

消化器癌発癌機構の最近の進歩

Molecular Mechanism of Carcinogenesis
Involving Aberrant DNA Methylation

札幌医科大学 内科学第一講座 伊東 文生

がんの発生と進展には、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異が蓄積することが重要であると考えられている。APCやp53などのがん抑制遺伝子が、遺伝子の発現を正あるいは負に調節するマスター遺伝子であることが明らかとなり、遺伝子発現調節の異常は、がん化において重要な役割を果たすと考えられる。近年、遺伝子の異常メチル化が、がん抑制遺伝子の不活化の機構として注目されている。遺伝子の5'領域に存在するCpG islandは、正常組織においては遺伝子の発現の有無に関わらずメチル化を受けない¹⁾。しかし、がんにおいてはCpG islandのメチル化によりさまざまな遺伝子の発現が消失している。遺伝子がメチル化により不活化されている場合、その多くは遺伝子の変異や欠失を伴わず、メチル化が遺伝子不活化の重要な機構と考えられる。よってメチル化の異常は単にがん化に付随する二次的な現象ではなく、がんの発生と進展に非常に重要な役割を果たしていると考えられる。本稿では、がん化におけるDNAメチル化の異常に関する最近の知見について概説する。

遺伝子の異常メチル化とがんとの関係で最初に見いだされたのは、がん細胞のメチル化レベルが全体として低下する (hypomethylation) という事実であった²⁾。また、DNMT1ノックアウトマウスでは、遺伝子変異や欠失などの頻度が上昇することから、DNAのメチル化の低下が遺伝子不安定

性を起こす可能性が示唆された³⁾。一方、DNMT1 +/- マウスとApc遺伝子の変異を有するminマウスを掛け合わせるにより、大腸腫瘍の数が低下すること⁴⁾、各種がんにおいてメチルトランスフェラーゼ (DNMTs) の発現が上昇していることから⁵⁾、メチル化は腫瘍の発生に重要であるという相反する結果が得られている。1995年に、細胞周期制御遺伝子であるp16INK4Aの異常メチル化により遺伝子が不活化されていることが見いだされて以来、遺伝子のプロモーター領域のメチル化が、がん抑制遺伝子の不活化の機構として注目を集め始めた⁶⁾。これまで接着分子であるE-Cadherinやミスマッチ修復遺伝子hMLH1、家族性乳がんの原因遺伝子であるBRCA1のメチル化の異常が相次ぎ報告されている⁷⁾⁻⁹⁾。その後、MSP法やCOBRA、bisulfite-SSCP、methyl-lightなど次々と新しいメチル化検出法が開発され¹⁰⁾⁻¹³⁾、がんにおいてメチル化されている遺伝子の数は急速に増加している。また、血清や喀痰などを用いた診断にも応用され¹⁴⁾、メチル化の異常は新しい腫瘍マーカーとしても有用と考えられるようになってきた。

遺伝子のプロモーターが異常メチル化していることは、メチル化を指標に新たながん抑制遺伝子をクローニングできる可能性が示唆する。われわれは、メチル化しているCpG islandだけを効率よく増幅する方法、methylated CpG island

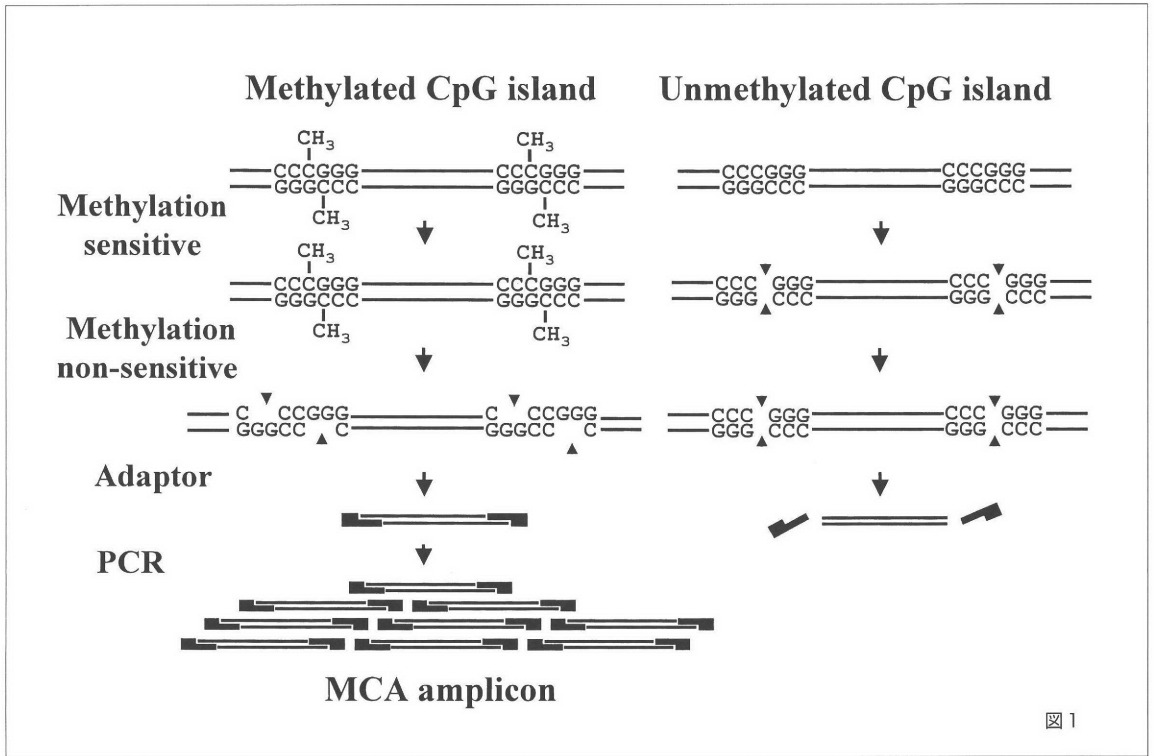


図 1

amplification (MCA) 法を開発した (図 1)。MCA 法により、既知の遺伝子のメチル化を半定量的に解析できるだけでなく、正常組織とがん組織の MCA アンプリコンを用いてサブトラクションを行うことにより、がんで異常メチル化している新しい遺伝子の同定にも応用可能である¹⁵⁾。大腸がんおよび膵がんにおいて異常メチル化している遺伝子断片を約 100 個同定した。それらの遺伝子断片のうち染色体 17q21 にマップされたクローン、MINT31 (methylated in tumor 31) の近傍から、カルシウムチャンネルをコードする遺伝子 CACNA1G を同定した¹⁶⁾。CACNA1G は大腸がんや胃がん、急性骨髄性白血病においてメチル化により不活化され、発現が消失している。CACNA1G が属する T タイプカルシウムチャンネルはアポトーシスの過程において、ミトコンドリアへのカルシウムイオンの流入に関与すると考えられている¹⁷⁾。他にも restriction landmark genome scanning

(RLGS) 法、methylation-sensitive arbitrarily primed PCR 法、methylation-sensitive RDA 法などを用いて、がんにおいてメチル化している新しい遺伝子同定の試みがなされている^{18) - 20)}。最近、Jones らはメチル化により不活化している新しい遺伝子 TPEF の同定に成功している²¹⁾。

以上のように、CpG island の異常メチル化を指標とした遺伝子クローニングは、成果をあげつつある。しかし、がんにおけるメチル化の異常に関しては、未解決の問題が山積みの状態である。すなわち、(1) メチル化はランダムに起こり growth advantage を持った細胞が selection されるのか？ (2) メチル化される遺伝子とメチル化されない遺伝子にはプロモーターの塩基配列に特徴があるのか？ (3) メチル化の組織特異性を規定する因子は何か？ — これらの疑問を解決するには、メチル化の異常をゲノムレベルで解析する必要がある。

われわれは、MCA 法で得られたクローンのメチ

ル化の状態を多くの大腸癌の臨床材料で検討することにより、methylation profileを作成した。その結果、がんにおいてメチル化しているDNA断片の多くは正常組織においても低レベルではあるがメチル化されており、メチル化レベルは加齢により上昇することが明らかとなった²²⁾。また、一部の膵臓がんにおいてはゲノムワイドなメチル化の異常 (CpG island methylator phenotype, CIMP) が認められ、細胞周期調節遺伝子であるp16INK4Aや血管新生阻害遺伝子であるTHBS1がCIMPの標的遺伝子であることが明らかとなった。さらに、散発性大腸がんや胃がんにおいてmicrosatellite instability (MSI) を示す腫瘍では、CIMPによるミスマッチ修復酵素のメチル化が高率に認められ、エピジェネティックな異常によりジェネティックな異常が起きることを明らかにした²²⁾。このようなゲノムワイドなメチル化の異常はadenomaにおいても認められ、がん化の早期の異常であり、単にがん化の結果蓄積したものではないと考えられた²³⁾。これらの腫瘍におけるk-rasやp53の変異は、CIMPの有無により大きく異なり、エピジェネティック不安定性を有する腫瘍と有しない腫瘍では異なる発がん経路を取ることが示唆された²³⁾。プレリミナリーなデータでは、CIMP + MSI - の大腸がんでは、CGH法により高率に染色体の増幅や欠失を認め、CIMPによりG2/Mのチェックポイントを制御する遺伝子が不活化している可能性が示唆された。これらのデータをもとに、われわれは新しい大腸がんの進展モデルを提唱している。

最近われわれは大腸がんおよび胃がんにおいて、14-3-3sigma 遺伝子がメチル化により不活化されていることを見いだした²⁴⁾。14-3-3sigmaはp53により転写が誘導され、G2/M制御に関与するがん抑制遺伝子であり、エピジェネティックな異常により染色体不安定性が誘導される可能性があり、興味深い。

しかし、CIMPによりメチル化する遺伝子がすべてがん抑制遺伝子として働いている訳ではない。例えば、cyclooxygenase-2 (COX-2) の過剰発現

はアポトーシスの抑制やがん細胞の浸潤転移の促進などを介してがん化に関与しているが、一部の膵臓がんにおいては異常メチル化により発現を認めない²⁵⁾。COX-2を発現しない細胞が他の細胞に比べgrowth advantageを持つとは考えにくいので、COX-2のメチル化はゲノムワイドなメチル化の一部として起こり、その結果発生した腫瘍は、COX-2の関与しないパスウェイによりがん化したと考えられる。その意味では、CIMPは遺伝子のcoding領域だけではなく、ゲノムワイドに繰り返し配列の変異が蓄積するマイクロサテライト不安定性と似た面があると言える。今後、メチル化を指標としたがんの診断や予後の予測への応用が期待される。

これまでのところ、がんにおけるメチル化の異常がどのようにして起こるかのメカニズムに関しては未知の点が多い。遺伝子のプロモーターの異常メチル化とDNMT1、DNMT3A、3Bの発現に相関が認められないことから、がんにおけるメチル化の異常は、単にメチルトランスフェラーゼが過剰発現している結果ではないことが示唆された²⁶⁾。一方で、メチル化が起きた際の遺伝子の発現抑制機構に関しては、急速な進歩が認められる。Birdおよび中尾らのグループは、methylbinding domain (MBD) を有する遺伝子ファミリーを同定し、これらの分子がメチル化DNAに結合し、転写を負に調節することを明らかにした^{27) 28)}。興味深いことに、MBDはヒストン脱アセチル化酵素をリクルートすることにより、クロマチンを凝集させることがメチル化を介した遺伝子発現抑制に重要であることが明らかとなった²⁹⁾。RountreeらはDNMT1のN端が転写抑制作用を有し、またHDAC2やDMAP1などの分子と結合することにより、メチル化とは別のメカニズムで遺伝子発現を調節していることを見いだした³⁰⁾。また、Robertsonらも、DNMT1がHDAC1、Rbと結合することを報告している³¹⁾。またMyohanenらは、メチル化のないp16INK4Aプロモーターにのみ結合するタンパク質をFur Western Blot法により同定した。

興味深いことに、少なくとも結合分子のひとつは RNA helicase であり、メチル化している p16INK4A プロモーターには結合していなかった。RNA helicase がメチルトランスフェラーゼのプロモーターへのアクセスを阻害している可能性があり興味深い。

最近われわれは、bisulfite-sequence による 16INK4A、hMLH1、CACNA1G、COX-2 における、メチル化レベルの詳細なマッピングの結果、プロモーター近傍 (CpG island のボーダー) のメチル化が加齢により増加していることを見いだした。加齢によるメチル化は大腸がんでメチル化されない遺伝子である、KAI1 や MSH2 においては認められないことから、遺伝子の異常メチル化に対する感受性を規定する重要な因子と考えられる。

最近、cDNA アレイなどを用いたゲノム解析技術の進歩により、がんにおける遺伝子の発現プロファイルが明らかになりつつある。しかし、がんにおいて発現が低下している遺伝子がメチル化によって発現低下あるいは消失しているのか、ある

いは p53 などの転写に参与する遺伝子の発現の結果発現が低下しているのかでは、その意義は大きく異なる。p53 の標的遺伝子がメチル化により発現が低下している場合には、P53 の遺伝子導入は無効であり、メチル化阻害剤が有効と考えられる。これまでは、がんにおける遺伝子異常といえば、変異や欠失、増幅に関する解析が主であった。今後、遺伝子 (DNA、クロマチン) を修飾する分子の変化により起こる、エピジェネティックな異常の解析が、発がん機構の解明に重要であると考えられる。

[文献]

- 1) Macleod D et al : Mol Cell Biol (1998) 18 : 4433-4443
- 2) Feinberg AP et al : Nature (1983) 301 : 89-92
- 3) Chen RZ et al : Nature (1998) 395 : 89-93
- 4) Laird PW et al : Cell (1995) 81 : 197-205
- 5) Issa JP et al : Proc Natl Acad Sci USA (1993) 85 : 1235-1240
- 6) Herman JG et al : Cancer Res (1995) 55 : 4525-4230
- 7) Yoshiura K et al : Proc Natl Acad Sci USA (1995) 92 : 7416-7419
- 8) Dobrovic A et al : Cancer Res (1997) 57 : 3347-3350
- 9) Kane MF et al : Cancer Res (1997) 57 : 808-811
- 10) Herman JG et al : Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93 : 9821-9826
- 11) Xiong Z et al : Nucleic Acids Res (1997) 25 : 2532-2534
- 12) Suzuki H et al : Electrophoresis (2000) 21 : 904-908
- 13) Eads CA et al : Nucleic Acids Res (2000) 28 : E32
- 14) Esteller M et al : Cancer Res (1999) 59 : 67-70
- 15) Toyota M et al : Cancer Res (1999) 59 : 2307-2312
- 16) Toyota M et al : Cancer Res (1999) 59 : 4535-4541
- 17) Berridge MJ et al : Nature (1998) 395 : 645-648
- 18) Costello JF et al : Nat Genet (2000) 24 : 132-138
- 19) Gonzalzo ML et al : Cancer Res (1997) 57 : 594-599
- 20) Ushijima T et al : Proc Natl Acad Sci USA (1997) 94 : 2284-2289
- 21) Liang G et al : Cancer Res (2000) 60 : 4907-4912
- 22) Toyota M et al : Proc Natl Acad Sci USA (1999) 96 : 8681-8686
- 23) Toyota M et al : Proc Natl Acad Sci USA (2000) 97 : 710-715
- 24) Suzuki H et al : Cancer Res (2000) 60 : 4353-4357
- 25) Toyota M et al : Cancer Res (2000) 60 : 4044-4048
- 26) Eads CA et al : Cancer Res (2000) 59 : 2302-2306
- 27) Fujita N et al : Mol Cell Biol (1999) 19 : 6415-6426
- 28) Hendrich B et al : Mol Cell Biol (1998) 18 : 6538-6647
- 29) Bird AP et al : Cell (1999) 99 : 451-454
- 30) Rountree MR et al : Nat Genet (2000) 25 : 269-277
- 31) Robertson KD et al : Nat Genet (2000) 25 : 338-342