

- 17) A. Karrman, B. B. Van, U. Jarnberg, L. Hardell, G. Lindstrom: *Anal. Chem.*, **77**, 864 (2005).
- 18) K. Inoue, F. Okada, R. Ito, M. Kawaguchi, N. Okanouchi, H. Nakazawa: *J. Chromatogr. B*, **810**, 49 (2004).
- 19) K. Inoue, F. Okada, R. Ito, S. Kato, S. Sasaki, S. Nakajima, A. Uno, Y. Saijo, F. Sata, Y. Yoshimura, R. Kishi, H. Nakazawa: *Environ. Health Perspect.*, **112**, 1204 (2004).

---

### 要 旨

近年、新たな環境汚染物質として注目されているパーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) 及び PFOS 関連化合物を対象としたヒト血しょう試料中の一斉分析法について検討した。本研究では、試料前処理法にカラムスイッチング方式を用いたオンライン固相抽出法を採用することで、除タンパクした血しょう試料中のパーフルオロ化合物 (PFCs) を簡便な操作で測定することが可能となった。本法をヒト血しょう試料中 PFCs の分析へ応用した結果、検出限界は、0.08~0.14 ng/ml ( $S/N=3$ ) であり、ヒト血しょう試料中における定量限界は、すべての測定対象化合物において 0.50 ng/ml とした。また、内標準物質にパーフルオロヘプタン酸 (PFHpA) を用いることにより、回収率 93.3% 以上 |相対標準偏差 (RSD)  $\leq$  8.9%| と良好な回収率を得ることができた。このことから、本法は、ヒト血しょう試料中の PFCs の定量に応用できることが明らかとなった。

# 発生・分化とエピジェネティクス

*Epigenetics in differentiation and development*

Key Words ゲノム用語解説85ページ〜

- ⇒ DNAメチル化
- ⇒ 組織特異的メチル化可変領域(T-DMR)
- ⇒ クローン動物
- ⇒ エピ変異原

岩谷美沙<sup>1)</sup>, 大鐘 潤<sup>1)</sup>, 塩田邦郎<sup>2)</sup>

- 1: 東京大学大学院農学生命科学研究科  
獣医学・応用動物科学専攻細胞生化学研究室  
2: 同 獣医学・応用動物科学専攻細胞生化学研究室教授

## はじめに

哺乳類の個体は機能、形態の異なる約 200 種類の細胞から構成されている。細胞は DNA 塩基配列情報の変化なしに、必要な遺伝子群の発現をオン、不必要な遺伝子群の発現をオフにすることで、細胞種ごとに固有の遺伝子発現パターンを形成している。エピジェネティック機構のひとつである DNA のメチル化は遺伝子サイレンシングに重要な役割を果たしており、遺伝子発現のオン・オフを決定する。つまり塩基配列情報のうえに DNA メチル化情報を書きこむ、または消去することで発生時期・細胞種に応じた遺伝子発現を可能にしていると考えられる。

クローン胚の大部分は発生過程で致死となり、誕生にまで至った個体においても異常がみられる。また、薬物などの化学物質によって細胞の形態や機能が変化してしまう現象がしばしばみられる。個体発生、細胞分化の分子基盤としてエピジェネティック機構があることを考慮すると、これらの現象はエピジェネティッ

ク変化に起因する可能性がある。本稿では、個体発生、細胞分化の観点からの DNA メチル化情報の重要性を述べる。

## 組織特異的メチル化可変領域(T-DMR)

哺乳類において、DNA メチル化は主に 5'-CG-3'配列のシトシン残基 5 位で起こり<sup>1,2)</sup>、そのメチル化パターンは細胞分裂後も維持される。DNA はメチル化されると、クロマチン構造の変化をともない遺伝子発現を不活化することが近年明らかとなってきた<sup>3)</sup>。

ゲノム上には CpG 配列が密に存在する領域、CpG アイランドがあり、それらの多くは遺伝子の転写調節領域に存在することが知られている<sup>4,5)</sup>。これまで CpG アイランドは正常組織、細胞ではメチル化されない領域であると考えられていた。しかしわれわれは、以前、正常組織の CpG アイランドにおいて組織特異





分化とエピジェネティクス

各組織、細胞種の DNA メチル化プロファイルを比較することにより、細胞分化にともないさまざまな遺伝子座の DNA メチル化状態が変化することが明らかとなっている。2つの異なる組織または細胞間でメチル化状態に差のある T-DMR の数は VED(Value of epigenetic distance)として定義することができる(図2)。すなわち、VED は2種類の異なるゲノム DNA におけるエピジェネティック情報の違いの度合いを反映している。たとえば、ES 細胞の分化では 108 カ所(メチル化 73 カ所、脱メチル化 35 カ所)の T-DMR で変化がみられるのに対し、TS 細胞の分化では VED が

30(メチル化 15、脱メチル化 15)である。このことは、ES 細胞が胚体を構成するすべての細胞へ分化する能力があるのに対して、TS 細胞は胎盤を構成する数種類の栄養膜細胞系のみへの分化能しか保持していないことを反映していると考えられる。また、胚性生殖幹細胞である EG 細胞は、ES 細胞との比較では VED が 49(メチル化 17、脱メチル化 32)、精子との比較では 81(メチル化 26、脱メチル化 55)であり、VED の点では同じ幹細胞である ES 細胞に近く、むしろ精子とはエピジェネティック情報の違いは大きいことがわかる。このような T-DMR を中心としたエピジェネティック情報の比較は、ある幹細胞の分化能や細胞同士の近縁性を評価するうえでの指標とすることができる。

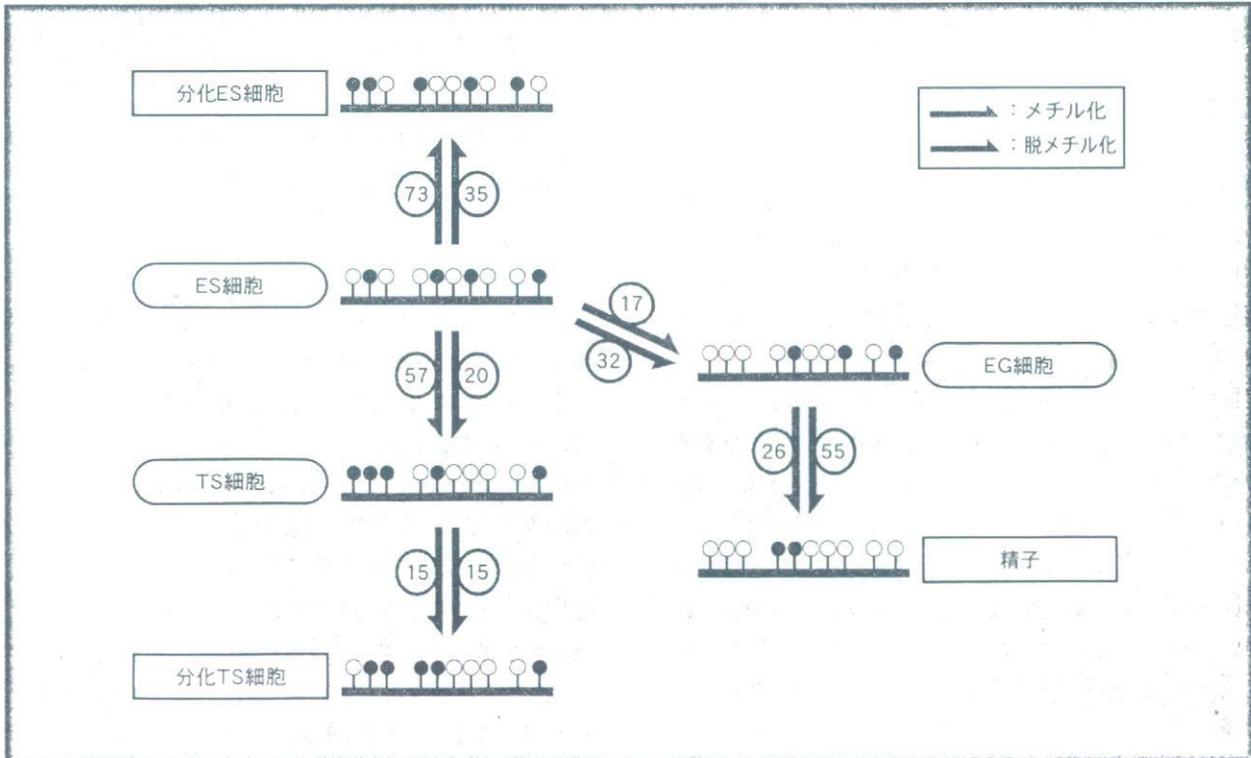


図2 各幹細胞間および幹細胞と分化細胞間のエピジェネティック距離

マウス組織、細胞種の DNA メチル化プロファイルの比較により明らかになった 247 カ所の T-DMR のうち、各幹細胞間、幹細胞と分化細胞間でメチル化状態が変化する領域数を示した。2つの細胞種間のエピジェネティック情報の違いは VED として表すことができる。DNA メチル化からみると、EG 細胞は精子よりもむしろ ES 細胞に近く、また TS 細胞は ES 細胞と異なることが明らかである。

○: 非メチル化 T-DMR, ●: メチル化 T-DMR.

(文献7より改変引用)

### 発生とエピジェネティクス： クローン動物における異常

胎盤過形成はクローン動物で共通してみられる異常である<sup>8,9)</sup>。われわれはこれまでクローン新生児の組織のDNAメチル化プロファイルを解析し、自然交配動物と比較して若干(約0.3%)のDNAメチル化異常があることを検出した<sup>10,11)</sup>。そのうちのひとつであるSall3遺伝子は、発生初期の胎盤細胞においてのみCpGアイランドのT-DMRが顕著にメチル化される。クローン胚の分娩期胎盤において、Sall3遺伝子のT-DMRは異常な高メチル化状態を示し、さらにクローン個体ごとの胎盤重量とSall3遺伝子T-DMRでのDNAメチル化量のあいだには正の相関があることが明らかとなった<sup>12)</sup>。マウスゲノムには約15,500のCpGアイランドをもつ遺伝子が存在しており、クローン動物ではその0.3%にあたる約40の遺伝子にDNAメチル化異常があるとも考えられる(図3)。

さらに、われわれは成体雌のクローン動物のある個体ではX染色体不活化が偏ることも発見した<sup>13)</sup>。通常、哺乳類の雌では胚発生の初期段階において両X染色体が活性状態であるが、その後細胞分化にともなってランダムにどちらか一方のX染色体の不活化が起こる。しかし、クローン動物においてはドナー細胞の不活化X染色体の不完全な消去のみならず、ランダムに起こるはずのX染色体不活化の偏りがみられた。

このように、クローン動物ではDNAメチル化異常やX染色体不活化の偏りといったエピジェネティックレベルでの異常がみられ、ドナー細胞の完全なコピーとはいえないのである。一見正常に発生したようにみえるクローン動物に潜在するDNAメチル化異常が、ある程度の期間を経て現れる肥満や短命などのクローン動物の特徴にも影響を与えている可能性が高い。

### 化学物質とエピジェネティクス： DMSOによるエピジェネティック変化

ゲノムの塩基配列を変化させる物質を変異原と呼ぶ

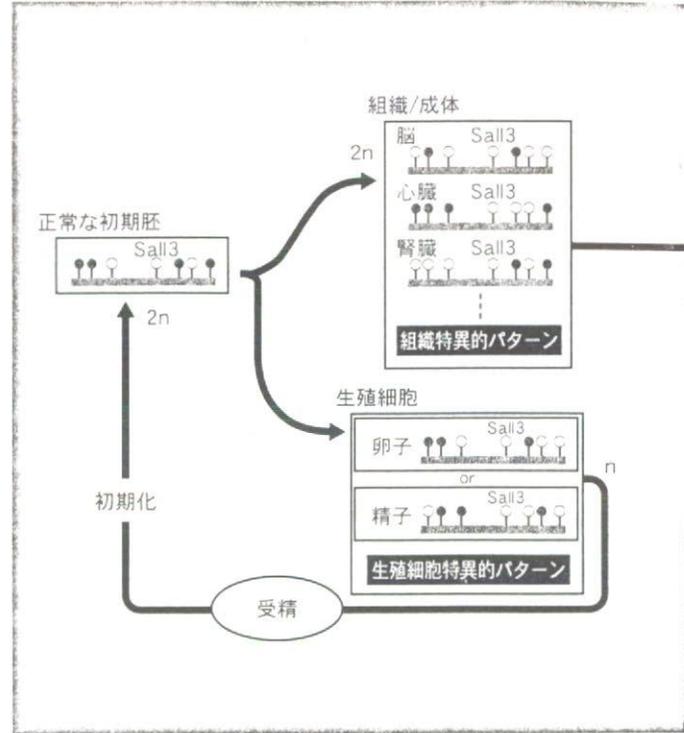
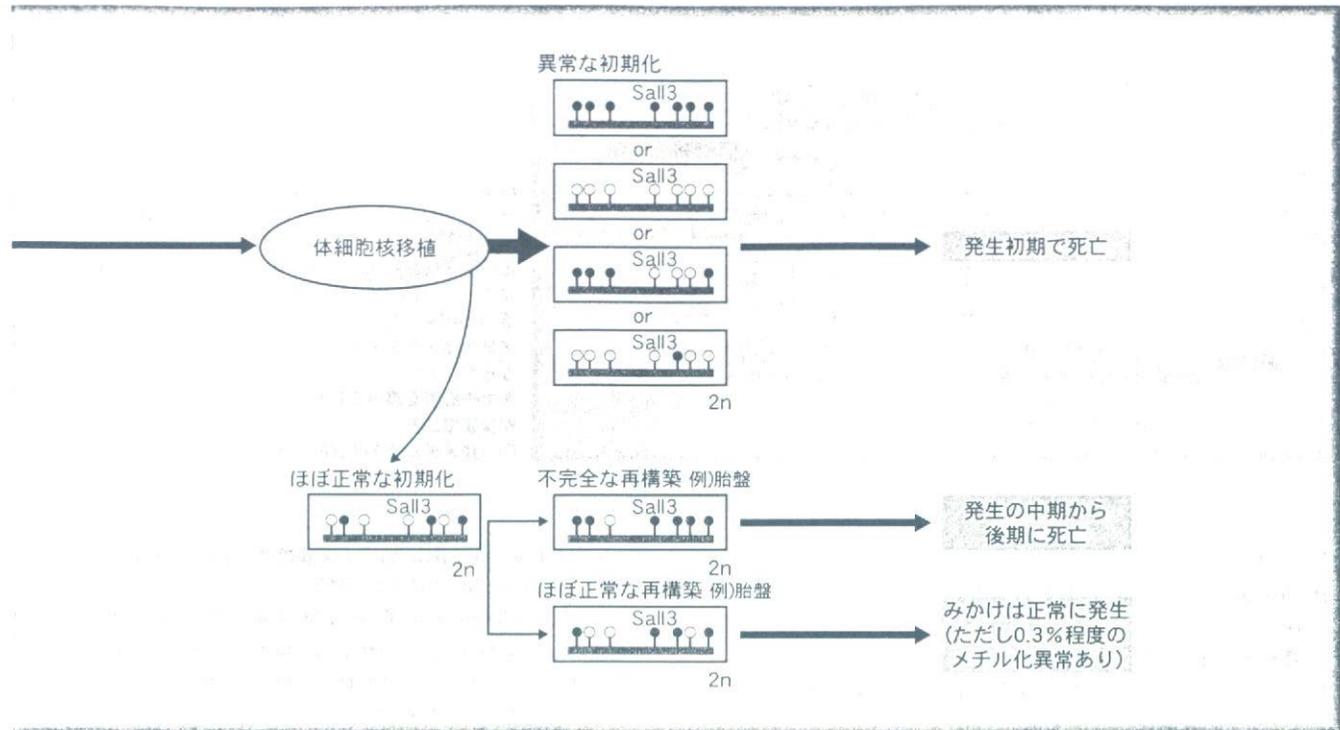


図3 正常発生におけるT-DMRメチル化パターンの変化とクローン胚での異常

○：非メチル化T-DMR，●：メチル化T-DMR。

のに対して、エピジェネティック変化を起こす物質はエピ変異原(Epimutagen)と呼ばれる<sup>14)</sup>。従来の毒理学では、ゲノム機能変化は遺伝子の変異しか考えられていなかった。ジメチルスルホキシド(DMSO)は再生医療のための幹細胞、不妊治療のための生殖細胞や受精卵など細胞の凍結保存で使用されているが、細胞の形態や機能を変えてしまう現象がしばしば観察される<sup>15-17)</sup>。そこでDMSOのエピジェネティック制御系に及ぼす影響を調べてみると、マウスES細胞、およびES細胞を分化させた胚様体においてDNAメチル基転移酵素のひとつであるDnmt3aの発現の上昇が認められた。さらに、ゲノム全域のDNAメチル化状態を解析すると、DMSOはDNAメチル化プロファイルのほとんど(約99%)には影響を与えないが、ある特定の遺伝子座においてはメチル化、脱メチル化をとめないDNA



正常な発生過程では、細胞分化にともなって組織、細胞特異的な DNA メチル化パターンが形成されていく。一方、クローン胚では形成されていた細胞特異的なメチル化パターンを初期胚型に変換することができず、大部分が比較的発生初期で致死となる。初期胚型へ変換できた胚も、その後の組織、細胞特異的なメチル化パターンの形成が不完全であると死んでしまう。ごくわずかの出生にまで至った個体においてさえ、0.3%程度の DNA メチル化異常があると推測される。本図では、胎盤の DNA メチル化パターンを例に示した。また、現時点では DNA メチル化パターンの完全な初期化・再構築が可能かどうかは不明である。(文献 11 より改変引用)

メチル化状態を変化させることが明らかとなった(次頁図 1)(論文投稿中)。近年では DNA メチル基転移酵素、ヒストン修飾酵素などの阻害剤で細胞を処理することにより細胞の形質を不可逆的に変化させることが可能であり、抗癌薬としての役割も注目されつつある<sup>18,19)</sup>。しかしながら、現在のところ、このようなエピ変異原についての評価系は確立されていない。薬物の予せぬ副作用のみならず、主作用の解明にも従来のパラダイムに加えてエピジェネティック解析が重要であることは間違いない。

おわりに

クローン動物における、また化学物質による DNA メチル化状態の変化と表現型との相関は、エピジェネティック制御が個体発生や細胞分化において重要な役

割を担っていることを示している。これまで再生医療用などの細胞種の同定では、形態的な特徴および特定の mRNA、蛋白質または糖鎖など細胞内で作られる数種類の分子のみを指標として用いている。本稿で示したとおり、T-DMR による DNA メチル化解析では数百のゲノム領域において解析可能であり、新しい細胞の同定法として期待される。エピジェネティック情報はこのような細胞の正常性評価に加え、化学物質(薬剤、環境汚染物質など)のリスクアセスメント、病気の診断、創薬標的探索など多岐にわたる応用が見込まれる。今後、ヒト、実験動物(マウス、ラット)、家畜などのゲノム全域を対象としたエピジェネティック情報の解析とデータベース整備が重要であり、ポストゲノム時代においてエピジェネティクスは生命科学領域の基盤となるはずである。

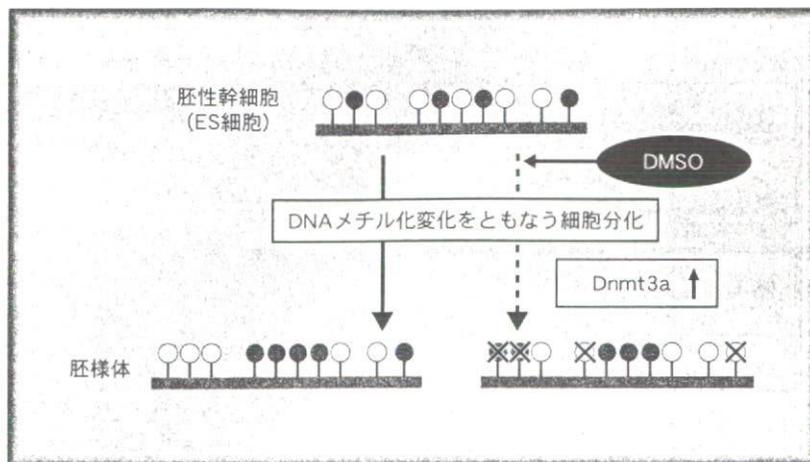


図4 DMSOがエピジェネティック制御系に及ぼす影響

組織、細胞がもつ固有のDNAメチル化プロファイルはDNAメチル転移酵素、ヒストン修飾酵素などを含むさまざまなエピジェネティック制御因子によって形成、維持されている。DMSO処理によって、DNAメチル転移酵素のひとつであるDnmt3aの発現が上昇し、さらに細胞のDNAメチル化プロファイルが変化することが明らかとなった。このように、化学物質によるゲノムレベルでの影響を調べるにはエピジェネティック解析が重要である。

○：非メチル化T-DMR，●：メチル化T-DMR。

### References

- 1) Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H, Razin A : Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett* 124 : 67-71, 1981
- 2) Ehrlich M, Wang RY : 5-Methylcytosine in eukaryotic DNA. *Science* 212 : 1350-1357, 1981
- 3) Li E : Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3 : 662-673, 2002
- 4) Gardiner-Garden M, Frommer M : CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196 : 261-282, 1987
- 5) Cross SH, Bird AP : CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev* 5 : 309-314, 1995
- 6) Imamura T, Ohgane J, Ito S et al : CpG island of rat sphingosine kinase-1 gene : tissue-dependent DNA methylation status and multiple alternative first exons. *Genomics* 76 : 117-125, 2001
- 7) Shiota K, Kogo Y, Ohgane J et al : Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells* 7 : 961-969, 2002
- 8) Wakayama T, Yanagimachi R : Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nat Genet* 22 : 127-128, 1999
- 9) Tanaka S, Oda M, Toyoshima Y et al : Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol Reprod* 65 : 1813-1821, 2001
- 10) Ohgane J, Wakayama T, Kogo Y et al : DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 30 : 45-50, 2001
- 11) Shiota K, Yanagimachi R : Epigenetics by DNA methylation for development of normal and cloned animals. *Differentiation* 69 : 162-166, 2002
- 12) Ohgane J, Wakayama T, Senda S et al : The Sall3 locus is an epigenetic hotspot of aberrant DNA methylation associated with placentomegaly of cloned mice. *Genes Cells* 9 : 253-260, 2004
- 13) Senda S, Wakayama T, Yamazaki Y et al : Skewed X-inactivation in cloned mice. *Biochem Biophys Res Commun* 321 : 38-44, 2004
- 14) Holliday R : Mutations and epimutations in mammalian cells. *Mutat Res* 250 : 351-363, 1991
- 15) Zaheer HA, Gibson FM, Bagnara M et al : Differential sensitivity to cryopreservation of clonogenic progenitor cells and stromal precursors from leukemic and normal bone marrow. *Stem Cells* 12 : 180-186, 1994
- 16) Bouquet M, Selva J, Auroux M : Effects of cooling and equilibration in DMSO, and cryopreservation of mouse oocytes, on the rates of in vitro fertilization, development, and chromosomal abnormalities. *Mol Reprod Dev* 40 : 110-115, 1995
- 17) Si W, Zheng P, Li Y et al : Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm. *Am J Primatol* 62 : 301-306, 2004
- 18) Goffin J, Eisenhauer E : DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Ann Oncol* 13 : 1699-1716, 2002
- 19) Yoshida M, Furumai R, Nishiyama M et al : Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 48 : S20-S26, 2001

# DNAのメチル化と疾患

## 栄養性因子, 薬剤, および胎生期の影響



John Greally, 前田千晶, 塩田邦郎

細胞は分化段階に応じて、発現する遺伝子を使い分けている。同じDNAの配列情報をもとに細胞に即した遺伝子発現を行うためには、塩基配列とは違う次元の制御が必要である。エピジェネティクス制御系は、DNAの塩基配列のカatalogから、必要な情報を選択して利用する機構といってもよい。細胞のエピジェネティック状態は安定ではあるが、正常・異常な状況に応じてダイナミックに変化する。本稿では、DNAのメチル化とヒストン修飾が、栄養性因子、薬剤などで変化することを示し、疾患の原因としての可能性を記す。

**キーワード** ● DNAメチル化, ヒストン化学修飾, CpGアイランド, ゲノムワイドメチル化解析, ヒトエピゲノムプロジェクト

### はじめに

細胞の分化に伴ってDNAのメチル化状態が変化する数多くの遺伝子座が注目を集めている。DNAメチル化はクロマチン構造の変化と関連し、多くの場合、遺伝子は不活性化する。発生・分化に伴った時期・組織特異的な遺伝子発現におけるDNAメチル化の重要性が明らかになってきた。発現時期と抑制時期を比較したプロモーター領域のメチル化解析により、ラットの胎盤性ラクトジェン遺伝子<sup>1)</sup>、ヒトのSERPINB5遺伝子<sup>2)</sup>、マウスのSry遺伝子<sup>3)</sup>などのさまざまな組織・発生時期特異的遺伝子のメチル化による発現制御が示された。エピジェネティクス系の異常は、癌をはじめとする疾患の要因となりうる。臨床治療への応用をめざしたエピジェネティクス研究を加速するためには、ヒトゲノム情報をもとにしたヒトエピゲノムプロジェクトの展開が必要な段階にきている。

### 1 CpG アイランドを含む ゲノム遺伝子領域のDNAのメチル化

ゲノムDNA中の転移因子は高度にメチル化されており、DNAのメチル化はゲノムへの外部遺伝子の侵入を防ぐ機構と位置づけられてきた<sup>4)</sup>。一方、最近まで、CpGアイランドとよばれるCpGが密に存在する領域はメチル化されないと考えられていた。多数の遺伝子領域にCpGアイランドが存在するが、これらの遺伝子はDNAメチル化による制御は受けていないと考えられていたのである。多くの研究がCCGGを認識する制限酵素Hpa II (メチル化感受性)あるいはMsp I (メチル化非感受性)を用いて行われてきた。ゲノムの全塩基配列データをもとにすると、図1に示したように、Hpa IIあるいはMsp I酵素の認識部位の多く(約50%)が遺伝子領域に存在する。しかし、Hpa II/Msp Iの認識部位はCpGアイランドに限定すると10~20%に過ぎない。一方、メチル化感受性酵素Not

#### Dynamic cytosine methylation and human disease

John Greally<sup>1)</sup>/Chiaki Maeda<sup>2)</sup>/Kunio Shiota<sup>3)</sup>; Albert Einstein College of Medicine<sup>1)</sup>/Animal Resource Sciences・Veterinary Medical Sciences, The University of Tokyo<sup>2)</sup> (アルバートアインシュタイン大学<sup>1)</sup>/東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学・獣医学専攻<sup>2)</sup>)

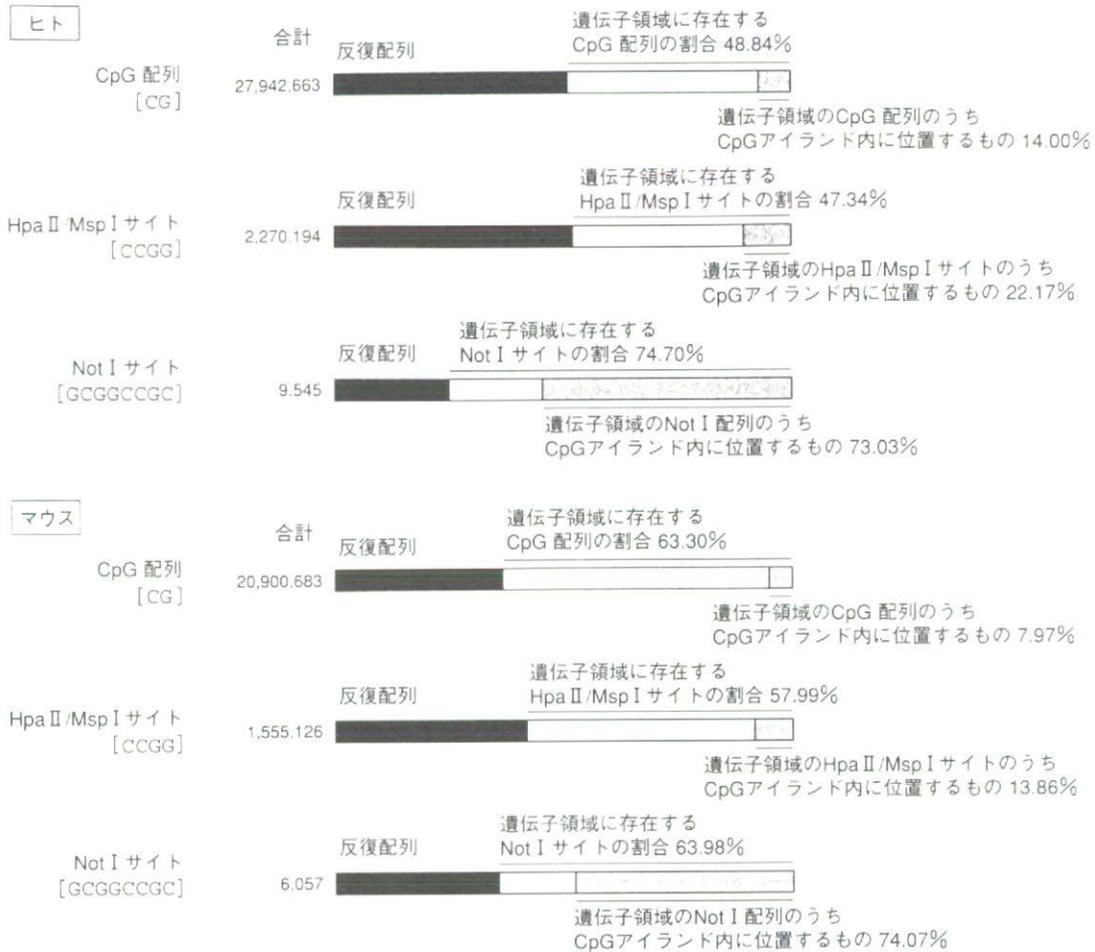


図1 ゲノムDNA上のCpG配列の分布

文献37のデータをもとに、ヒトとマウスにおけるCpG配列、Hpa II/Msp I サイト、Not I サイトのゲノムDNA中の反復配列(黒)と遺伝子領域(白と青)における割合を示す。遺伝子領域に存在するこれらの配列のうち、CpGアイランド内に位置するものの割合を青色で示した。Hpa II/Msp I サイトの大部分はCpGアイランドの外に存在するのに比べ、Not I サイトの7割以上がヒトとマウスのいずれでもCpGアイランド内に存在する。したがって、Not I サイトをランドマークとすることはCpGアイランドの解析に適している。

Iの認識部位(GCGGCCGC)の70%以上は遺伝子領域のCpGアイランド内に存在する。近年、Not Iを用いたゲノムワイドなメチル化スキャンニングによる研究で、多数の組織特異的メチル化領域(T-DMR: Tissue dependent differentially methylated region)がCpGアイランドに見られている<sup>5</sup> (田中らの稿、参照)。個々のT-DMRの同定は、ラットの*Sphk1a*遺伝子<sup>6</sup>をはじめ、数百もの遺伝子座の特定につながっている<sup>7</sup>。ゲノムワイドなDNAメチル化解析は、細胞の分化

状態の維持に重要なエピジェネティクス系、およびこれらの系に影響を及ぼす栄養因子や薬剤について明らかにしてきた。新しいゲノムワイドなメチル化解析手法の開発も進み<sup>8)~11)</sup>、多くの組織のDNAメチル化プロファイルが明らかになるにつれ、特異的なメチル化パターンを示す遺伝子座の同定数は飛躍的に増大するだろう。これらは遺伝子発現制御のしくみ、そして疾患のエピジェネティクスを解明するうえで重要な足がかりとなる。

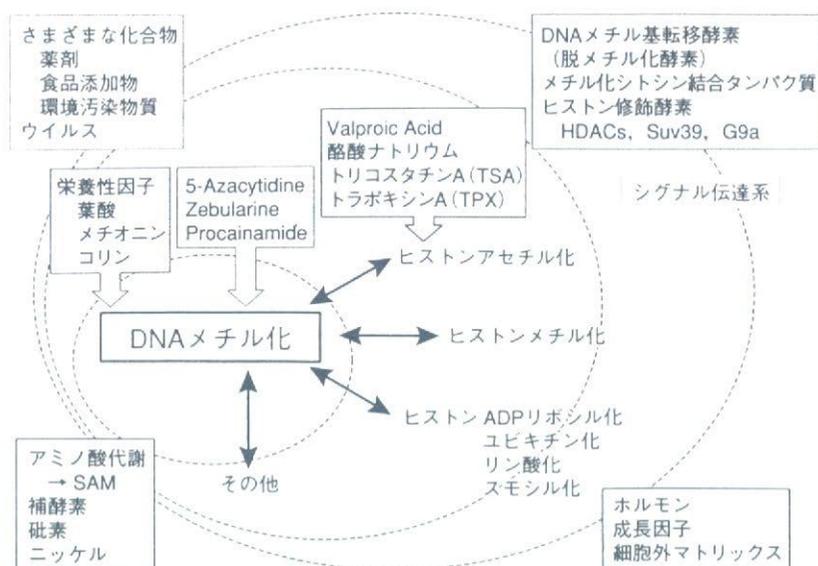


図2 エピジェネティクス系に影響を与える因子

DNAのメチル化とヒストン修飾は主要なエピジェネティック機構であり、互いに密接な関係をもっている。エピジェネティクス制御にかかわる分子は多岐にわたる。DNAメチル基転移酵素、メチル化シトシン結合タンパク質、ヒストン修飾酵素は細胞のエピジェネティック状態を形成する。薬剤をはじめとする化合物や栄養性因子などはこうした細胞の状態に影響を与えることが明らかになりつつある。また、アミノ酸代謝経路やシグナル伝達系といった複数の系がエピジェネティック機構と関係していると考えられる。

## 2 エピジェネティクス制御系へ影響を与える因子

エピジェネティクス制御系の全体像を図2に示した。シトシン残基へのメチル基の転移反応はDNAメチル基転移酵素によって行われる。DNAメチル化酵素活性には、非メチル化シトシンが新たにメチル化される *de novo* メチル化活性と、DNA複製時に親鎖DNA上のメチル化パターンを新生DNA鎖上に写しとる維持型メチル化活性が存在する。脱メチル化は、複製時にDNAメチル化維持が行われない消極的な脱メチル化と、積極的脱メチル化の両方の経路が考えられているが、脱メチル化酵素は現在のところ発見されていない。クロマチン構造はヒストンの化学修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化など）により制御されている。ヒストンのアセチル化はクロマチン構造を緩ませ、脱アセチル化により凝縮する。また、ヒストンのメチル化（ヒストンH3のリジン残基など）は、クロマチン構造

の凝縮に働く。

現在までの解析で、DNAメチル化はクロマチン構造の変化を誘導し、その逆に、ヒストン修飾やクロマチン構造変化が、DNAメチル化状況の変化をもたらすメカニズムも報告されている。DNAがメチル化された領域はクロマチン構造が凝縮し、いわゆるヘテロクロマチンになり、DNA非メチル化領域はクロマチン構造が緩んだユークロマチン構造をとることになる。したがって、DNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティクス制御にかかわるメチル化シトシン結合タンパク質をはじめとするさまざまな分子の転写、翻訳、分解、細胞内移行や分子間の結合などの制御系が重要となる。また、S-アデノシル-L-メチオニンがメチル基の供与体であるため、アミノ酸代謝経路を含めた、複数の経路でエピジェネティクス制御が成り立っており、その異常を生む原因も多岐にわたることになる（図2）。

### 3 栄養因子の影響

癌への罹患率，飲食物とエピジェネティクスをつなぐ興味深いモデルがマウスの腸性腫瘍で研究されている。欧米の食事を想定した，低カルシウム・低ビタミンD，高脂質，葉酸・メチオニン・コリン・食物繊維・ビタミンB<sub>12</sub>欠乏食を与えられた個体群では，18カ月後にその42%に腫瘍の形成がみられた。一方，バランスのとれた食餌を与えられた同質遺伝型の個体群では発症率はゼロだった<sup>12</sup>。異なる種類のマウスでも類似した結果が得られている<sup>13</sup>。

こうした環境要因の違いがどのようにして表現型の違いとして現れるのかは明らかではない。しかし，食物繊維の摂取が直腸癌の予防に関係しているといったヒントが得られている（図2）。食物繊維は腸管を通過し直腸の内腔で腸内細菌による発酵を受け，その副産物として酪酸が生成される。酪酸ナトリウムは，短鎖脂肪酸で，ヒストン脱アセチル化酵素に対する強力な阻害作用，および腸管上皮細胞の分化促進作用をもつ<sup>14</sup>。葉酸，メチオニン，コリンはS-アデノシル-L-メチオニンを介してDNAメチル基転移酵素が触媒するシトシンのメチル化反応にメチル基を供与する<sup>15</sup>。炭素供与体の欠乏食はマウス，ラットでメチル化状態の異常を引き起こすことが明らかになっている<sup>16</sup>。こうしたメチル化異常が反復配列（図1）（大部分がメチル化されている）に起こるのか遺伝子領域に起こるのかは定かでない。また，通常塩基配列の突然変異が原因とされる腫瘍が，遺伝子のエピジェネティック制御異常によって引き起こされる機構も解明されていない。食事性因子によってつくられた前癌段階が，遺伝子の突然変異が引き金となり，より進行した腫瘍へ発展すると考えるのが妥当な仮説であろう。この場合，エピジェネティックな変異は腫瘍形成のごく初期に腸管上皮細胞で起こり，“エピジェネティック・フィールド効果”として周囲の細胞に影響を及ぼすと考えられる。臨床治療に用いられるエピジェネティック作用をもつ薬剤（DNAメチル基転移酵素やヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤など）には，腫瘍の悪性化を防ぐ効果が期待されている。

### 4 薬剤など化合物の影響

脊髄形成異常症では5-アザシチジン（DNAメチル基転移酵素の阻害剤）の単独治療により部分あるいは完全緩解が達成され，癌以外の治療にもエピジェネティクス系に作用する薬剤が注目を浴びている<sup>17</sup>（図2）。一方で，これまで親しまれてきた治療薬の思わぬエピジェネティック作用も発見されている。代表的な例が，長年てんかんの治療に用いられてきたvalproic acidのヒストン脱アセチル化阻害作用である<sup>18</sup>。興味深いことに，痙攣抑制効果を発揮する以外に，valproateは神経管閉鎖異常の要因となることがマウス<sup>19</sup>およびヒト<sup>20</sup>で確認されている。これに対し，妊娠中の葉酸の補給は神経管異常の予防に効果的である<sup>21</sup>。Valproateはヒストンのアセチル化，葉酸はDNAのメチル化，といったエピジェネティクス系への変化誘導を通して効いていると推測される。脊椎披裂はエピジェネティクス系の異常が要因となっている可能性が高い。

### 5 胎生期のエピジェネティクス基盤と疾患

胎生期に形づくられるエピジェネティクス系が，成体で病気へのかかりやすさに影響する例としてA<sup>vy</sup>マウスがあげられる。このマウスはIAPレトロトランスポゾンがAgouti遺伝子上流に組込まれており，毛皮が黄色く，インスリン抵抗性を示す肥満個体に成長する<sup>22</sup>。IAPエレメントの活性度によって同腹子間でも表現型の違いが現れるが，この活性度は胚発生期に獲得したDNAメチル化量に依存するのである。母親に与える葉酸の量を増減させることによって，個体群レベルで胚のメチル化量を操作することができる。葉酸の増加は産仔のIAPをメチル化により不活性化し，成長後のII型糖尿病への罹患率を低下させる<sup>23, 24</sup>。A<sup>vy</sup>マウスのように，表現型がエピジェネティックな因子によって大きく左右される場合は，遺伝子型による識別の限界を超えていることがわかる。このモデルは，子宮内で起こる現象が成長後の疾患の発症に影響を与えることも示唆している。これは，子宮内での発育遅

延と成人後のⅡ型糖尿病リスクを結びつけたバーカーらの説<sup>25)</sup>に通じる概念である。子宮内での発育とDNAメチル化座位との相関を調べ、成人後の追跡調査を行うことで、Ⅱ型糖尿病のリスクファクターとなる遺伝子座を特定できるかもしれない。

## 6 癌とゲノムワイドなメチル化解析

エピジェネティクス制御系の異常が最も研究されている疾患が癌である。癌では、ゲノムDNA中の5-メチルシトシンの総量は減少し、特定の癌抑制遺伝子プロモーターが高メチル化される<sup>26)</sup>。全体的なメチル化量の低下は、染色体構造の不安定化<sup>27)</sup>や転移因子の再活性化<sup>28)</sup>を通して癌の進行を促進しうる。癌の進行とともにメチル化状態が異常に変化する遺伝子座の同定は、遺伝子発現の異常を検出しようとする、より主流のアプローチへの新しい切り口となる(牛島の稿、参照)。

重要な機能をもつ遺伝子やマイクロアレイにより発現の低下が確認された遺伝子を中心に、遺伝子のメチル化状態の解析が行われてきた。その結果、癌抑制遺伝子やミスマッチ修復関連遺伝子が異常なメチル化変異の標的であることが明らかになった<sup>29)</sup>。直腸癌は、個々の遺伝子座に焦点を当てた研究などから、メチル化異常の度合いによって分類され、特にメチル化度合いの高い症例群(methylator phenotype)が存在すると考えられている<sup>30)</sup>。また、小児性の神経芽細胞腫では、従来N-myc遺伝子増幅が予後診断の強力なツールとして用いられてきた。ところがこの細胞腫でのゲノムワイドなメチル化解析は、5つのCpGアイランドグループのメチル化診断がN-myc診断に加えてより正確な予後の予測を可能にすることを示した<sup>31)</sup>。エピジェネティック状態の解析は、癌の経過を予測する診断法として威力を発揮する。

## 7 ヒトエピゲノムプロジェクトの展望

ヒトの生理機能や病態の解明を試みるエピジェネティクス研究は世界的に加速している。しかし、ここに来て研究は新たな局面を迎えている。栄養因子や

薬剤の影響、表現型の一部としてエピジェネティクス系の変化を検出しようとするとき、ゲノム全体のエピジェネティック状態を網羅的に解析する必要がある。問題となるのは、エピゲノムはゲノムそのものよりもはるかに変動しやすく“正常”の範囲を規定する必要があるということだ。細胞の種類によってエピジェネティック状態が異なるということは、体を構成するすべての種類の細胞についてその正常な状態を定義する必要性を意味する。エピゲノムデータベースの確立は、技術面、解析面、予算面などの複合的な課題を内包している。

正常な個体から、各種の細胞を必要な分量だけ採取することは技術的な問題として大きい。クロマチン免疫沈降法(ChIP)のように、例外的な場合<sup>32)</sup>を除き通常培養細胞を用いる解析法をどのように一次組織に応用するかという課題もある。ChIPの実験に必要な $10^6$ を超える細胞数を確保するには、量の問題に加えて他種類の細胞の混入という質の問題も浮上する。

これを解決する技術革新も起こりつつある。マイクロアレイで解析できるほどのChIP試料の増幅技術は、ChIP/chip法によるゲノムワイドなクロマチン構造の解析を可能にした。DNAメチル化の網羅的な解析にも、RLGS(restriction landmark genomic scanning)法などに加えてマイクロアレイが有効である。転写因子の結合領域<sup>33)</sup>、アンチセンスRNA<sup>34)</sup>、DNAの複製パターン<sup>35)</sup>はいずれもゲノム上の地図に書き込むことができるようになった。次のステップとして、エピジェネティクス情報を加える必要がある。これには効率のよいシーケンス解析よりも、マイクロアレイを用いた方が、現在のところ、経済的なようである。染色体全体やゲノム全体を網羅するDNAマイクロアレイ解析が進められており、今後の解析を必要とする莫大なデータが得られている。しかし、精度をより高めた新たな技術開発が必要であることは間違いない。

解析面での課題には、小規模の観察結果を多数のパラメーターによって分析しようとする統計学上の問題がある。DNAメチル化やヒストンの化学修飾はゲノム領域において互いに正あるいは負の相関を示して存在するだけでなく、特定の傾向をもつDNA配列に偏ってみられること<sup>36)</sup>から、塩基配列情報も考慮す



る必要があり、複雑なデータセットをさらに複雑にしている。データセットの解析に対するいくつかの方向性は他の総説に記した<sup>37)</sup>。

## ■ おわりに

個々の研究者が、ヒトエピゲノム全体を重複なく体系的な解析を行うことは現実的ではない、世界的な共同研究によって“正常”なエピゲノムのプロフィールが確立されれば、個人の研究にその情報を活かすことができるようになる。ヒトエピゲノムプロジェクトに着手しているヨーロッパ研究機関の共同体<sup>38)</sup>の努力を世界規模に拡大することは、エピジェネティクス領域の発展に大きく貢献する。この成果はヒトゲノム同様、世界的な財産となる。情報の共有は疾患におけるエピジェネティクス異常の研究を加速させ、食事療法を含めた臨床治療の基盤となる。

## 文献

- 1) Cho, J. H., Kimura, H., Minami, T., Ohgane, J., Hattori, N., Tanaka, S. & Shiota, K.: *Endocrinology*, 142 : 3389-3396, 2001
- 2) Futscher, B. W., Oshiro, M. M., Wozniak, R. J., Holtan, N., Hanigan, C. L., Duan, H. & Domann, F. E.: *Nature Genet.*, 31 : 175-179, 2002
- 3) Nishino, K., Hattori, N., Tanaka, S. & Shiota, K.: *J. Biol. Chem.*, 279 : 22306-22313, 2004
- 4) Yoder, J. A., Walsh, C. P. & Bestor, T. H.: *Trends Genet.*, 13 : 335-340, 1997
- 5) Shiota, K.: *Cytogenet Genome Res.*, 105 : 325-334, 2004
- 6) Imamura, T., Ohgane, J., Ito, S., Ogawa, T., Hattori, N., Tanaka, S. & Shiota, K.: *Genomics*, 76 : 117-125, 2001
- 7) Shiota, K., Kogo, Y., Ohgane, J., Imamura, T., Urano, A., Nishino, K., Tanaka, S. & Hattori, N.: *Genes Cells*, 7 : 961-969, 2002
- 8) Frigola, J., Ribas, M., Risques, R. A. & Peinado, M. A.: *Nucleic Acids Res.*, 30 : e28, 2002
- 9) Yan, P. S., Chen, C. M., Shi, H., Rahmatpanah, F., Wei, S. H. & Huang, T. H.: *J. Nutr.*, 132 : 2430S-2434S, 2002
- 10) Chen, C. M., Chen, H. L., Hsiao, T. H., Hsiao, A. H., Shi, H., Brock, G. J., Wei, S. H., Caldwell, C. W., Yan, P. S. & Huang, T. H.: *Am. J. Pathol.*, 163 : 37-45, 2003
- 11) Kaneda, A., Takai, D., Kaminishi, M., Okochi, E. & Ushijima, T.: *Ann. N Y Acad. Sci.*, 983 : 131-141, 2003
- 12) Newmark, H. L., Yang, K., Lipkin, M., Kopelovich, L., Liu, Y., Fan, K. & Shinozaki, H.: *Carcinogenesis*, 22 : 1871-1875, 2001
- 13) Yang, W., Bancroft, L., Nicholas, C., Lozonschi, I. & Augenlicht, L. H.: *Cancer Res.*, 63 : 4990-4996, 2003
- 14) Mariadason, J. M., Corner, G. A. & Augenlicht, L. H.: *Cancer Res.*, 60 : 4561-4572, 2000
- 15) Niculescu, M. D. & Zeisel, S. H.: *J. Nutr.*, 132 : 2333S-2335S, 2002
- 16) Davis, C. D. & Uthus, E. O.: *J. Nutr.*, 133 : 2907-2914, 2003
- 17) Muftic, G., List, A. F., Gore, S. D. & Ho, A. Y.: *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* : 176-199, 2003
- 18) Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G. & Heinzel, T.: *EMBO J.*, 20 : 6969-6978, 2001
- 19) Finnell, R. H., Włodarczyk, B. C., Craig, J. C., Piedrahita, J. A. & Bennett, G. D.: *Am. J. Med. Genet.*, 70 : 303-311, 1997
- 20) Yerby, M. S.: *Neurology*, 61 : S23-26, 2003
- 21) Mitchell, L. E., Adzick, N. S., Melchionne, J., Pasquariello, P. S., Sutton, L. N. & Whitehead, A. S.: *Lancet*, 364 : 1885-1895, 2004
- 22) Yen, T. T., Gill, A. M., Frigeri, L. G., Barsh, G. S. & Wolff, G. L.: *Faseb J.*, 8 : 479-488, 1994
- 23) Waterland, R. A. & Jirtle, R. L.: *Mol. Cell. Biol.*, 23 : 5293-5300, 2003
- 24) Wolff, G. L., Kodell, R. L., Moore, S. R. & Cooney, C. A.: *Faseb J.*, 12 : 949-957, 1998
- 25) Barker, D. J. P.: *Acta Paediatr. Suppl.*, 446 : 26-33, 2004
- 26) Jones, P. A. & Baylin, S. B.: *Nature Rev. Genet.*, 3 : 415-428, 2002
- 27) Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A. & Jaenisch, R.: *Science*, 300 : 455, 2003
- 28) Florl, A. R., Lower, R., Schmitz-Drager, B. J. & Schulz, W. A.: *Br. J. Cancer*, 80 : 1312-1321, 1999
- 29) Ushijima, T.: *Nature Rev. Cancer*, 5 : 223-231, 2005
- 30) Issa, J. P.: *Nature Rev. Cancer*, 4 : 988-993, 2004
- 31) Abe, M., Ohira, M., Kaneda, A., Yagi, Y., Yamamoto, S., Kitano, Y., Takato, T., Nakagawara, A. & Ushijima, T.: *Cancer Res.*, 65 : 828-834, 2005
- 32) Umlauf, D., Goto, Y. & Feil, R.: *Methods Mol. Biol.*, 287 : 99-120, 2004
- 33) Buck, M. J. & Lieb, J. D.: *Genomics*, 83 : 349-360, 2004
- 34) Yelin, R., Dahary, D., Sorek, R., Levanon, E. Y., Goldstein, O., Shoshan, A., Diber, A., Biton, S., Tamir, Y., Khosravi, R., Nemzer, S., Pinner, E., Walach, S., Bernstein, J., Savitsky, K. & Rotman, G.: *Nature Biotechnol.*, 21 : 379-386, 2003
- 35) van Steensel, B. & Henikoff, S.: *Biotechniques*, 35 : 346-350, 352-354, 356-357, 2003
- 36) Handa, V. & Jeltsch, A.: *J. Mol. Biol.*, 348 : 1103-1112, 2005
- 37) Fazzari, M. J. & Grealley, J. M.: *Nature Rev. Genet.*, 5 : 446-455, 2004
- 38) Bradbury, J.: *PLoS Biol.*, 1 : E82, 2003

## Profile

### 筆頭著者プロフィール

**John Grealley** : 1988年 National University of Ireland, GalwayにてM.B., B.Ch., B.A.O., '99年同大学にてPh. D. (Department of Microbiology), Children's Hospital of Pittsburgh, Yale University School of Medicineでの研究員を経て、2001年 Albert Einstein College of Medicine 助教授。現在に至る。研究テーマはエピジェネティクス、およびそのバイオインフォマティクス解析。