

DNA のメチル化と遺伝子発現に関する研究

—とくに癌胎児性蛋白遺伝子について—

東 出 俊 之

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Studies on DNA Methylation and Gene Expression

—With Special Reference to the Oncodevelopmental Protein Genes—

Toshiyuki HIGASHIDE

*Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief. Prof. A. Yachi)*

In order to study the effect of DNA methylation on gene expression, human cancer cell lines were treated with 5-azacytidine that inhibited DNA methylation. Expression of the AFP, CEA and albumin genes were examined. In addition, a CEA probe was prepared to detect CEA mRNA and to define its size. The following results were obtained.

1) Human hepatoma cells, HuH-7, produce large quantities of AFP and albumin. Treatment of 5-azacytidine resulted in a reduction of hybridizable AFP and albumin mRNA levels at 3 to 4 weeks. This effect was temporary and the mRNA levels were restored to the original levels after 6 to 7 weeks of cultivation in the absence of 5-azacytidine. In contrast, 5-azacytidine treatment resulted in the induction of CEA mRNA at 2 to 4 weeks, but this mRNA was not detected after 6 to 7 weeks.

2) Human hepatoma cells, c-Hc-4, produce small quantities of AFP and albumin. Treatment of 5-azacytidine induced AFP and albumin mRNAs at 1 to 4 weeks.

3) In human colon cancer cells BM314, 5-azacytidine treatment reduced CEA, AFP and albumin mRNAs.

4) Southern blot analysis of DNAs from HuH-7, c-Hc-4 and Chang liver cells showed that the expression of the AFP and albumin genes were not correlated with gene hypomethylation as analyzed by *Msp* I and *Hpa* II digestion.

5) A CEA probe was prepared by extension of an oligonucleotide that corresponds to five amino acid residues at position 13 to 17 of CEA with reverse transcriptase. The hybridized mRNA size was 2.2kb by this probe using the Northern blot analysis. Since this size of mRNA is able to code a polypeptide of MW 72,000 and is considered compatible with CEA polypeptide, this probe may be useful for cloning the CEA gene. (Received December 3, 1985 and accepted January 27, 1986)

Abbreviations:

AFP : α -fetoprotein
BSA : bovine serum albumin
cDNA : complementary DNA
CEA : carcinoembryonic antigen
DMSO : dimethylsulfoxide
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay
5-AzaC : 5-azacytidine
Kb : kilobase pairs
mRNA : messenger RNA
PBS : phosphate buffered saline
SDS : sodium dodecyl sulfate
SSC : standard saline citrate

Key words: DNA methylation, Gene expression, 5-Azacytidene, Oncodevelopmental protein, Human cultured cell

1 結 言

DNA のメチル化が遺伝子発現を抑制し、このメチル化を抑制する薬剤 5-azacytidine (5-AzaC) の投与により遺伝子が発現するという事は、マウス embryo fibroblast の系¹⁻²⁾をはじめとし、ヒトにおいては鎌状赤血球症³⁾及び β -サラセミア⁴⁾の患者における HbF の発現等、これまでいくつかの例について報告されている⁵⁾。

また DNA のメチル化が細胞分化に関与するとの仮説⁶⁻⁷⁾があり、精子や初期胚中では DNA のメチル化の程度は高く、組織分化は組織特異的な脱メチル化反応によってひきおこされると考えられている⁶⁻⁷⁾。さらに癌胎児性蛋白の産生が胎児に発現し、成体にはみられず、これが癌化により再び出現するという機構の一つに、遺伝子のメチル化との関係が考えられている⁸⁾。 α -fetoprotein (AFP) については、マウス、ラットにおいては、発現とメチル化との関係についていくつかの研究⁹⁻¹⁰⁾が行なわれているが、ヒトについてはまだ検討されていない。そこで AFP の産生能に差違のある 2 種の培養ヒト肝癌細胞及び培養ヒト肝細胞を用い、AFP 遺伝子のメチル化とその発現を、また AFP 遺伝子と同一染色体上にあるアルブミン遺伝子についても、メチル化と遺伝子発現の関連について検討を加えた。

さらに、AFP と並ぶ癌胎児性蛋白である carcinoembryonic antigen (CEA) についてはまだ CEA に対するプローブは作製されていないので、その作製を試みると共に遺伝子発現とメチル化との関連を検討した。

2 方 法

2.1 培養細胞

本研究においては以下ヒト培養細胞を用いた。肝細胞として HuH-7¹¹⁾(岡山大学癌研中林秀和講師、佐藤二郎教授より供与)、c-Hc-4¹²⁾(北海道大学佐々木文章博士より供与)の 2 種、肝細胞として Chang 肝細胞(名古屋大学各務伸一博士より供与)及び大腸癌細胞 BM314 を用いた。これらの培養には 10% 牛胎仔血清 (FCS) 加 RPMI1640 培養液 (GIBCO, USA) を用い 37°C, 5%CO₂ インキュベーター内で培養維持した。

DNA のメチル化の inhibitor として、5-AzaC (Sigma, USA) を 10 μ M ないし 50 μ M となるように培養液に加え、それぞれ 24 時間ないし 4 日培養後、5-

AzaC を除いた正常培養液にもどした。その後 1 週おきに、cell scraper (Coster, USA) を用いて、細胞を集め実験に供した。また対照としては、5-AzaC 非添加培養細胞を用いた。

2.2 遺伝子発現の検索

遺伝子発現の検索は、蛋白及び mRNA の両面から行なった。すなわち培養上清中のアルブミン及び AFP 濃度の測定は ELISA により行ない、mRNA レベルについては RNA dot blotting⁸⁾により、またそのサイズは Northern blotting (後述) を用いて検索した。

2.2.1 ELISA

マイクロプレート (Dynatech immulon, USA) に 1 次抗体として炭酸緩衝液 (0.015 M Na₂CO₃-0.035 M NaHCO₃, pH 9.6) で 1,000 倍に希釈した AFP 抗体 (DAKO, Denmark), ないし 10,000 倍に希釈した抗アルブミン抗体 (Cappel, USA) を 100 μ l/well ずつ入れ、4°C, 16 時間放置、吸着させ 0.3%ゼラチン及び 0.05% Tween 80 加 PBS で 3 回洗浄した。Well に培養上清を 100 μ l 加え、37°C, 30 分間反応させた後、上記洗浄液で 3 回洗浄した。なお培養上清は 1×10^7 個の細胞を 2 日培養したものをを用いた。ついで 2 次抗体として、それぞれペルオキシダーゼ標識を施した抗 AFP 抗体 (DAKO) あるいは抗アルブミン抗体 (Cappel) を 100 μ l/well を加え、さらに 37°C, 30 分間反応させた。洗浄後、発色液を 100 μ l/well 加え 37°C, 30 分間反応させた。発色液は 0.012% 過酸化水素水を加えたクエン酸緩衝液 (pH 5.5) に基質として、*o*-フェニレンジアミンを 1.0 mg/ml となるように溶解したもので、使用時に調整して用いた。4N 硫酸を 50 μ l/well ずつ加え反応を停止させ Titertek Multiskan (Flow Laboratories, USA) を用い波長 492 nm で吸光度を測定した。

2.2.2 Total RNA の分離及び mRNA の精製

Total RNA は Chirgwin *et al.*¹³⁾ の方法に従い、guanidinium thiocyanate 法により、培養細胞より分離した。また BM 314 細胞の mRNA は total RNA 分離後、Aviv and Leder¹⁴⁾ の方法に従い、オリゴ(dT)セルロース (BRL, USA) のカラムクロマトグラフィーを 2 回通すことにより、total RNA より精製した。

2.2.3 プローブ

本研究においては、アルブミン及び AFP の cDNA である phalb7¹⁵⁾ 及び pHAF7¹⁶⁾ をそれぞれプローブとし

たが、Feinberg and Vogelstein¹⁷⁾の方法に従い、 α -³²P dCTP (Amersham, USA) により標識した。Specific activity は $6-10 \times 10^8$ cpm/ μ g であった。

また CEA のプローブとして、CEA peptide の N 端より 13 から 17 番目のアミノ酸 (Glu-Gly-Lys-Glu-Val) に対応して自動 DNA 合成装置により人工的に合成した 14 個の nucleotide から成る oligonucleotide を primer とし、Land *et al.*¹⁸⁾の方法に従い、2 \cdot 2 \cdot 2 において CEA 産生性の BM 314 細胞から精製された mRNA と相補的に結合させ、逆転写酵素によってこの primer を延長後、CEA のプローブとして用いた。

2 \cdot 2 \cdot 4 RNA dot blotting

2 \cdot 2 \cdot 2 で得た total RNA を 7.4% formaldehyde, 6 倍希釈 (6 \times) SSC (SSC, 0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム) にて 65 $^{\circ}$ C, 15 分間恒温水槽内でインキュベートすることにより変性させ、6 \times SSC 溶液で希釈し、total RNA として 4 μ g, 2 μ g, 1 μ g 及び 0.5 μ g を microfiltration 装置 BIO DOT (Bio Rad, USA) を用いナイロン 66 フィルターメンブレン (Fischer, USA) に吸着させ、真空乾燥器中で 80 $^{\circ}$ C, 2 時間の処理を行ない RNA をメンブレンに固定した。次にハイブリダイゼーションを行なった⁹⁾。まず前処理として 3 \times SSC 溶液にて 65 $^{\circ}$ C, 30 分間インキュベート、その後 3 \times SSC 及び 1 \times Denhardt (0.2% BSA, 0.2% ficoll, 0.2% polyvinylpyrrolidone) 溶液において 65 $^{\circ}$ C, 1 時間インキュベートした。次に 2 \cdot 2 \cdot 3 で作製されたプローブをサケ精子 DNA とそれぞれ最終濃度で 1×10^6 cpm/ml, 100 μ g/ml となるよう混じり、100 $^{\circ}$ C, 5 分間熱処理し直ちに氷冷し、hybridization buffer とよく混ぜ、ポリシーラーバッグ内でメンブレンと反応させ、65 $^{\circ}$ C, 16 時間インキュベートした。Hybridization buffer は最終濃度として、50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5), 10 mM EDTA, 1 M NaCl, 1 \times Denhardt, 0.1% SDS となるよう作製した。メンブレンはハイブリダイズ後、2 \times SSC 溶液にて室温下 15 分間浸すことにより hybrid を形成しなかった放射能を洗い落した。この操作を 2 回繰り返したのち、0.1 \times SSC-0.1% SDS 溶液でさらに 65 $^{\circ}$ C, 30 分間の洗浄を 2 回繰り返した。メンブレンを乾燥させたのち -70 $^{\circ}$ C で XAR-5 フィルム (Kodak, USA) にさらし、オートラジオグラフィを行なった。

2 \cdot 2 \cdot 5 Northern blotting

Northern blotting は Thomas¹⁹⁾の方法に従った。つまり 2 \cdot 2 \cdot 2 で分離された total RNA を 1 M glyoxal と 50% DMSO を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で 50 $^{\circ}$ C, 1 時間インキュベートすることによ

り変性させた後、1 レーン当り 20 μ g の RNA を 1% アガロースゲルで電気泳動を行なった。泳動後 RNA をニトロセルロース膜 (Schleicher and Schuell BA85, Germany) に吸着させ、dot blotting と同様の方法で、cDNA プローブとハイブリダイズさせた。この際 RNA のサイズマーカーとして仔牛肝の ribosomal RNA 28S 及び 18S (PL-Biochemical, USA) を用い、ハイブリダイズする mRNA のサイズを決定した。28S 及び 18S はそれぞれ 5.0 kb, 1.8 kb に相当する。

2 \cdot 3 DNA メチル化の検索

2 \cdot 3 \cdot 1 高分子 DNA の抽出

高分子 DNA は Blin and Stafford²⁰⁾の方法に従い、培養細胞を 0.5% SDS 及び 100 μ g/ml の proteinase K (BRL) にて、50 $^{\circ}$ C, 3 時間インキュベートし、蛋白を変性させたのち、同量のフェノールついでクロロホルムで蛋白を除き、核酸を抽出した。さらに RNase 20 μ g/ml により RNA を分解させ、高分子 DNA を抽出した。

2 \cdot 3 \cdot 2 Southern blotting

2 \cdot 3 \cdot 1 により抽出した DNA を過量 (2 μ / μ g) の制限酵素 Msp I ないし Hpa II を用い、低塩濃度緩衝液 (10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol) 中において 37 $^{\circ}$ C, 6 時間インキュベートし DNA を切断した。ここで Msp I 及び Hpa II はともに塩基配列 CCGG を切断する酵素であるが、Msp I は外側の C がメチル化された場合、Hpa II は内側の C がメチル化されるとそれぞれ切断することができない²¹⁾。また Msp I は GGcMc GG²²⁾ 及び CmCGGCC²³⁾ の sequence をも切断することはできない。その後 1 レーン当り 20 μ g の DNA を 1% アガロースゲルで電気泳動した。泳動後 Southern²⁴⁾の方法に従い、ゲルをアルカリ処理することにより DNA を 2 本鎖から 1 本鎖に変性させニトロセルロース膜に吸着させた。DNA の吸着したニトロセルロース膜は、dot blotting と同様の方法により、cDNA プローブとハイブリダイズした。DNA のサイズマーカーとしては λ DNA を制限酵素 Hind III を用いて切断した各サイズの断片を用い、Southern blotting によって得られたバンドのサイズを決定した。

3 成 績

3 \cdot 1 培養上清中のアルブミン及び AFP 濃度の 5-AzaC 添加による変化

3 種の培養細胞に 5-AzaC を 50 μ M 4 日間培養液中に添加、その後正常培養液にもどし、添加前、3 週間後及

び5週後に培養上清中のアルブミン及びAFP濃度をELISAにより測定した (Table 1).

HuH-7細胞より得られた培養上清においては、高濃度のアルブミン及びAFPを検出し得たが、3週後にはともに一時的に減少を示し、その後回復する傾向が認められた。

c-Hc-4細胞の培養上清中には、微量のAFPが検出できるが、5-AzaC添加後においても有意な変化を認めなかった。また、検出感度以下の値を示したアルブミンが3週後には微量に検出できるようになった。

一方BM 314細胞より得られた培養上清においては、AFPは5-AzaC添加前及び添加後ともに検出されなかった。また、検出されていたアルブミンについては、添加後減少し検出できなくなった。

3・2 アルブミン及びAFP遺伝子の発現

3・2・1 ヒト肝癌細胞HuH-7における発現

HuH-7細胞は高濃度のアルブミン及びAFPを培養上清中に分泌することは、3・1に示したが、RNA dot blottingにおいても Fig. 1に示すように、アルブミン及びAFP cDNAとハイブリダイズする高レベルのそれぞれのmRNAを産生することを認めた。

DNAのメチル化との関連をみるため、培養液に5-AzaCを添加しmRNAレベルでの影響をdot blottingで検討したが、5-AzaC 10 μ Mの場合には24時間及び4日添加において、また50 μ M 24時間添加条件下では、HuH-7細胞のアルブミンあるいはAFPのmRNAレベルについては著明な変化を認めなかった。しかし50 μ M 4日間添加においては、Fig. 1に示すように、添加後よりアルブミン及びAFPのmRNAレベルは減少傾向を示し、3-4週後において最低レベルに達した。その後両者ともmRNAレベルは次第に増加し、対照のレベ

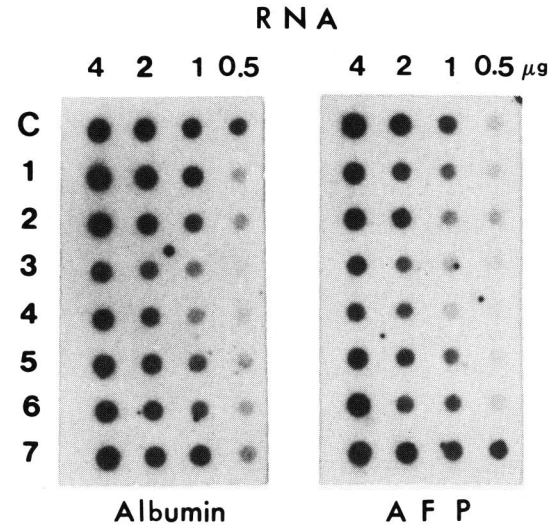


Fig. 1 RNA dot blot analyses of albumin and AFP mRNAs in HuH-7.

HuH-7 was treated with 5-AzaC 50 μ M for 4 days and then cultured without 5-AzaC.

C: HuH-7 control RNA.

1: 1wk, 2: 2wks, 3: 3wks, 4: 4wks,

5: 5wks, 6: 6wks, 7: 7wks

after removal of 5-AzaC.

ルに回復し、AFP mRNAについては7週後において対照のレベルをも上まわる結果が得られた。

次にNorthern blottingによりAFP及びアルブミンのmRNAのサイズを検討した。Fig. 2に示すように5-AzaC添加後においてもAFP mRNAのサイズはほぼ同様で、約2.1 kbであった。また5-AzaC添加により、不完全な形のAFP mRNAの産生は認められなかった。同様にアルブミンについても検討を加えたが、成績は示さないが約2.1 kbのmRNAが認められ、5-AzaC添加によるサイズの変化は認められなかった。

Table 1 AFP and albumin secretion of cultured human cell lines after treatment of 5-azacytidine.

Cell lines		concentration (ng/ml)		
		before treatment	3 weeks after removal of 5-azacytidine	5 weeks after removal of 5-azacytidine
HuH-7	AFP	11,300 \pm 700*	8,900 \pm 950***	11,100 \pm 1,000**
	albumin	24,320 \pm 520#	11,270 \pm 680#.#	13,840 \pm 500##
c-Hc-4	AFP	4.5 \pm 1.7	6.1 \pm 3.5	n. d.
	albumin	<1	17.6 \pm 0.2	n. d.
BM314	AFP	<1	<1	n. d.
	albumin	7.8 \pm 1.2	<1	n. d.

Cells were treated with 5-azacytidine 50 μ M for 4 days and then cultured without 5-azacytidine.

n. d.: not done Values are means \pm S. D. (n=5).

, *, #-#, ##-## P<0.05

3・2・2 ヒト肝癌細胞 c-Hc-4 における発現

c-Hc-4 細胞は極めて低いレベルの AFP を分泌していることを 3・1 で示したが, RNA dot blotting においても, Fig. 3 の control に示すように, 低いレベルの mRNA の産生を認めた. また c-Hc-4 細胞に 5-AzaC を添加することにより, アルブミン及び AFP の mRNA レベルが軽度増加することが観察された (Fig. 3). さらにこのことを確かめるために, Northern blotting を行なったところ, Fig. 4 に示すように, 対照において認められなかった AFP mRNA が 5-AzaC を除去して 1 週後において HuH-7 細胞と同一のサイズ 2.1 kb を示して認められた.

3・2・3 Chang 肝細胞における発現

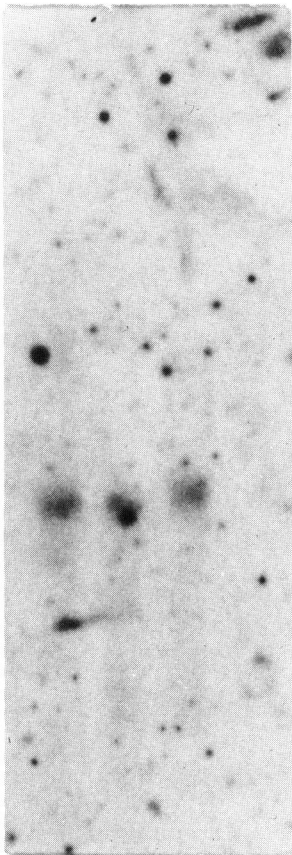


Fig. 2 Northern blot analysis of AFP mRNA. HuH-7 was treated with 5-AzaC 50 μ M for 4 days and then cultured without 5-azaC. lane 1: HuH-7 control
lane 2: 3wks after removal of 5-AzaC.
lane 3: 7wks after removal of 5-AzaC.
Hybridized mRNAs were indicated by arrow.

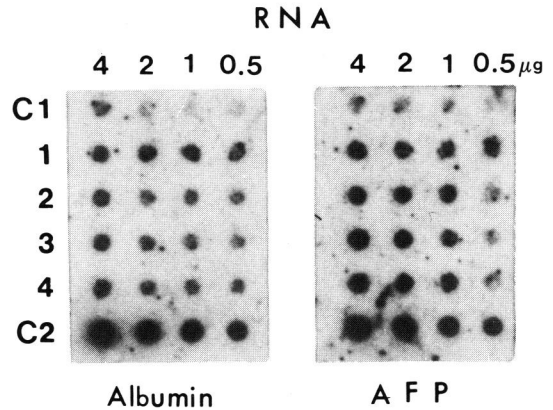


Fig. 3 RNA dot blot analyses of albumin and AFP mRNAs in c-Hc-4. c-Hc-4 was treated with 5-AzaC 50 μ M for 4 days and then cultured without 5-AzaC. C1: c-Hc-4 control RNA. C2: HuH-7 control RNA. 1: 1wk, 2: 2wks, 3: 3wks, 4: 4wks after removal of 5-AzaC.

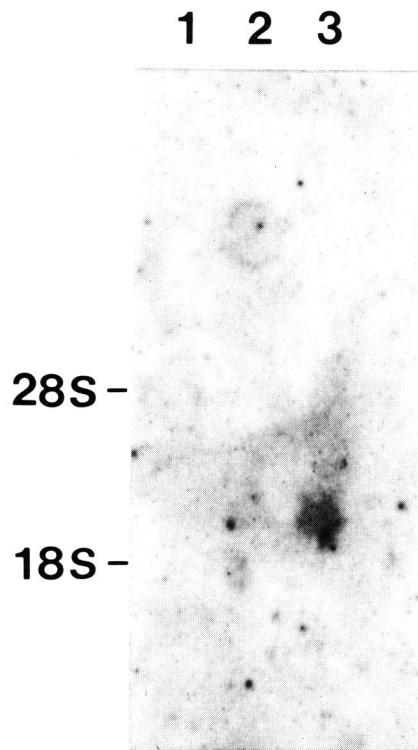


Fig. 4 Northern blot analysis of AFP mRNA. c-Hc-4 was treated with 5-AzaC 50 μ M for 4 days and then cultured without 5-AzaC. lane 1: c-Hc-4 control. lane 2: c-Hc-4, 1wk after removal of 5-AzaC. lane 3: HuH-7 control. Hybridized mRNAs were indicated by arrow.

アルブミン及びAFPをほとんど産生していないChang細胞を用いて、5-AzaC添加によるアルブミン及びAFP mRNA レベルに及ぼす影響を観察したが(Fig. 5), この場合にはアルブミン及びAFPともに添加前と同程度であった。

3・2・4 ヒト大腸癌細胞 BM 314 における発現

次にヒト大腸癌細胞 BM 314 を用いて同様の検索を進めた。BM 314 細胞においては Fig. 6 に示すように RNA dot blotting により対照において、cDNA とハイブリダイズするアルブミン及びAFP mRNA の存在が認められたが、これらの mRNA は5-AzaC 添加により減少する傾向を示した。そこで Northern blotting によるアルブミン及びAFP mRNA の検出を試みたが、cDNA とハイブリダイズする mRNA のバンドは検出し得なかった。

3・3 CEA 遺伝子の発現

2・2・3 において作製したCEAプローブを用い、DNAのメチル化とCEA遺伝子発現の関連について検討した。

Fig. 7 及び Fig. 8 に示すように、このプローブは RNA dot blotting においてCEA産生性大腸癌細胞 BM 314 においては強陽性、少量のCEAを産生する肝癌細胞 HuH-7 においては弱陽性を示した。また同時にこのプローブを用い、5-AzaC 添加のCEA発現に及ぼす影響をみたところ、BM 314 細胞においては、 $10\mu\text{M}$ 24時間及び4日添加では、明らかな影響をみないが、 $50\mu\text{M}$ 24時間及び4日の添加では、このプローブとハイブリダイズする mRNA の減少を認めた。この mRNA は HuH-7 細胞においては、アルブミン及びAFPの場合とは異なり、2週後にピークをみる一時的な増加を認め、その後減少傾向をたどり、7週後において対照のレベルに回復した。

ついで Northern blotting により、ハイブリダイズする mRNA のサイズを検討したところ、Fig. 9 に示すように、BM 314 細胞において、2.2 kbであることを認めた。また HuH-7 細胞及び5-AzaCを除去して3週後の BM 314 細胞においては、Northern blotting により、このプローブとハイブリダイズする mRNA を検出し得なかった。

3・4 遺伝子メチル化の検討

次に各種細胞株のDNAを制限酵素 Msp I ないし Hpa II で切断後、Southern blotting により、遺伝子のメチル化の検討を行なった。

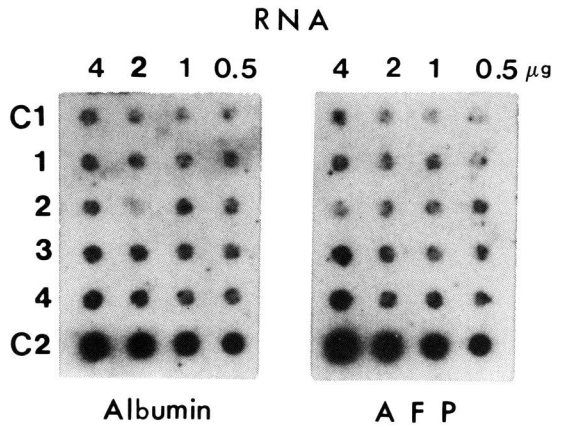


Fig. 5 RNA dot blot analyses of albumin and AFP mRNAs in Chang cell.

Chang cell was treated with 5-AzaC $50\mu\text{M}$ for 4 days and then cultured without 5-AzaC.

C1: Chang cell control RNA.

C2: HuH-7 control RNA.

1: 1wk, 2: 2wks, 3: 3wks, 4: 4wks after removal of 5-AzaC.

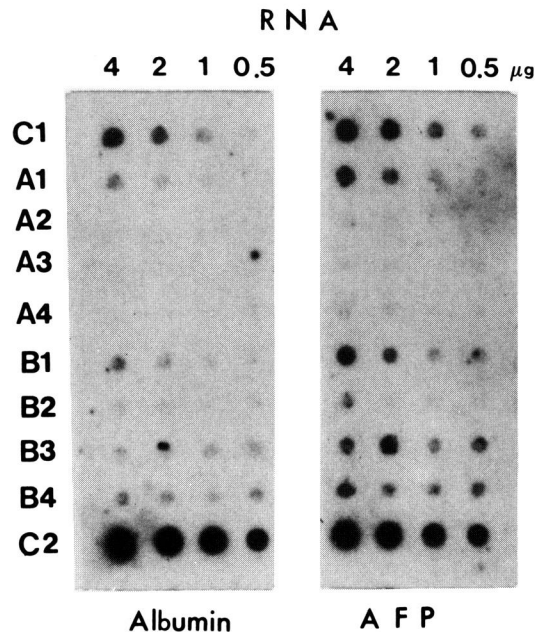


Fig. 6 RNA dot blot analyses of albumin and AFP mRNAs in BM314.

BM314 was treated with 5-AzaC $50\mu\text{M}$ for 1 day (A) or 4 days (B) and then cultured without 5-AzaC.

C1: BM314 control RNA.

C2: HuH-7 control RNA.

A1, B1: 1wk, A2, B2: 2wks, A3, B3: 3wks, A4, B4: 4wks after removal of 5-AzaC.

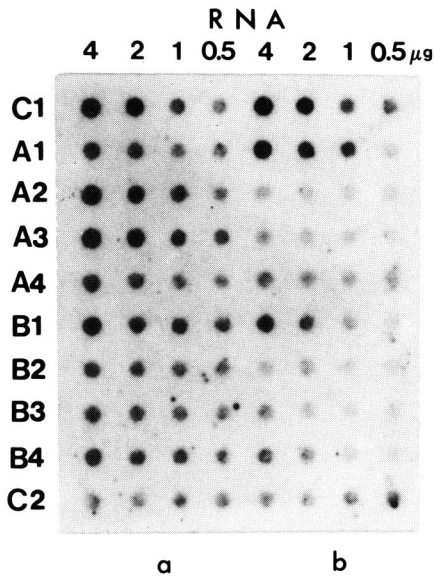


Fig. 7 RNA dot blot analyses of CEA mRNA in BM314. BM314 was treated with 5-AzaC of 10 μ M (a) or 50 μ M (b) in concentration for 1 day (A) or 4 days (B) and then cultured without 5-AzaC. C1: BM314 control. RNA. C2: HuH-7 control RNA. A1, B1: 1wk, A2, B2: 2wks, A3, B3: 3wks, A4, B4: 4wks after removal of 5-AzaC.

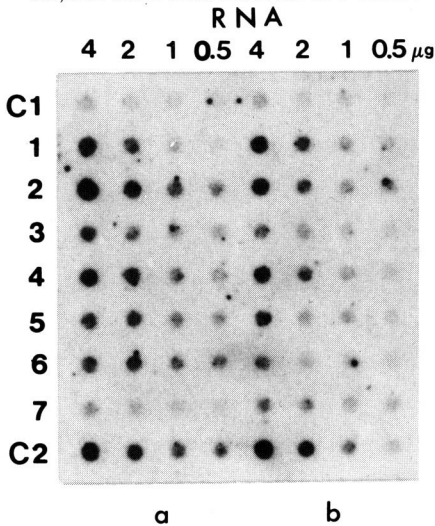


Fig. 8 RNA dot blot analyses of CEA mRNA in HuH-7. HuH-7 was treated with 5-AzaC 50 μ M for 1 day (a) or 4 days (b) and then cultured without 5-AzaC. C1: HuH-7 control RNA. C2: BM314 control RNA. 1: 1wk, 2: 2wks, 3: 3wks, 4: 4wks, 5: 5wks, 6: 6wks, 7: 7wks after removal of 5-AzaC.

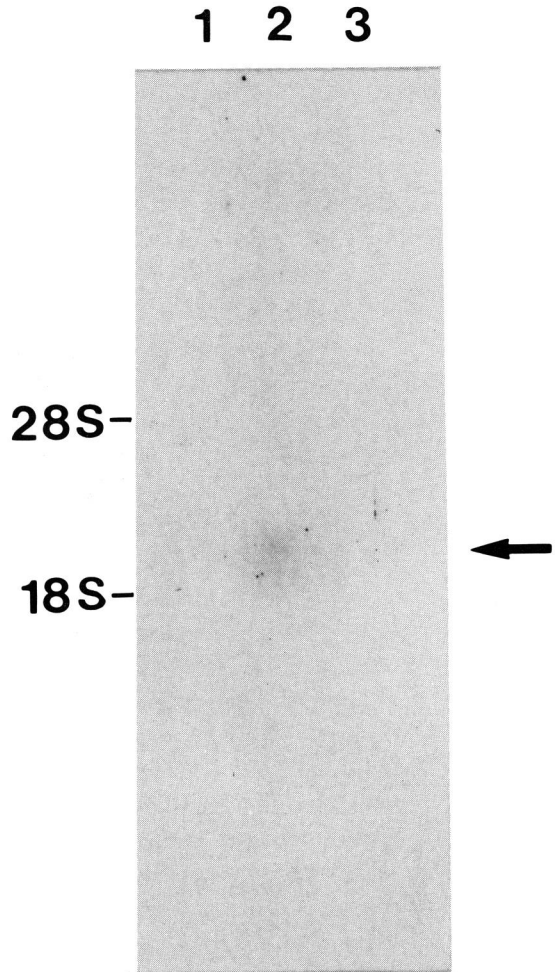


Fig. 9 Northern blot analysis of CEA mRNA. lane 1: HuH-7 control lane 2: BM314 control lane 3: BM314, 3wks after removal of 5-AzaC. BM314 was treated with 5-AzaC 50 μ M for 4 days. Hybridized mRNA was indicated by arrow.

3.4.1 AFP 遺伝子のメチル化と発現

Fig. 10-A 及び Fig. 10-B に示すように Chang 細胞において *Msp* I 消化により 10 kb 及び 8.4 kb の 2 本のバンドが得られ、*Hpa* II 消化により 8.4 kb のバンドが得られた。また HuH-7 細胞においては、*Msp* I 消化により 10 kb 及び 8.4 kb の 2 本のバンドが得られたのに対し、*Hpa* II 消化では、8.4 kb に、ごく小さいバンドが得られたのみである。c-Hc-4 細胞においては、Chang 細胞と同様 *Msp* I 消化により、10 kb 及び 8.4 kb の 2 本、*Hpa* II 消化においては、8.4 kb のバンドが 1 本得られた。このことは、*Msp* I 及び *Hpa* II により解析す

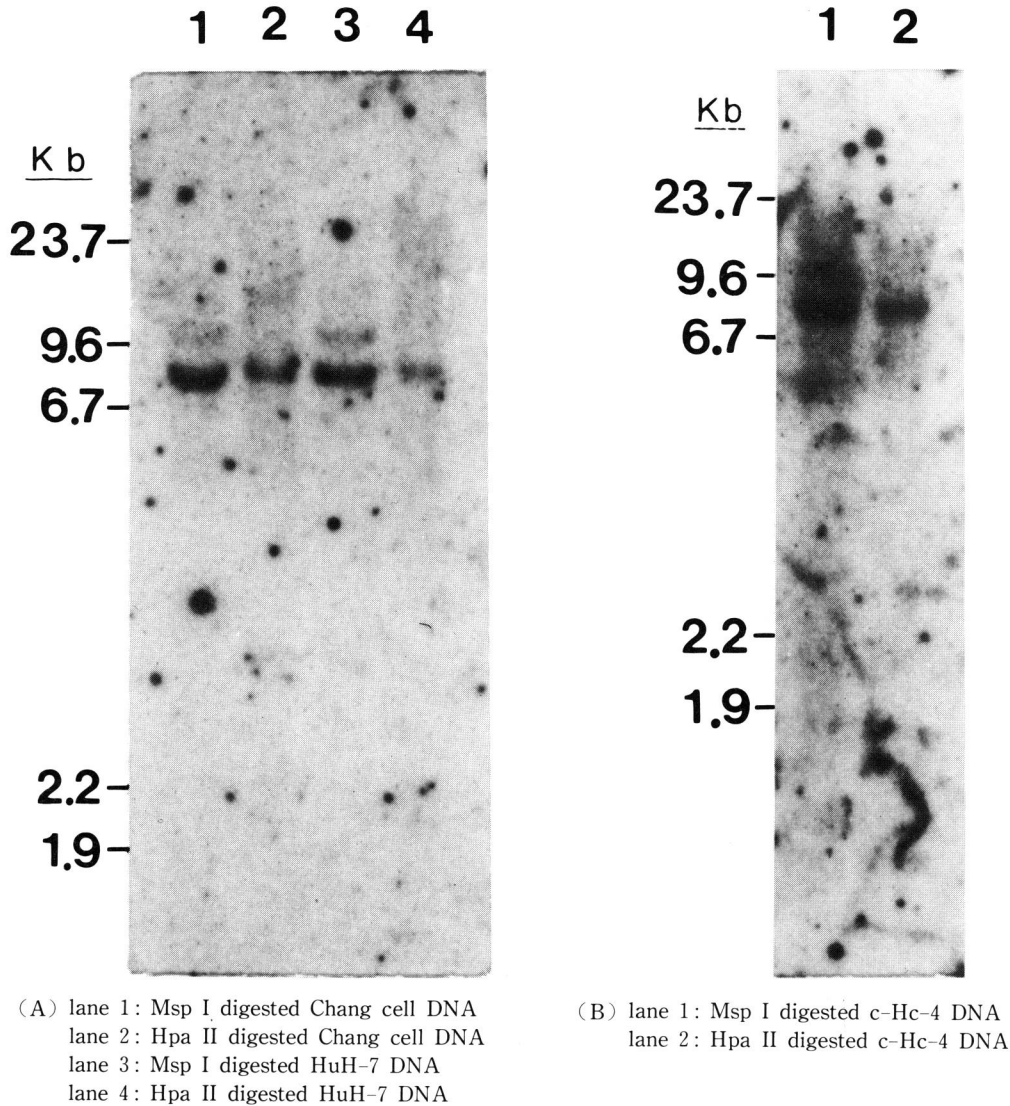


Fig. 10 Southern blot analysis of AFP gene.

る限りでは、AFPを大量産生するHuH-7細胞において、AFP遺伝子がメチル化されており、AFPをほとんど産生しないかあるいは少量しか産生していないChang細胞及びc-Hc-4細胞においては、HuH-7細胞ほどメチル化されていないことを示している。

3・4・2 CEA 遺伝子のメチル化と発現

CEA 遺伝子についても同様の検索を行なったが2・2・3で作製したプローブでは、DNAのバンドは検出し得なかった。

3・4・3 アルブミン遺伝子のメチル化と発現

Fig. 11-A 及び Fig. 11-B に示すように、Chang 細胞において、*Msp* I 消化により、8.4 kb 及び 7.0 kb の 2

本のバンドが得られ、*Hpa* II 消化では、14.5 kb、8.4 kb 及び 7.0 kb の 3 本のバンドが得られた。c-Hc-4 細胞においては、*Msp* I、*Hpa* II 消化いずれにおいても、8.4 kb 及び 7.0 kb の 2 本のバンドが得られた。これに対し、HuH-7 細胞においては、*Msp* I 消化により、16 kb、8.4 kb 及び 7.0 kb の 3 本のバンドが得られたが、*Hpa* II 消化においては 20 kb 以上において、スメアが得られたのみであった。このことは、AFP 遺伝子と同様、アルブミンを大量に産生している HuH-7 細胞において、アルブミン遺伝子の CCGG の内側の C がメチル化されており、アルブミンをほとんどないし少量しか産生しない Chang 細胞及び c-Hc-4 細胞においては、

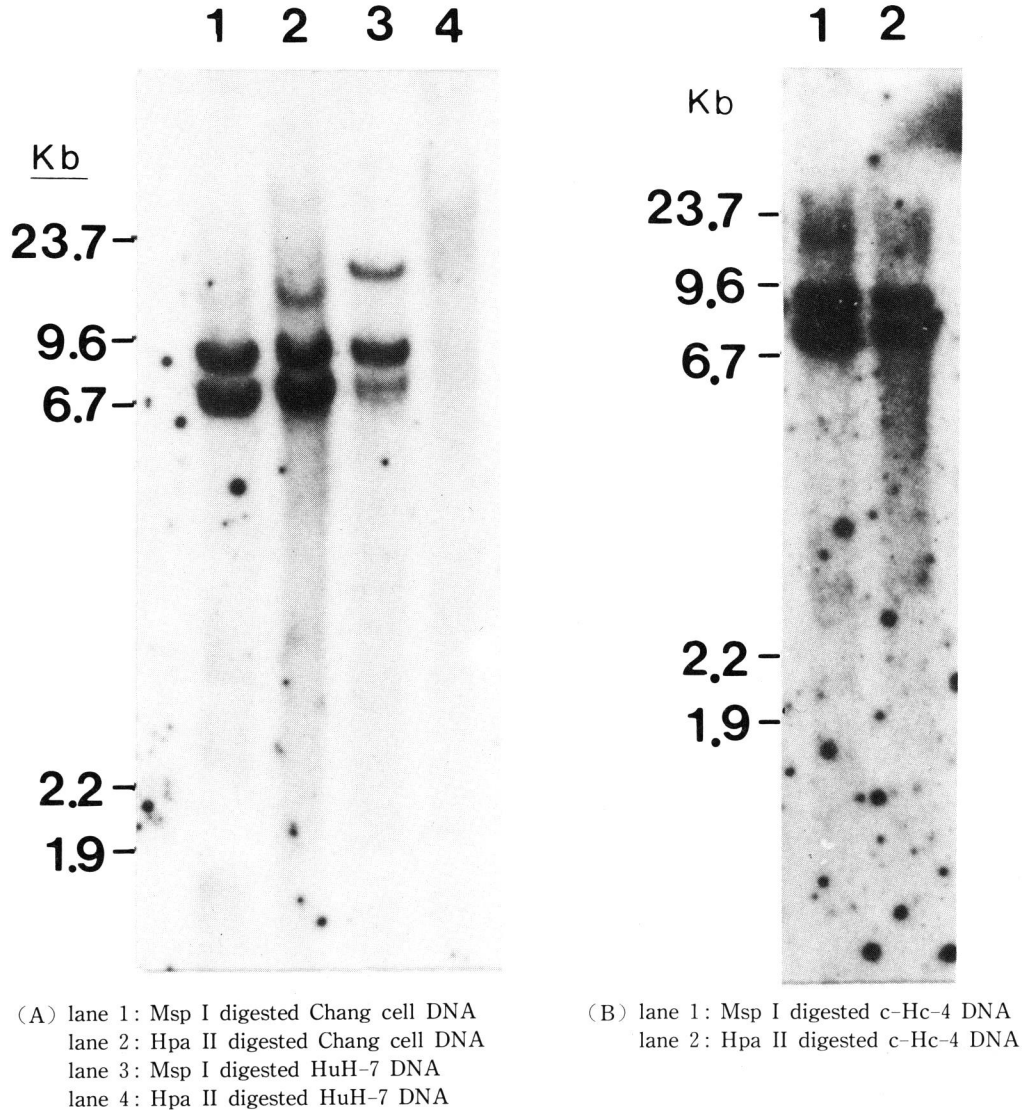


Fig. 11 Southern blot analysis of albumin gene.

は、この内側の C がメチル化されていないことを示している。

次に HuH-7 細胞において、5-AzaC によるメチル化抑制の検討を Southern blotting で行なったところ、Fig. 12 に示すように、5-AzaC 添加前には *Hpa* II 消化により認められなかったバンドが、5-AzaC を除去して 4 週後において、16 kb、8.4 kb 及び 7.0 kb の 3 本のバンドが *Hpa* II 消化によって得られた。しかし 6 週後においては、*Hpa* II 消化により、添加前と同様 20 kb 以上でスメアとなり、この遺伝子が再度メチル化をおこしたことを示している。このことは 5-AzaC のメチル化抑制には限度があることを示し、5-AzaC の効力がな

くなると、遺伝子は再度メチル化することを示している。

4 考 察

ヒトにおいて DNA のメチル化は、大部分がグアニンの 5' 側に位置するシトシンが、DNA methyltransferase により 5-methylcytosine になることによりおこる⁵⁾。このメチル化の生物学的意義については現在なお未知の部分が多い。しかしシトシンのメチル化により、DNA の高次構造に変化をきたし、DNA 結合蛋白質の親和性に影響を与え、最終的には遺伝子発現の調節に関与している可能性が指摘されている⁵⁾。これに基づき、

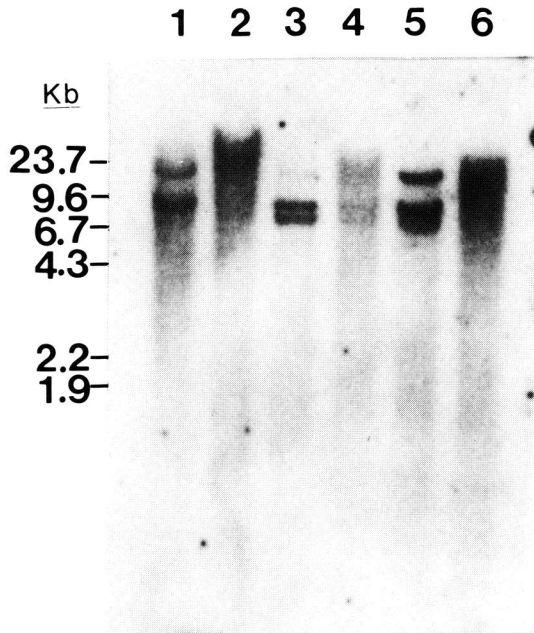


Fig. 12 Southern blot analysis of albumin gene. HuH-7 was treated with 5-AzaC 50 μ M for 4 days and then cultured without 5-AzaC.
 lane 1: Msp I digested HuH-7 control DNA
 lane 2: Hpa II digested HuH-7 control DNA
 lane 3: Msp I digested HuH-7 DNA, 4wks after removal
 lane 4: Hpa II digested HuH-7 DNA, 4wks after removal
 lane 5: Msp I digested HuH-7 DNA, 6wks after removal
 lane 6: Hpa II digested HuH-7 DNA, 6wks after removal

多くの動物及びウィルス遺伝子についてその活性とメチル化との関係が調べられ、非活性遺伝子ほど高頻度にメチル化されていることが明らかになり、DNAのメチル化は遺伝子活性を抑制する方向に働くと考えられている⁹⁾。これを実験的に証明する方法として(1) DNAのSouthern blotting, (2)メチル化DNAのtransformation²⁵⁾ないしその細胞核内へのmicroinjection²⁶⁾, (3)5-AzaCによる遺伝子のメチル化抑制の3つが考えられるが、本研究においてはSouthern blotting及び5-AzaCの2つを用い、培養ヒト癌細胞におけるDNAのメチル化と遺伝子発現について主として癌胎児性蛋白遺伝子を対象にして検討を加えた。

AFP及びアルブミン遺伝子は、ヒトではともに第4染色体上にあり、またAFPはアルブミンの胎児型といわれるように、塩基配列の相同性が高い²⁷⁾。本研究においてはまずこれらの2種の蛋白質について5-AzaC投

与による影響を検討した。その結果、HuH-7細胞においては、DNAのメチル化を抑制する5-AzaC投与より両者とも一時的に減少傾向を示しその後回復を示した。

この点DNAのメチル化が遺伝子発現を抑制するとの仮説^{5,7)}に従うと、HuH-7細胞においても、c-Hc-4細胞のようにアルブミン及びAFP遺伝子の発現が誘導されることが予想された。しかしHuH-7細胞では一時的な減少を示し、予想と反する結果が得られた。この点Cook and Chiu²⁹⁾は、ラット新生仔の腹腔内に5-AzaCを投与し、肝におけるAFP遺伝子の発現を検索した結果において、AFPの血中レベル及びmRNAの減少を認めている。新生仔においては、成長につれAFPは減少するため、5-AzaCの効果のみとは断定しにくい。Cook and Chiuは5-AzaCがメチル化を抑制することにより、間接的にAFP遺伝子の発現を抑制したと考えている。

そこで遺伝子におけるメチル化をMsp I及びHpa IIの実験系を用いたSouthern blottingにより検討した。それによるとアルブミン及びAFPを高濃度に産生するHuH-7細胞において2つの遺伝子はhypermethylationの状態にあり、無ないし低産生性のChang細胞及びc-Hc-4細胞においてはhypomethylationの状態、上記の仮説と反する結果が得られた。このMsp I及びHpa IIの系を用いたこれまでの報告によると、マウスにおいては、AFP遺伝子のメチル化の程度はAFP非産生組織より低いことが示されており、AFP遺伝子の発現とメチル化の間には逆の相関があるとされている⁹⁾。しかしラットにおいて、正常(adult)肝及びAFP産生肝癌ではマウスと同様であるが、胎仔肝においては、AFP遺伝子のtranscriptional unitのほとんどすべてがメチル化されているにもかかわらずAFP遺伝子を発現しており、遺伝子の脱メチル化は遺伝子の活性化に必須ではないとの報告がある⁹⁾。またラットアルブミンについてもこれと同様の報告¹⁰⁾があり、今回の成績からは、培養ヒト癌細胞においてもアルブミン及びAFPに関してこの方法で検索されるDNAのメチル化と遺伝子発現の間には直接的な関連性はないものと考えられた。

しかしMsp I及びHpa IIの系ではCCGGのメチル化のみを検索しており、他の塩基配列におけるCGのメチル化については検索し得ない点注意を要する。仔牛肝においてTCGAのCは60%メチル化されているとの報告²⁹⁾もあり、アルブミン及びAFP遺伝子発現の調節にTCGA等CCGG以外のsequenceの5-methylcytosineが関与している可能性は否定できない。

また5'末端のCCGGが脱メチル化していることがラットにおいてアルブミン遺伝子の発現に必要である³⁰⁾とか、遺伝子の発現には promoter/leader 及び5'-regionの脱メチル化が必要な adenovirus³¹⁾の例からみて、今回の検索に用いた cDNA プローブがハイブリダイズできない部分、すなわち遺伝子より上流に存在すると考えられている promoter ないし enhancer などのメチル化がアルブミン及び AFP の遺伝子発現に大きく関与しており、むしろ遺伝子部分のメチル化よりもその発現に支配的な影響力をもつ場合がありうるということが推測される。つまり HuH-7 細胞では promoter ないし enhancer が脱メチル化されており、それにより遺伝子が活性化され、Chang 細胞及び c-Hc-4 細胞ではこれらの部分がメチル化され、遺伝子発現が抑制されている可能性も推測されよう。

次に AFP と並び代表的な癌胎児性蛋白である CEA についてもメチル化と遺伝子発現について検討した。

CEA に対するプローブはいまだ存在せず、本研究においてはまず、推定されるコドンの組み合わせが少ない CEA の N 端から 13-17 番目のアミノ酸に対応する oligonucleotide を primer とし、CEA 産生性 BM 314 細胞の mRNA を鋳型として、逆転写酵素を用いて primer extension により得た産物を CEA プローブとして用いた。このプローブは BM 314 細胞の mRNA と強く反応し、少量の CEA を産生する HuH-7 細胞とはわずかに反応することが認められた。5-AzaC 添加後の mRNA との反応性より、脱メチル化により、BM 314 細胞では発現が抑制され HuH-7 細胞では一時的に発現が誘導され、CEA も AFP と同様遺伝子発現にメチル化が関与していることが示唆された。またこのプローブを用い Northern blotting によりハイブリダイズする mRNA のサイズを決定したところ 2.2 kb であった。2.2 kb の mRNA はおよそ 72,000 の分子量の peptide を code するが、CEA の分子量を 180,000~200,000 とし、carbohydrate の含有量が約 60% と考えると、この mRNA は CEA の peptide にはほぼ匹敵する妥当な大きさと考えられる。

CEA mRNA に関する報告はいまだ確実なものがないが、mRNA のサイズについて、Zimmerman *et al.*³²⁾ は、直腸癌より mRNA を分離、さらにショ糖密度勾配により分離精製しウサギ網状赤血球系において CEA peptide を合成させ mRNA サイズを決定したところ 2.5 kb であったとしている。本研究において用いた 2.2 kb の mRNA とハイブリダイズするプローブは今後 CEA の遺伝子をクローニングをするに際し、有効なプロ

ブとなると思われる。

HuH-7 細胞の AFP、CEA 及びアルブミンについて 5-AzaC の効果は一時的であった。5-AzaC のメチル化抑制は、5-AzaC がシトシンの代りに DNA 内に組み込まれメチル基受容体となり得ないというより、むしろ 5-AzaC が methyltransferase 活性を抑制し、そのため DNA がメチル化されないという機構が主体と考えられる³³⁾。この methyltransferase 活性は、5-AzaC 除去後 24 時間以内に回復するとの報告³³⁾や、E. coli を用いた実験では 5-AzaC 除去後 7 世代を経て回復するとの報告³⁴⁾がある。HuH-7 細胞の doubling time は約 2 日³⁵⁾であり、methyltransferase 活性は 5-AzaC 除去後 2 週以上経過して回復している可能性がある。

またこの methyltransferase は、hemimethylated double-stranded DNA をメチル化するのみでなく、unmethylated double-stranded DNA をメチル化する *de novo* methyltransferase としての活性も有している³⁶⁾したがって、5-AzaC 除去後 2 週以上経過して活性が回復した HuH-7 細胞の methyltransferase が unmethylated double-stranded DNA を徐々にメチル化し、遺伝子活性が回復あるいは再度抑制されたと思われる。

以上 DNA のメチル化と遺伝子発現について考察を加えたが、DNA のメチル化は遺伝子活性の抑制方向に働くというこれまでの考えに対しては否定的な見解を示すいくつかの報告があるが、本研究においてもその説を支持し得ない成績が得られた。DNA のメチル化の生物学的意義の解明には今後さらに研究が必要であると思われる。

5 結 論

DNA のメチル化が遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため、培養液に DNA のメチル化を阻害する 5-AzaC を添加しその後ヒト培養細胞において AFP、CEA 及びアルブミン遺伝子発現への影響を検索し次の成績を得た。

1. AFP 及びアルブミンを高濃度に産生する肝癌細胞 HuH-7 において、5-AzaC 添加により両者の蛋白及び mRNA の産生は 3-4 週後に減少した。しかしこの効果は一時的で 6-7 週までに回復した。CEA mRNA はこれとは逆に 2-4 週をピークに増加、その後減少し 6-7 週までに元に復した。

2. AFP 及びアルブミン低産生性肝癌細胞 c-Hc-4 において 5-AzaC 添加により AFP 及びアルブミンの蛋白及び mRNA は増加した。

3. ヒト大腸癌細胞 BM 314 において 5-AzaC は CEA mRNA を減少させ、さらに AFP 及びアルブミンの蛋白及び mRNA を減少させた。

4. したがって 5-AzaC は mRNA 量の調節によって蛋白量を変化させていると考えられ、AFP 及びアルブミン遺伝子のみならず CEA 遺伝子の発現にも DNA のメチル化は誘導あるいは抑制の影響を与えることが示唆された。

5. HuH-7 細胞, c-Hc-4 細胞及び Chang 細胞の DNA の Southern blotting により, AFP 及びアルブミン遺伝子の発現は制限酵素 *Msp* I 及び *Hpa* II で解析される DNA のメチル化の程度とは直接的な関連性はないと考えられた。

6. CEA の N 端から 13-17 番目のアミノ酸と対応して合成された oligonucleotide を逆転写酵素により延長し, CEA プローブとして用いた。このプローブは Northern blotting において 2.2 kb のサイズで BM 314 細胞の mRNA とハイブリダイズした。2.2 kb の mRNA は分子量約 72,000 の polypeptide を code するので, CEA の polypeptide 部分の分子量とはほぼ匹敵しており, そのためこのプローブは CEA mRNA とハイブリダイズしている可能性が高く, 今後 CEA のクローニングに応用できると考えられる。

謝 辞

本研究は National Cancer Institute of Canada 及び Medical Research Council of Canada からの研究費 (玉置) 並びに文部省科学研究費がん特別研究谷内班の補助による。

また本研究は Alberta Heritage Medical Research Fellow としてカルガリー大学医学部生化学科玉置研究室において本学内科学第一講座との共同研究として行なわれた。

御指導, 御校閲いただいた本学内科学第一講座谷内昭教授, 研究に際して御指導いただいたカナダカルガリー大学医学部生化学科玉置大器教授及び本講座今井浩三講師並びに御協力いただいた諸先生に謝意を表します。

文 献

- Constantinides, P. G., Jones, P. A. and Gevers, W.: Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature (London)* **267**, 346-366 (1977).

- Taylor, S. M. and Jones, P. A.: Multiple new phenotypes induced in 10T 1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* **17**, 771-779 (1979).
- Charache, S., Dover, G., Smith, K., Talbot, C. C., Moyer, M. and Boyer, S.: Treatment of sickle cell anemia with 5-azacytidine results in increased fetal hemoglobin production and is associated with nonrandom hypomethylation of DNA around the γ - δ - β -globin gene complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4842-4846 (1983).
- Ley, T. J., DeSimone, J., Anagnou, N. P., Keller, G. H., Humphries, R. K., Turner, P. H., Young, N. S., Heller, P. and Nienhuis, A. W.: 5-azacytidine selectively increases γ -globin synthesis in a patient with β^+ -thalassemia. *N. Eng. J. Med.* **307**, 1469-1475 (1982).
- Riggs, A. D. and Jones, P. A.: 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* **40**, 1-30 (1983).
- Jones, P. A. and Taylor, S. M.: Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* **20**, 85-93 (1980).
- Razin, A. and Riggs, A. D.: DNA methylation and gene function. *Science* **210**, 604-610 (1980).
- Andrews, G. K., Dziadek, M. and Tamaoki, T.: Expression and methylation of the mouse α -fetoprotein gene in embryonic, adult, and neoplastic tissues. *J. Biol. Chem.* **257**, 5148-5153 (1982).
- Vedel, M., Gomez-Garcia, M., Sala, M. and Sala-Trepat, J. M.: Changes in methylation pattern of albumin and α -fetoprotein genes in developing rat liver and neoplasia. *Nucl. Acids Res.* **11**, 4335-4354 (1983).
- Kunnath, L. and Locker, J.: Developmental changes in the methylation of the rat albumin and α -fetoprotein genes. *EMBO J.* **2**, 317-324 (1983).
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. and Sato, J.: Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* **42**, 3858-3863 (1982).
- 桑原武彦: ヒト肝癌のヌードマウスへの移植に関する研究. *肝臓* **21**, 303-315 (1980).
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299 (1979).
- Aviv, H. and Leder, P.: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromato-

- graphy on oligothymidylic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 1408-1412 (1972).
15. Urano, Y., Sakai, M., Watanabe, K. and Tamaoki, T.: Tandem arrangement of the albumin and α -fetoprotein genes in the human genome. *Gene* **32**, 255-261 (1984).
 16. Morinaga, T., Sakai, M., Wegmann, T. G. and Tamaoki, T.: Primary structures of human α -fetoprotein and its mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 4604-4608 (1983).
 17. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.: technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13 (1983).
 18. Land, H., Grez, M., Hauser, H., Lindenmaier, W. and Schütz, G.: 5'-Terminal sequences of eucaryotic mRNA can be cloned with high efficiency. *Nucl. Acids Res.* **9**, 2251-2266 (1981).
 19. Thomas, P. S.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 5201-5205 (1980).
 20. Blin, N. and Stafford, D. W.: A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* **3**, 2303-2308 (1976).
 21. Jentsch, S., Günthert, U. and Trautner, T. A.: DNA methyltransferases affecting the sequence 5' CCGG. *Nucl. Acids Res.* **9**, 2753-2759 (1981).
 22. Busslinger, M., deBoer, E., Wright, S., Grosveld, F. G. and Flavell, R. A.: The sequence GGCCGG is resistant to *Msp*I cleavage. *Nucl. Acids Res.* **11**, 3559-3569 (1983).
 23. Keshet, E. and Cedar, H.: Effect of CpG methylation on *Msp*I. *Nucl. Acids Res.* **11**, 3571-3580 (1983).
 24. Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517 (1975).
 25. McGeedy, M. L., Jhappan, C., Ascione, R. and Vande Woude, G. F.: In vitro methylation of specific regions of the cloned moloney sarcoma virus genome inhibits its transforming activity. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 305-314 (1983).
 26. Waechter, D. E. and Baserga, R.: Effect of methylation on expression of microinjected genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 1106-1110 (1982).
 27. 玉置大器: α -フェトプロテイン遺伝子の構造と発現. *癌と化学療法* **10**, 623-630 (1983).
 28. Cook, J. R. and Chiu, J. F.: Effect of 5-azacytidine on rat liver alpha-fetoprotein gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**, 939-944 (1983).
 29. Sano, H. and Sager, R.: Tissue specificity and clustering of methylated cytosines in bovine satellite I DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 3584-3588 (1982).
 30. Ott, M. O., Sperling, L., Cassio, D., Levilliers, J., Sala-Trepat, J. and Weiss, M. C.: Undermethylation at the 5' end of the albumin gene is necessary but not sufficient for albumin production by rat hepatoma cells in culture. *Cell* **30**, 825-833 (1982).
 31. Kruczek, I. and Doerfler, W.: The unmethylated state of the promoter/leader and 5'-regions of integrated adenovirus genes correlates with gene expression. *EMBO J.* **1**, 409-414 (1982).
 32. Zimmermann, W., Friedrich, R., Grunert, F., Luckenbach, G. A., Thompson, J. and von Kleist, S.: Characterization of messenger RNA specific for carcinoembryonic antigen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **417**, 21-30 (1983).
 33. Creusot, F., Acs, G. and Christman, J. K.: Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J. Biol. Chem.* **257**, 2041-2048 (1982).
 34. Friedman, S. and Cheong, L. C.: Effect of 5-azacytidine on deoxyribonucleic acid methylation in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 2675-2679 (1984).
 35. Nakabayasi, H., Taketa, K., Yamane, T., Miyazaki, M., Miyano, K., and Sato, J.: Phenotypic stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium. *Gann* **75**, 151-158 (1984).
 36. Taylor, S. M. and Jones, P. A.: Mechanism of action of eukaryotic DNA methyltransferase. *J. Mol. Biol.* **162**, 679-692 (1982).

別刷請求先:

(〒 060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 東出俊之