.
 20. Suzuki H, Yamamoto E, Nojima M, Kai M, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Kudo T, Harada E, Sugai T, Takamaru H, Niinuma T, Maruyama R, Yamamoto H, Tokino T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Methylation-associated silencing of microRNA-34b/c in gastric cancer and its involvement in an epigenetic field defect. *Carcinogenesis* 2010 Oct 5. [Epub ahead of print].
 21. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8681-8686.
 22. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, Baylin SB, Issa JP. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999; 59: 5438-5442.
 23. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 2008; 132: 363-374.
 24. Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, Akashi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Sugai T, Shen L, Issa JP, Shinomura Y, Tokino T, Toyota M. IGFBP7 is a p53 Responsive Gene Specifically Silenced in Colorectal Cancer with CpG Island Methylator Phenotype. *Carcinogenesis* 2010; 31, 342-349.
 25. Igarashi S, Suzuki H, Niinuma T, Shimizu H, Nojima M, Hiroyuki Iwaki H, Nobuoka T, Nishida T, Miyazaki Y, Takamaru H, Yamamoto E, Yamamoto H, Tokino T, Tadashi Hasegawa, Koichi Hirata, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. A novel correlation between LINE-1 hypomethylation and the malignancy of gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5114-5123.

別刷請求先：篠村 恭久

〒060-8556 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部内科学第一講座

TEL : 011 - 611 - 2111 (内線 3211)

FAX : 011 - 611 - 2282

E-mail : shinomura@sapmed.ac.jp