

Fig. 4. Summary of the effect of 5azadC on repetitive sequences and genic regions. Repetitive sequences (black arrows) are strongly demethylated by 5azadC, but genic regions are only demethylated at low doses (dotted arrow). The present study suggests the preference of 5azadC for Dnmt1, as Dnmt1 has a functional preference for repeats, whereas Dnmt3a and Dnmt3b functions on genic regions [24].

increasing the treatment dosage might not effectively induce demethylation in targeted genic regions, but will lead to genome-wide hypomethylation in non-cancer cells. Loss of methylation promotes additional genomic changes, including increased mutation rate and pericentromeric rearrangement [17, 36]. Thus, before using 5azadC, precise doses should be determined to achieve localized hypomethylation, but avoid concurrent global hypomethylation.

Some reports have shown that 5azadC treatment is followed by decreased H3K9 methylation [37–39]. Our results also showed decreased H3K9me2, but increased H3K9me3 in all genic regions after 5azadC treatment. H3K9me3, but not H3K9me2, is a mark for cytosine methylation in chromatin regions in *Neurospora crassa* [35]. Thus, increased H3K9me3 might be associated with partial methylation in 5azadC-treated cells, indicating a functional difference between H3K9me2 and H3K9me3 in mammalian cells.

Unusual histone tail modifications were observed following 5azadC treatment, in contrast to their authentic roles in DNA methylation and gene silencing [25, 26]. Such changes might reflect mechanisms to prevent full demethylation in genic regions. As DNA methyltransferases are associated with H3K9 methyltransferases [40, 41], accumulation of histone methyltransferases, which confers increase in H3K9me3, may also attract Dnmts. Recruitment of MeCPs to the methylated DNA region is associated with a corepressor complex containing mSin3 and histone deacetylases (HDACs), causing reduction of AcH3 [42, 43]. Given that Dnmt1 has preference for repetitive sequence, whereas Dnmt3a and 3b favor gene regions [24], the current study may reflect the preference of 5azadC for Dnmt1 (Fig. 4). Thus, Dnmt3 might be associated with H3K9 methyltransferases for maintaining the methylation level in genic regions due to the functional cooperation of Dnmt1 and Dnmt3 [22–24, 44, 45].

Gene activation by 5azadC seems to involve a complex mechanism of action, in addition to DNA demethylation [37, 39]. We showed that genes were upregulated at 0.1 μ M and that expressions

were maintained or increased at 1 μ M, despite higher methylation levels observed at 1 μ M. Although transcriptional activation could be explained by an increase of H3K4 methylation marks [46]. AcH3 concurrently decreased drastically. Interestingly, H3K4me3 abundance was lower in the 1 μ M treatment than in the 0.1 μ M treatment and was accompanied by DNA hypermethylation. A similar study on cancer genes suggested that histone modifications of demethylated genes do not fully recover to euchromatic states [47]. Interestingly, recent findings have shown that H3K9me3 is associated with active genes [48–49] and is dynamically present in active transcribed regions together with heterochromatin protein, HP1 γ [50], suggesting the role of H3K9me3 in 5azadC-induced gene activation. Thus, gene activation by 5azadC seems to be more complex than the authentic model of epigenetic gene activation and silencing.

Although studies have shown that the toxicity of the 5azadC treatment is not due to a demethylating effect [51], our results raise questions concerning the 5azadC toxicity mechanism. Repetitive sequences were partially demethylated at 0.1 μ M and were extensively demethylated at 1 and 5 μ M. Concurrent with demethylation, cell viability was minimally affected at 0.1 μ M, but was retarded at 1 and 5 μ M, reflecting that the induced cytotoxicity might be an effect of global demethylation in the repetitive sequences. In contrast, genic regions were hypomethylated at 0.1 μ M, and were methylated at 1 and 5 μ M 5azadC, probably as a resistance mechanism against cell death.

This study provides an explanation of the mechanisms behind the dual modes of action of the demethylating drug 5azadC. At low concentrations, the demethylating effect is potent in both repetitive and genic regions. At high concentrations, repetitive sequences are highly demethylated, which potentially leads to toxicity. DNA methylation in genic regions is less affected, which might be due to changes in histone modification attempting to maintain the DNA methylation level. Thus, an appropriate dose of 5azadC should be wisely chosen for therapeutic use.

Acknowledgments

We appreciate Dr En Li for providing us with the ES cells and probes. This work was supported in part by the Program for Promotion of Basic Research Activities for Innovative Biosciences (PROBRAIN), Japan (to KS); Health Science Research Grant from Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan (to KS); Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation, Japan (to KS); and a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (20062003 to ST).

References

- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6870–6875.
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999; 59: 793–797.

- Tessema M, Langer F, Dingemann J, Ganser A, Kreipe H, Lehmann U. Aberrant methylation and impaired expression of the p15^{INK4b} cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia* 2003; 17: 910–918.
- Creusot F, Acs G, Christman JK. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem* 1982; 257: 2041–2048.
- Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Liang G, Xu GL, Hu YG, Marquez VE, Jones PA. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1270–1278.
- Villar-Garea A, Fraga MF, Espada J, Esteller M. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 4984–4989.
- Cortez CC, Jones PA. Chromatin, cancer and drug therapies. *Mutat Res* 2008; 647: 44–51.
- Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, Guldberg P, Kohler G, Wijermans P, Jones PA, Lubbert M. Demethylation of a hypermethylated P15^{INK4B} gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* 2002; 100: 2957–2964.
- Zhu WG, Dai Z, Ding H, Srinivasan K, Hall J, Duan W, Villalona-Calero MA, Plass C, Otterson GA. Increased expression of unmethylated CDKN2D by 5-aza-2'-deoxycytidine in human lung cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 7787–7796.
- Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J, Kantarjian HM. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 2004; 103: 1635–1640.
- Jabbour E, Issa JP, Garcia-Manero G, Kantarjian H. Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. *Cancer* 2008; 112: 2341–2351.
- de Lima M, Ravandi F, Shahjahan M, Andersson B, Couriel D, Donato M, Khouri I, Gajewski J, van Besien K, Champlin R, Giral S, Kantarjian H. Long-term follow-up of a phase I study of high-dose decitabine, busulfan, and cyclophosphamide plus allogeneic transplantation for the treatment of patients with leukemias. *Cancer* 2003; 97: 1242–1247.
- Oki Y, Aoki E, Issa JP. Decitabine—bedside to bench. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 61: 140–152.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; 420: 520–562.
- Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e38.
- Jeong KS, Lee S. Estimating the total mouse DNA methylation according to the B1 repetitive elements. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 1211–1216.
- Ji W, Hernandez R, Zhang XY, Qu GZ, Frady A, Varela M, Ehrlich M. DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. *Mutat Res* 1997; 379: 33–41.
- Weber M, Schubeler D. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 273–280.
- Shiota K, Kogo Y, Ohgane J, Imamura T, Urano A, Nishino K, Tanaka S, Hattori N. Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells* 2002; 7: 961–969.
- Hattori N, Nishino K, Ko YG, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, Shiota K. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 17063–17069.
- Ohgane J, Wakayama T, Senda S, Yamazaki Y, Inoue K, Ogura A, Marh J, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K. The Sall3 locus is an epigenetic hotspot of aberrant DNA methylation associated with placentomegaly of cloned mice. *Genes Cells* 2004; 9: 253–260.
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 480–491.
- Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5594–5605.
- Hattori N, Abe T, Hattori N, Suzuki M, Matsuyama T, Yoshida S, Li E, Shiota K. Preference of DNA methyltransferases for CpG islands in mouse embryonic stem cells. *Genome Res* 2004; 14: 1733–1740.
- Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 286–298.
- Vermaak D, Ahmad K, Henikoff S. Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 266–274.
- Ikegami K, Iwatani M, Suzuki M, Tachibana M, Shinkai Y, Tanaka S, Greally JM, Yagi S, Hattori N, Shiota K. Genome-wide and locus-specific DNA hypomethylation in G9a deficient mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* 2007; 1: 1–11.
- Ikegami K, Ohgane J, Tanaka S, Yagi S, Shiota K. Interplay between DNA methylation, histone modification and chromatin remodeling in stem cells and during development. *Int J Dev Biol* 2009; 53: 203–214.
- Joseph A, Mitchell AR, Miller OJ. The organization of the mouse satellite DNA at centromeres. *Exp Cell Res* 1989; 183: 494–500.
- Davidson S, Crowther P, Radley J, Woodcock D. Cytotoxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine in a mammalian cell system. *Eur J Cancer* 1992; 28: 362–368.
- Rosembliit N, Chen CL. Regulators for the rat clusterin gene: DNA methylation and cis-acting regulatory elements. *J Mol Endocrinol* 1994; 13: 69–76.
- McIver CM, Lloyd JM, Hewett PJ, Hardingham JE. Dipeptidase 1: a candidate tumor-specific molecular marker in colorectal carcinoma. *Cancer Lett* 2004; 209: 67–74.
- Stoger R, Kubicka P, Liu CG, Kafri T, Razin A, Cedar H, Barlow DP. Maternal-specific methylation of the imprinted mouse Igf2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* 1993; 73: 61–71.
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 2002; 416: 556–560.
- Tamaru H, Zhang X, McMillen D, Singh PB, Nakayama J, Grewal SI, Allis CD, Cheng X, Selker EU. Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat Genet* 2003; 34: 75–79.
- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998; 395: 89–93.
- Wozniak RJ, Klimecki WT, Lau SS, Feinstein Y, Futscher BW. 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 dimethylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene* 2007; 26: 77–90.
- Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JC, Liang G, Jones PA. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 2002; 62: 6456–6461.
- Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG, Baylin SB. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 7213–7218.
- Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 2305–2312.
- Li H, Rauch T, Chen ZX, Szabo PE, Riggs AD, Pfeifer GP. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 19489–19500.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19: 187–191.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386–389.
- Rhee I, Jair KW, Yen RW, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, Vogelstein B, Baylin SB, Schuebel KE. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 2000; 404: 1003–1007.
- Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002; 416: 552–556.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 2002; 419: 407–411.
- McGarvey KM, Fahrner JA, Greene E, Martens J, Jenuwein T, Baylin SB. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res* 2006; 66: 3541–3549.
- Brinkman AB, Roelofs T, Pennings S, Martens J, Jenuwein T, Stunnenberg HG. Histone modification patterns associated with the human X chromosome. *EMBO Rep* 2006; 7: 628–634.
- Kim A, Kiefer C, Dean A. Distinctive signatures of histone methylation in transcribed coding and noncoding human β -globin sequences. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 1271–1279.
- Vakoc C, Mandat S, Olenchok B, Blobel GA. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 γ are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* 2005; 19: 381–391.
- Juttermann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11797–11801.

8. 子宮筋腫のゲノムワイドDNAメチル化プロファイル解析

杉野法広, 前川 亮, 浅田裕美, 山縣芳明

われわれは、子宮筋腫の発生・進展機序の解明を目的として、子宮筋腫はエピゲノム異常により発生するという新規の仮説に基づいて基礎的研究に取り組んでいる。まず、子宮筋腫のDNAメチル化プロファイルをゲノムワイドに解析したところ、子宮筋腫では、ゲノムワイドに多くのメチル化異常が生じていることが明らかになった。また、子宮筋腫はエストロゲンに対する感受性が高い腫瘍であるが、DNAメチル化異常などのエピジェネティックな機構がエストロゲン作用を修飾し、筋腫の発生・発育に関与する可能性も示された。子宮筋腫研究の新しい視点として、エピジェネティクスの重要性が確認された。

はじめに

子宮筋腫(子宮平滑筋腫)は、主に子宮平滑筋細胞に由来する良性の腫瘍である。女性生殖器に発生する腫瘍性疾患のなかで最も頻度が高く、性成熟期女性の20~30%に子宮筋腫が認められる。良性疾患ではあるが、月経痛や過多月経などの症状から治療を要する場合も多い他、不妊症や流産の原因にもなる。治療としては、腫瘍の縮小や症状の軽減のため薬物療法も行われるが、根治のためには外科的な子宮摘出術や子宮

筋腫核出術が必要である。子宮筋腫の頻度の高さから考えれば、女性のquality of lifeを著しく損なうだけでなく、社会活動の制限や治療費など社会的損失はきわめて大きい。したがって、子宮筋腫の発症予防や、低侵襲でより効率的な治療法の開発が望まれる。そのためには、子宮筋腫の発生過程や増殖機構の解明が重要となる。

1 子宮筋腫とエピジェネティクス

1) 筋腫細胞における遺伝子異常

子宮筋腫はモノクローナル発生であることが知られている。つまり、筋腫の発生母地(子宮平滑筋細胞、組織幹細胞)と考えられる細胞に何らかの異常が生じて筋腫細胞となり、この1個の筋腫細胞が増殖して腫瘍を形成するという過程が推察される。細胞の腫瘍化にはいくつかの遺伝子異常が関与すると考えられており、その1つに染色体異常によるものがあげられる。筋腫細胞ではその約40%に転座や逆位、染色体の欠失などの染色体構造異常がみられる。しかし、残りの多

【キーワード&略語】

子宮筋腫, DNAメチル化, エストロゲン・レセプター

DNMT: DNA methyltransferase

D-REAM: T-DMR profiling with restriction-tag mediated amplification

ER α : estrogen receptor α

RLGS: Restriction Landmark Genomic Scanning

Genome-wide DNA methylation profile of uterine leiomyomas

Norihiro Sugino/Ryo Maekawa/Hiromi Asada/Yoshiaki Yamagata: Department of Obstetrics and Gynecology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine (山口大学大学院医学系研究科産科婦人科学)

くの筋腫細胞には染色体異常を認めないことなどから、染色体異常は子宮筋腫の発生に関与する可能性は少ないと考えられている^{1)~3)}。つぎに、突然変異を含めて何らかの原因で遺伝子異常が起こることは十分考えられる。実際に、正常子宮筋組織と筋腫組織での遺伝子やタンパク質の発現プロファイルの違いをマイクロアレイなどの実験手法を用いて多くの研究がなされてきた。これまでに、子宮筋腫では、EGF, IGF, TGF- β などの増殖因子やcyclin E, cdc2, cdk2などの細胞周期調節因子の発現が亢進していることが報告されている。これらは、筋腫細胞の増殖機序に大きく関与していると考えられるが、これらの発現異常を引き起こす原因や筋腫の発生機序については依然として不明である。

子宮筋腫の発生起源についても未だ不明である。子宮筋腫発症のリスク因子として、人種（アフリカ系）、高 body mass index (BMI)、早期の初経開始、高血圧、骨盤内炎症性疾患の既往、肉食などがあげられ、一方、リスクを下げる因子として、経口避妊薬の服用、喫煙、多産、菜食などがあげられている。このような疫学的情報をみると、個人の遺伝的背景も関与すると考えられるが、後天的な因子であるホルモン環境、栄養、生活環境が大きく影響していることが予想される。すなわち、エピジェネティックな影響が関与していても何ら不思議はない。

2) 子宮筋腫とDNAメチル化異常

エピジェネティックな影響として、DNAメチル化やヒストン修飾があげられる。DNAメチル化はヒストン修飾と密接に絡んでいる。DNAメチル化が変化するとヒストン修飾が変化し、逆にヒストン修飾がDNAメチル化にも影響する。ヒストン修飾にはアセチル化、メチル化、リン酸化、スモリル化などがある。さまざまな化合物（薬物、食品添加物、環境汚染物質）、栄養因子、ウイルスなどがこれらのいずれかに作用すれば、ゲノムワイドにエピジェネティックな変化が引き起こされる可能性がある。環境が遺伝子に作用することで表現型に異常が引き起こされる。まさにエピジェネティクスがさまざまな疾患の理解には欠かせない。

われわれ人類は、種々の化学物質に暴露されているが、興味深いことに、有機リン系農薬の1つであるdimethyl sulfoxideが胚性幹細胞において多くの遺伝

子にDNAメチル化異常を引き起こすことが明らかにされている⁴⁾。DNAメチル化は細胞分裂に際して忠実に保存される仕組みで、DNAメチル化によるがん抑制遺伝子のsilencingが発がんに関与することが多くのがん種で知られている。さらに、重金属やダイオキシンの暴露と子宮筋腫・子宮内膜症発症との関連性も示唆されている^{5)~7)}。ダイオキシンの受精卵への暴露はインプリント遺伝子のDNAメチル化プロファイルを変化させる⁸⁾。一方、子宮筋腫は、初経前に発症することはなく、臨床的にも実験的にもエストロゲンやプロゲステロンの作用で増大することから、性成熟期のホルモン環境、また月経（子宮収縮など）が子宮筋腫の発生や発育に与える影響が大きいと考えられている。実際に、われわれは、エストロゲンとプロゲステロンが培養子宮内膜細胞において、DNAメチル化に関与するDNA methyltransferase (DNMT) mRNA発現に影響を及ぼすことを見出している⁹⁾。このような背景から、われわれは、子宮筋腫の発生や進展にDNAメチル化異常が関与している可能性を考えている。そこで、子宮筋腫のDNAメチル化プロファイルをゲノムワイドに解析した。

2 子宮筋腫におけるDNMTの発現

まず、手術により摘出した子宮から正常子宮筋組織と筋腫組織を採取し（同一の患者において）、DNMT1, DNMT3a, DNMT3bの発現を比較した（表）。DNMT1は細胞分裂におけるメチル化の維持、またDNMT3aとDNMT3bは*de novo*のメチル化に関与する。筋腫組織でのDNMT1とDNMT3aのmRNA発現は、正常子宮筋組織に比べ有意に高い発現を示しており、DNAメチル化状態が広範に影響を受けていることが推測された¹⁰⁾。一方、Liら¹¹⁾は、DNMT1についてはわれわれと同様に筋腫組織で高発現であったが、DNMT3a, DNMT3bは、ともに筋腫で低発現であったと報告している。子宮筋腫は人種などによっても発症率が大きく異なるとの報告があり、被験者の人種の違いが影響しているかもしれない。いずれにせよ、DNMTの発現異常からは子宮筋腫でのゲノムワイドなDNAメチル化異常が生じていることが推測される。

表 正常子宮筋と子宮平滑筋腫における DNMT mRNA 発現

	症例数	正常子宮筋	子宮平滑筋腫	no. of myo < leio
DNMT1	20	92.6±5.0	118.6±14.2 ^b	15 (75%)
DNMT3a	20	110.5±12.5	161.9±19.8 ^a	17 (85%)
DNMT3b	20	115.2±8.6	97.2±6.9	6 (30%)

20症例から得られた正常子宮筋と子宮平滑筋腫組織における DNMT1, DNMT3a, DNMT3b の mRNA レベルを RT-PCR 法で解析した¹⁰⁾。最右列には正常子宮筋 (myo) に比べ筋腫 (leio) で発現が高かった症例数 (%) を示した。Mean±SEM, a: p<0.01, b: p<0.05

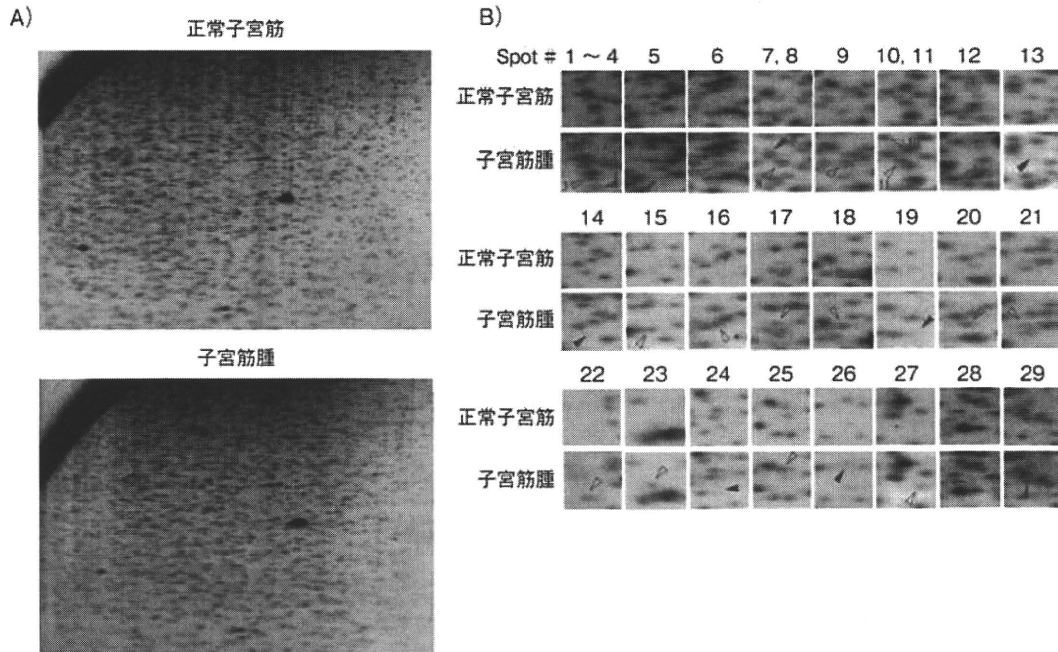


図1 RLGs法による正常子宮筋と子宮筋腫のメチル化プロファイルの比較

A) 正常子宮筋と子宮筋腫の RLGs プロファイル, B) 両者の間に相違のあった 29カ所の spot の拡大像, 上段に正常子宮筋, 下段に子宮筋腫を示している。矢頭で示すように, 子宮筋腫では正常子宮筋に比べ, 19個の遺伝子領域が低メチル化 (▷) に, 10個の領域が高メチル化 (▶) となっていた (文献10より転載)

3 子宮筋腫におけるゲノムワイド DNA メチル化異常の検索

1) Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS)

子宮筋腫におけるゲノムワイドな DNA メチル化異常を評価するため, われわれは RLGs 法による解析を行った。同一患者の子宮筋腫組織と正常子宮筋組織から抽出したゲノム DNA を用いて, 両者の DNA メチル化パターンを比較した。RLGS により約 1,800 個から

なる DNA 断片が展開された (図1A)。子宮筋腫では正常子宮筋に比し, 19個の遺伝子領域が低メチル化に, 10個領域が高メチル化となっていた (図1B)。すなわち, 子宮筋腫では多くの遺伝子領域に DNA メチル化異常が起こっていることが明らかとなった¹⁰⁾。

さらに, 正常子宮筋と筋腫の間でメチル化パターンが異なっていた遺伝子領域を virtual RLGs という方法で同定したところ, 正常子宮筋に比べ筋腫で低メチル化状態となっていた 1つの遺伝子領域を同定することができた¹⁰⁾。なお, この遺伝子領域は 15 番染色体上

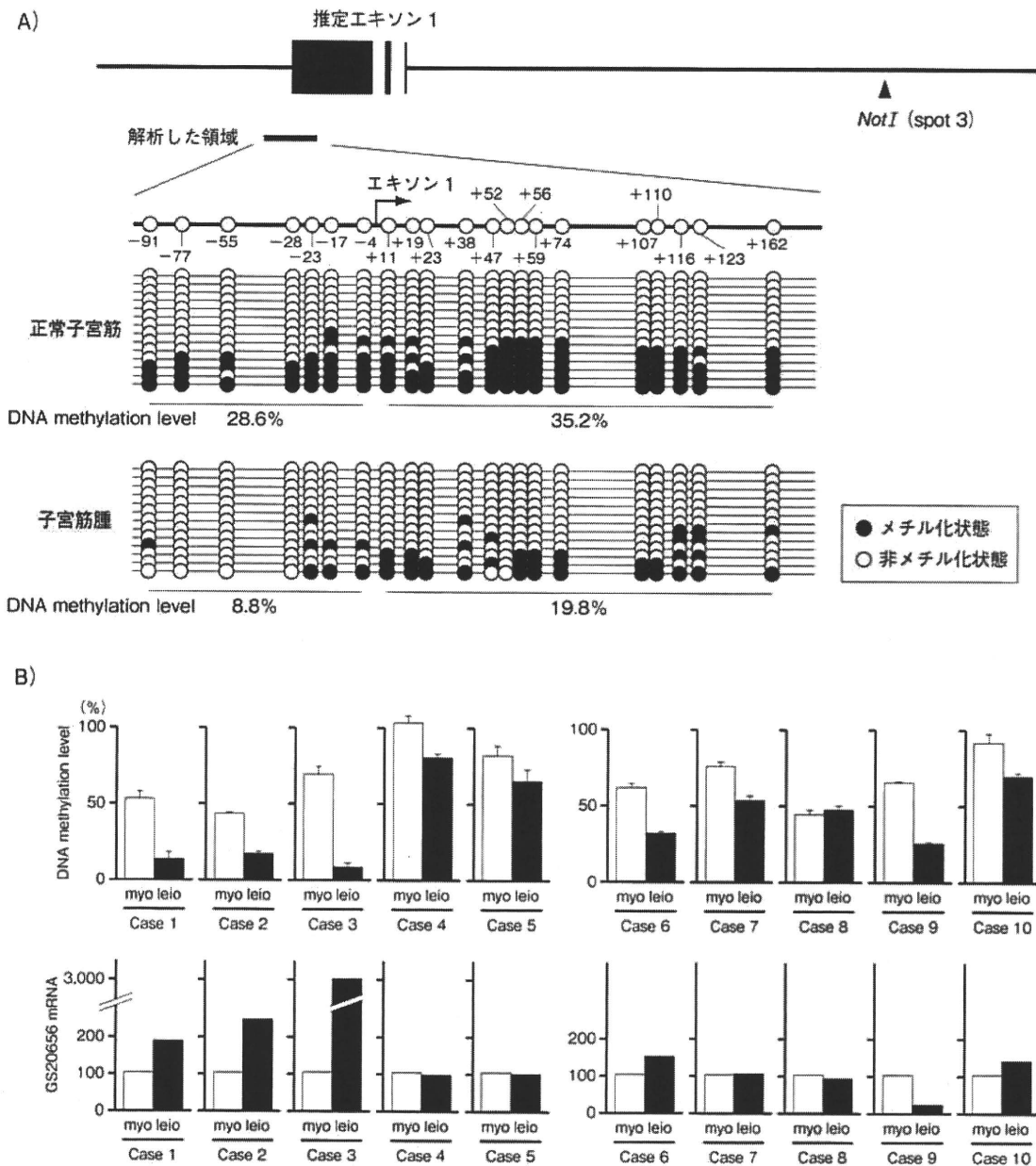


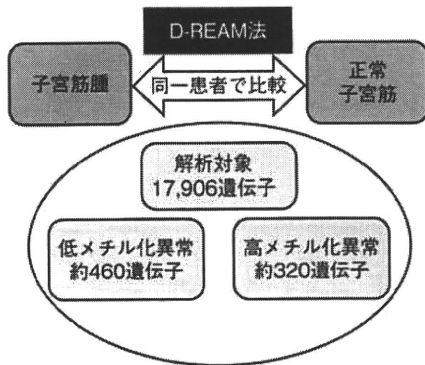
図2 RLSG法で同定されたメチル化異常遺伝子GS20656

A) GS20656のプロモーターからエクソン1領域の sodium bisulfite sequencing法によるメチル化解析。子宮筋腫 (lei) では正常子宮筋 (myo) に比べて低メチル化であった¹⁰⁾。B) GS20656の多数症例での検討。子宮筋腫ではメチル化レベルは症例間を通じて低い傾向であった(上段)。一方、mRNA発現レベルは子宮筋腫で高い傾向であった¹⁰⁾(下段)

にあり、既知の遺伝子ではなく、塩基配列から7個のエクソンからなる新たな遺伝子 (GS20656) である可能性が考えられた。この遺伝子プロモーター領域か

らエクソン1領域を含む範囲について CpG 部位のメチル化状態を sodium bisulfite sequencing法で解析したところ、子宮筋腫で低メチル化であることが確認

A)



B)

遺伝子のカテゴリー解析

筋腫で高メチル化異常遺伝子

カテゴリー	遺伝子数	P値
クロマチン維持関連因子	14	0.00125
クロマチン構成因子	9	0.00582

筋腫で低メチル化異常遺伝子

カテゴリー	遺伝子数	P値
神経知覚・受容体関連因子	36	0.000000000428
Gタンパク質関連受容体	48	0.000001340000

図3 D-REAM法によるゲノムワイドな子宮筋腫のDNAメチル化解析

A) 同一患者の筋腫組織と正常子宮筋組織を採取し、D-REAM法にて解析を行った。約780遺伝子でメチル化異常が検出された、B) 高メチル化異常遺伝子と低メチル化異常遺伝子のカテゴリー解析

された(図2A)。さらに、この遺伝子のメチル化状態とmRNA発現を多数検体で調べたところ、多くの症例で、筋腫では正常子宮筋に比し、低メチル化状態とmRNA発現の亢進が一致してみられた(図2B)。興味深いことに、この遺伝子のメチル化は、正常子宮筋においても、個々の症例で差があることに気がつく。すなわち、この遺伝子が環境因子などのエピジェネティックな影響をまさに受けている証拠と捉えることができる。これらの結果から、子宮筋腫では、ゲノムワイドにメチル化異常が生じていることが確認でき、筋腫研究の新しい視点として、エピジェネティクスの重要性が確認された。

2) T-DMR profiling with restriction-tag mediated amplification (D-REAM)

前述したRLGS法の欠点として、メチル化異常を呈するスポットの遺伝子の同定が非常に難しいことがあげられる。そこで、ゲノムワイドなメチル化異常の検出手法として、八木ら¹²⁾によって開発されたD-REAM法を用い、子宮筋腫のDNAメチル化状態を同一症例の正常子宮筋と比較することで解析した。D-REAM法では、まずメチル化感受性酵素とメチル化非感受性酵素を組み合わせてDNAの切断を行う。この切断されたDNAにアダプターを結合させてPCRを行うことができるようにする。より断片化された短いDNA断片

(脱メチル化した領域の切断産物)はPCRによる増幅効率が高い。得られたPCR産物に標識し、promoter arrayにhybridizationを行うことで、プロモーター領域のメチル化状態をゲノムワイドに知ることができる。この方法により、正常子宮筋と比較して筋腫で高メチル化となっていた異常が約320遺伝子、逆に低メチル化となっていた異常が約460遺伝子において検出された(図3A)。カテゴリー解析の結果では(図3B)、筋腫で高メチル化であった遺伝子は、クロマチン維持関連因子やクロマチン構成因子に属するものであり、子宮筋腫ではクロマチンの構造異常が起こっていることが推察される。一方、筋腫で低メチル化であった遺伝子は、神経知覚・受容体関連因子や神経細胞間接着に関与するGタンパク質関連因子に属するものであり、子宮筋腫細胞の由来をうかがわせるものとして興味深い。

乳がんや前立腺がんなどの悪性腫瘍においては転写開始点の近傍のCpG部位が高メチル化となる異常が多いと報告されている¹³⁾。そこで、今回D-REAMで抽出されたなかで高メチル化異常を示した約320遺伝子について、プロモーター領域のどの部位にメチル化異常を来しているのかについても検討を行った。その結果、良性腫瘍である子宮筋腫では、転写開始点の近傍域にはメチル化異常が比較的少ないことがわかった

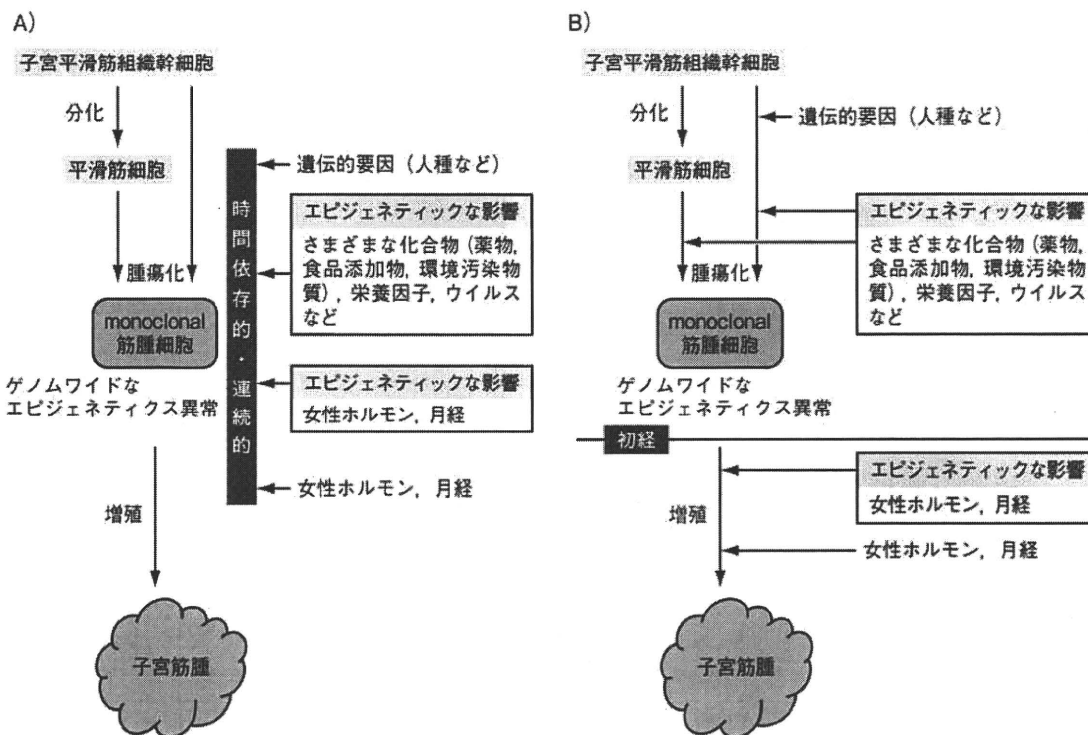


図7 われわれが考える子宮筋腫の発生・進展モデル

A) 種々の化合物や栄養因子、女性ホルモン、月経などにより時間依存的・連続的にゲノムワイドにエピジェネティクス異常が蓄積することにより、さまざまな遺伝子異常が惹起されて腫瘍が発生・進展する可能性、B) 初経以前に種々の因子によりゲノムワイドなエピジェネティクス異常を来して腫瘍細胞が形成され、初経後の女性ホルモン暴露により増殖能を獲得する可能性

い、これらの相違はエピジェネティクスの視点から見た場合、1つの細胞が良性腫瘍の性格を獲得するのか、悪性腫瘍の性格を獲得するかにも、DNAメチル化の異常の起こり方が関与していることを示唆しているのかもしれない。

2) ER α の標的遺伝子のDNAメチル化異常

乳がん細胞株MCF7を用いたChIP on chipによる解析により、ER α が結合する標的遺伝子が明らかにされている¹⁹⁾。そこでわれわれは、D-REAMによって得られたメチル化異常遺伝子のなかに、ER α の標的遺伝子が存在するかについて検討を行った。その結果、D-REAMで抽出された約780遺伝子のうち、ER α の標的となりうる遺伝子のプロモーター領域にメチル化異常が認められた遺伝子は25個あり、このうち8個は低メチル化異常で、17個は高メチル化異常であった。低メチル化異常遺伝子には、細胞分裂時の中心体の構

成因子で、細胞周期を刺激する遺伝子が含まれていた。低メチル化異常がエストロゲン刺激に対する反応性の増加に関与するとすれば、この遺伝子の発現亢進が筋腫細胞の分裂に促進的に働いている可能性がある。プロモーターが高メチル化異常を呈していた遺伝子には、がん抑制遺伝子や細胞周期を抑制する遺伝子が含まれており、高メチル化によりエストロゲンに対する反応の低下が起こるならば、これらの遺伝子の発現が減弱することになり、やはり子宮筋腫の増殖進展に関与していると考えられる。

ここで述べたER α 遺伝子そのもののDNAメチル化異常やER α の標的遺伝子のDNAメチル化異常というのは、エピジェネティックな異常がエストロゲン作用を修飾し、筋腫の発生・発育に関与する可能性を示唆したものである。

おわりに

われわれは、子宮筋腫の発生、進展機序の解明を目的として、子宮筋腫はエピゲノム異常により発生するという新規の仮説に基づいて基礎的研究に取り組んでいる。われわれの考えている子宮筋腫とエピジェネティクス異常との関係を図7に示す。図7Aに示すように、さまざまな化合物（薬物、食品添加物、環境汚染物質）、栄養因子、ウイルスなどの暴露や、女性ホルモン、月経といった影響も加わり、特定の細胞においてゲノムワイドにエピジェネティクス異常を来すことにより、さまざまな遺伝子異常が惹起されて腫瘍細胞に変化し、増殖し子宮筋腫が発生する。一方で、このような環境因子などの暴露と疾患発生には、潜伏期間が存在する可能性もある。すなわち、図7Bに示すように、さまざまな環境因子による暴露が特定の細胞においてゲノムワイドにエピジェネティクス異常を来し、さまざまな遺伝子異常が惹起され腫瘍細胞となる。その後、初経を迎え、女性ホルモンや月経の影響により、異常を受けた遺伝子が機能することにより、腫瘍細胞が増殖能を獲得し子宮筋腫が発生する可能性も考えられる。いずれにしても、細胞の分子基盤に、ゲノムワイドのエピジェネティクス情報の変化があり、その破綻が異常細胞出現と増殖の原因となると考えている。

文献

- 1) Okolo, S. : Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol., 22 : 571-588, 2008
- 2) Sargent, M. S. et al. : Cancer Genet. Cytogenet., 77 : 65-68, 1994
- 3) Hug, K. et al. : Genes Chromosomes Cancer, 11 : 263-266, 1994
- 4) Iwatani, M. et al. : Stem Cells, 24 : 2549-2556, 2006
- 5) Eskenazi, B. et al. : Am. J. Epidemiol., 166 : 79-87, 2007
- 6) Guo, S. W. et al. : Mol. Hum. Reprod., 15 : 609-624, 2009
- 7) Rier, S. & Foster, W. G. : Semin. Reprod. Med., 21 : 145-154, 2003
- 8) Wu, Q. et al. : Biol. Reprod., 70 : 1790-1797, 2004
- 9) Yamagata, Y. et al. : Hum. Reprod., 24 : 1126-1132, 2009
- 10) Yamagata, Y. et al. : Mol. Hum. Reprod., 15 : 259-267, 2009
- 11) Li, S. et al. : Gynecol. Oncol., 90 : 123-130, 2003
- 12) Yagi, S. et al. : Genome Res., 18 : 1969-1978, 2008
- 13) Ushijima, T. & Okochi-Tanaka, E. : Cancer Sci., 96 : 206-211, 2005
- 14) Asada, H. et al. : Mol. Hum. Reprod., 14 : 539-545, 2008
- 15) Yoshida, T. et al. : Carcinogenesis, 21 : 2193-2201, 2000
- 16) Giacinti, L. et al. : Oncologist, 11 : 1-8, 2006
- 17) Li, L. C. et al. : Cancer Res., 60 : 702-706, 2000
- 18) Ahuja, N. et al. : Cancer Res., 58 : 5489-5494, 1998
- 19) Lupien, M. et al. : Cell, 132 : 958-970, 2008

<筆頭著者プロフィール>

杉野法広：昭和60年山口大学医学部卒業、直ちに山口大学医学部産科婦人科学講座に入局、平成6年に同助手、平成13年に同講師、この間平成8年から平成10年まで米国イリノイ大学医学部生理学に留学、平成15年から現職（山口大学医学部教授、産科婦人科学）。専門は生殖内分泌学で卵巣・子宮内膜機能の基礎研究に従事してきた、最近はさらに、東京大学農学部の塩田邦郎教授との共同研究で子宮筋腫とエピジェネティクスの研究を展開している。

5章

がん以外の後天的疾患と
エピジェネティクス

第9章 食の安全—エピゲノム評価に向かって—

広沢-高森瑞子*¹, 尾形聡子*², 塩田邦郎*³

1 はじめに

ヒトの全ゲノム配列決定後、すでに5年以上が経過し、時代はポストゲノム研究へと駒を進めている。ゲノムDNAの変異・欠失などは、細胞の世代を越えて継承されるため、DNA自身の変化によって、長期的・不可逆的なゲノム機能に変化を来す化合物、変異原性化合物を検出する方法は、すでに確立されてきた。しかし、長期的なゲノム機能の変化はDNA自身の変化のみとは限らない。DNAの塩基配列だけではどうしても説明できない、遺伝子の発現や抑制などの機能を制御する要となっているエピジェネティクス機構は、今最も注目されている生命科学の研究分野のひとつである。エピジェネティクスは、ひとつの受精卵が、さまざまな細胞からなる個体を形成するまでの鍵を握っているのみならず、その異常が、ガンや慢性疾患などの病気とも関わりを持つことが解明され始めている。我々の一生涯に渡って影響を及ぼすエピジェネティクス機構の異常を知ることが、疾患の発症メカニズムを探る助けとなり、また、健康に過ごすための手立てとなる可能性を秘めている。「食は命である」とも表現されるように、健康維持にとって、健全な食生活は欠かせない。現在、食の安全性を検討するひとつの研究手法としてエピジェネティクスに注目が集まっている。

2 エピジェネティクスとは

ヒトの身体は、受精卵が細胞分裂、増殖、分化を繰り返していくことで、60兆個を超えるおよそ200種類のさまざまな形態や機能を持つ細胞で構成されている。各々の細胞の核に存在するDNAはいずれも同じものであるのに、違う種類の細胞へと分化するのはなぜなのだろうか。それには、DNAに書き込まれた遺伝情報が、いつ、どこで、どのように働くかという、遺伝子発

* 1 Mitsuko Hirose-Takamori 東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用動物科学専攻 特任助教

* 2 Satoko Ogata 東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用動物科学専攻

* 3 Kunio Shiota 東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用動物科学専攻 教授

現のオン・オフを制御する仕組みが必須となる。また、一度分化して種類が決まった細胞では、細胞分裂して増殖していく際に、同じ遺伝子発現のパターンが継承されていく必要もある。その仕組みを制御しているのが、エピジェネティクスと呼ばれるメカニズムであり、DNAメチル化とヒストン修飾が分子機構の中心となっている。

エピジェネティクスは、「DNA塩基配列の変化を伴わず、細胞分裂後も継承される遺伝子機能の変化を研究する学問領域」と定義されている。エピジェネティクス研究の柱のひとつとなっているDNAメチル化は、哺乳類ゲノムDNAで観察される唯一の化学修飾であり、1948年にウシ胸腺ゲノムDNA研究によって発見されたことが始まりである。哺乳類では、ゲノムDNAを構成するアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)の4種類の塩基の中で、主にCG配列(CG相補対との混同を避けるためCpGと記す)のシトシンの5位がメチル化修飾される。

DNAがメチル化されると、メチル化された遺伝子領域に、ヒストンをアセチル化したりメチル化したりする修飾酵素がリクルートされることで、クロマチンの構造が凝縮し、遺伝子発現が抑制されることが分かってきている。一方、遺伝子が発現している領域ではDNAはメチル化されていないため、クロマチン構造が緩んだ状態になっている。

長い間、細胞や組織に特異的な遺伝子発現は、転写因子のみで調節されていると説明されてきたが、実際に転写因子が働くためにはDNAとヒストンの複合体であるクロマチン構造がどのような状態になっているのかが重要となってくる。DNAメチル化やクロマチン構造による制御と転写因子による制御との関係は、ラジオのメインスイッチとボリュームスイッチにたとえることができる。ボリュームスイッチである転写因子は、遺伝子の発現量を調節することはできるが、メインスイッチが切られた状態では働くことができないのである^{1,2)}(図1)。

3 細胞の種類に特有のDNAメチル化プロフィール

ゲノムの上には、エピジェネティクス制御を受ける膨大な数の遺伝子群が存在する。エピジェネティクス制御下にある遺伝子群は、転写因子のみにより制御される遺伝子群と比べて、より厳密な制御を受け、遺伝子発現の記憶は細胞分裂後も継承され得る。これらの遺伝子群は細胞分化や組織特異的な機能に関わり、形質の維持に不可欠な遺伝子群が含まれる。

個体発生に必須なPOU family 転写因子のひとつであるOct4は、哺乳類の初期胚や胚性幹細胞(ES細胞)など、全能性や分化多能性を有する細胞で発現し、その他の分化した体細胞ではその発現が厳しく抑制されていて、多分化能維持のマスター遺伝子とされている。Oct4遺伝子の上流には発現を制御する領域があり、そこには多数のCpG配列が存在している。例えばOct4遺伝子の発現が見られるES細胞では、制御領域のDNAはメチル化されておらず、ヒストンは高ア

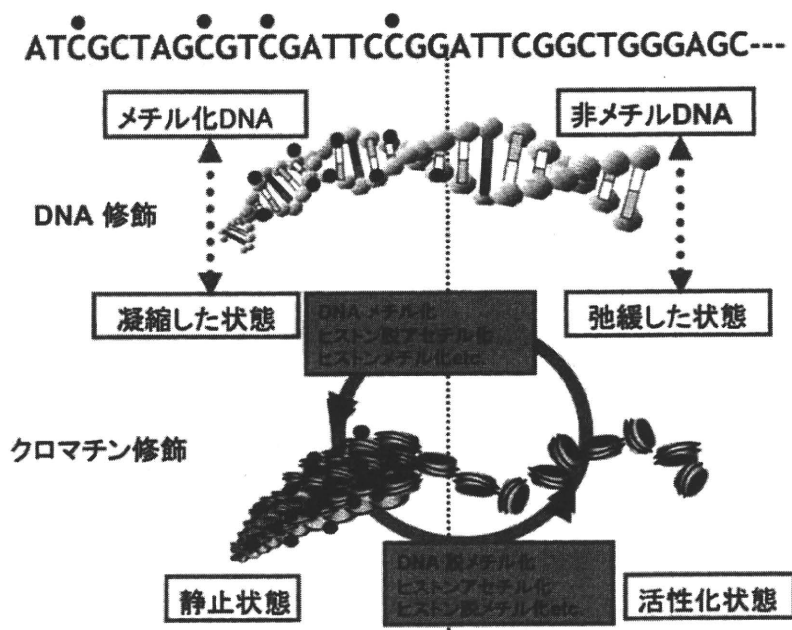


図1 DNA修飾とクロマチン修飾によるエピジェネティック制御

セチル化状態にあるために緩んだクロマチン構造(ユークロマチン)となり、遺伝子発現が可能な状態にある。それに対して、分化した細胞においては、DNAは高頻度にメチル化され、ヒストンは脱アセチル化され、クロマチン構造が凝縮された状態(ヘテロクロマチン)にあることが分かっている。すでに分化した体細胞においては、エピジェネティクス制御を手段として、他の方面に細胞が分化していくのを巧みに防いでいるのである³⁾。

同様に、性の分化を司る転写因子 Sry 遺伝子の領域も発生中の性腺細胞でのみ DNA は低メチル化状態にあり、それ以外の細胞では DNA は高メチル化状態にある。性腺発生時にのみ発現が許され、他の時期と他の細胞では厳しく抑制された状態にあるのである。このように、エピジェネティクス制御系は、細胞の分化や個体発生に重要な制御系であることは疑う余地がない⁴⁾。

Oct4 や Sry のように、細胞/組織特異的にメチル化/脱メチル化される領域(Tissue dependent differentially methylated region : T-DMR)を持つ遺伝子は、少なくとも、ゲノム上に数千以上が存在する。ゲノム上に散在するこれらの遺伝子には、それぞれの DNA メチル化パターンが存在し、その組み合わせは細胞の種類に特有である。この細胞腫固有の DNA メチル化パターン、すなわち T-DMR の集合をメチル化プロフィールと呼ぶ(図 2)。T-DMR を持つ遺伝子は、転写因子、酵素、ホルモンなど、多岐にわたる。組織特異的な遺伝子発現は、マスター遺伝子とみなすことができるいくつかの転写遺伝子の組み合わせにより調節されている。DNA メチル化状況をゲノム全域にわたって解析したところ、成体の組織では、これらのマスター遺伝子、及び下流の組織特異的な発現遺伝子は、組織特異的かつ協調的にメチル化制御されていることが分かった。

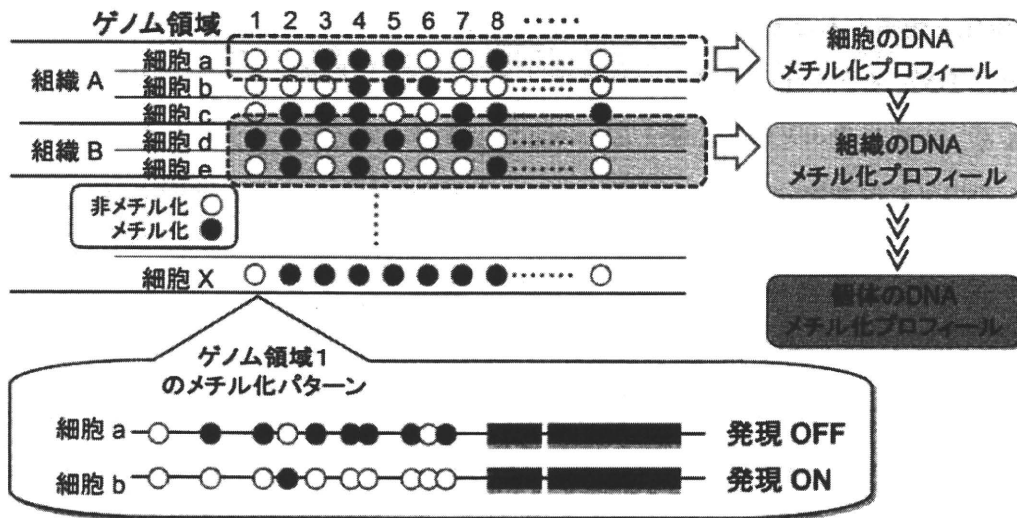


図2 DNAメチル化プロファイル

つまり、DNAメチル化プロファイルは、細胞・組織機能そのものとして、さまざまな細胞の特異的形質の分子基盤になっていることが分かる⁵⁾。

4 次世代に継承されるエピジェネティクス

細胞世代を越えてのDNAメチル化プロファイルの継承は、DNAメチル基転移酵素によって行われる。DNAメチル基転移酵素は、DNA複製時に、親鎖DNAメチル化パターンを新生鎖のDNAに写しとる維持型メチル化活性を持つ。また、DNAメチル基転移酵素は維持型活性を持つものだけでなく、メチル化されていないシトシンを新規にメチル化する、*de novo*メチル化活性を持つ酵素も存在している。脱メチル化については、現在脱メチル化酵素は発見されていないが、DNA複製時にDNAメチル化が維持されない消極的な脱メチル化と、複製元となるDNAも脱メチル化してしまうような積極的な脱メチル化が知られている。このように、DNAのエピジェネティック修飾は、新たにメチル化される系と次世代の細胞に継承される系の両方のメカニズムによって支えられている。DNAメチル化パターンが継承されることで、非メチル化領域は活性化状態として、メチル化された領域は不活性化状態として、細胞分裂後もその状態は保たれることになる¹⁾。

ヒストン修飾については、染色体が複製される時に、修飾(アセチル化、メチル化、リン酸化など)されたヒストンH3とH4が娘細胞にランダムに振り分けられ、それを標的としてヒストン修飾酵素が誘導され、隣接するヒストンを新たに修飾するという仮説が提唱されている。DNAのメチル化がヒストン修飾を誘導するメカニズムとともに、近年我々は、ヒストン修飾が

DNAメチル化を誘導することを報告した⁶⁾。

このようにDNAメチル化とヒストン修飾は、グローバルに協調しながら、DNAメチル化プロフィールを、次の世代へと正確に伝える。一方で、万が一エピジェネティクス制御に混乱が生じた場合、その乱れは細胞分裂後にも継承されてしまいかねない。

5 エピジェネティクス系に影響を及ぼす因子

エピジェネティクスを継承していくためのDNAメチル基転移酵素やヒストン修飾酵素、あるいは、これら酵素の基質や補酵素、さらには、これらに関与する分子修飾や細胞内移動などが影響を受けた場合、エピジェネティクス制御の混乱によって、細胞のゲノム機能は不可逆的な変化を起こす可能性がある。従来、ガン化など、細胞形質の不可逆的な変化は、ゲノムの塩基配列の変化を伴う突然変異によるとされてきたが、エピジェネティクスの変異によって、一旦メチル化プロフィールに乱れが生じれば、細胞世代を越えて、細胞の形質異常が慢性的に持続する可能性がある(図3)。

ゲノムの塩基配列に変化を起こす物質のことを(突然)変異原と呼ぶのに対し、エピジェネティクスに変化を起こすものはエピ(突然)変異原と呼ばれる。栄養因子の中にも、DNAメチル化に影響を与えることが明らかにされているものが存在する。葉酸やメチオニン、コリンなどは、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。これらを欠乏した食事を摂取することと腫瘍形成との関連性が示唆さ

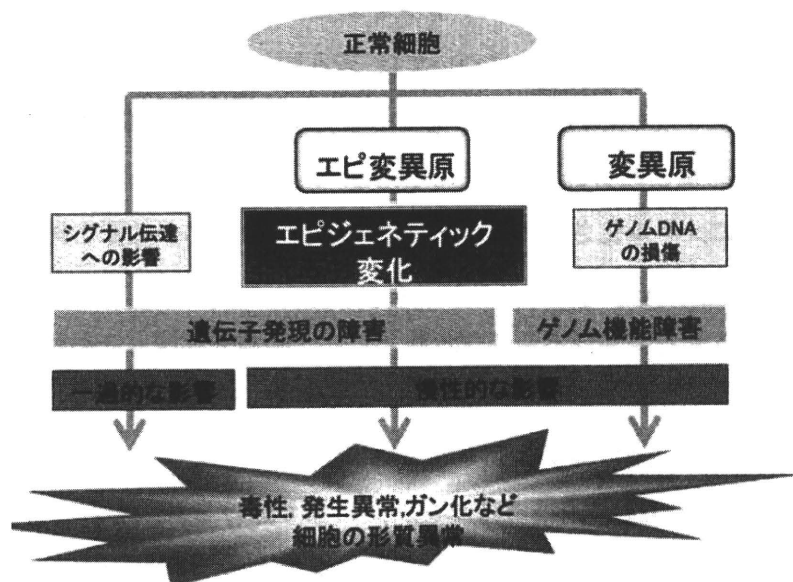


図3 変異原およびエピ変異原による細胞形質への影響

れている。さらに、胎児期の栄養状態もまた、エピジェネティクス系に影響を及ぼしていることが明らかにされており、マウスを使った実験では、母親に与える葉酸の量によって出生後のⅡ型糖尿病への罹患率が変化することや、コリン欠乏食が胎児の海馬の発達異常を起し、記憶力の程度に差が生じることも分かっている。これらは、いずれも DNA メチル化の状態の異常が関与していると考えられている^{7,8)}。

栄養因子に加えて、思わぬ化合物がエピジェネティクス系に作用していることも発見されている。てんかんの治療に用いられてきたバルブロン酸にヒストン脱アセチル化阻害作用が見つかった⁹⁾。また、腸管上皮細胞の分化促進作用を持つ酪酸ナトリウムには、ヒストン脱アセチル化酵素に強力な阻害作用がある¹⁰⁾。ジメチルスルホキシド (DMSO) はさまざまな細胞の凍結保存や脂溶性物質の溶媒としても利用されているが、最近我々は、DMSO が DNA メチル基転移酵素の発現を高め、DNA メチル化プロフィールを変化させることを明らかにし、汎用性試薬の中にもエピ変異原が含まれていることが明らかになってきている¹¹⁾。

近年、我々はさまざまな化学物質に暴露されており、母体中に存在する化学物質の一部は胎児の発生に影響を及ぼす可能性があるかと懸念されている。胎児のエピジェネティクス状況に影響を与える可能性のある化学物質として、上記の汎用試薬以外にも、ダイオキシン、ステロイド、農薬、殺虫剤、食品添加物などが挙げられ、未だにエピ変異原物質を検出する体制が確立していない状況にある。

このように、栄養因子、汎用試薬、そしてさまざまな化学物質の中に、エピ変異原が存在するという事実は、いまや、食の安全管理に関しても、DNA の塩基配列に変異をもたらす「変異原性」を調べる従来の方法を用いただけでは不十分であることを示唆している。エピ変異原としてエピジェネティクス系に影響を与え得るさまざまな因子について、それらの影響を DNA メチル化プロフィール解析することにより、リスク管理することが可能である。エピジェネティクスの破壊は、異常な細胞を生み出すことになり、最終的にはガンや慢性疾患の原因となっていると懸念される以上、エピ変異原性化合物を軸とした食の安全評価の必要性がクローズアップされてきている。

6 ポストゲノム時代におけるエピジェネティクス研究の重要性

ヒトゲノムプロジェクトの完了後、ポストゲノム研究としてゲノム情報に基づくタンパク質や糖鎖の構造・機能解析や、疾患と関連する SNPs 解析などの研究が推し進められているが、その中でもさまざまな生命科学分野においてエピジェネティクス研究の重要性が認識されている。エピジェネティクスは、個体の生涯を通じて安定したジェネティクス (ゲノム DNA 情報) と、瞬時

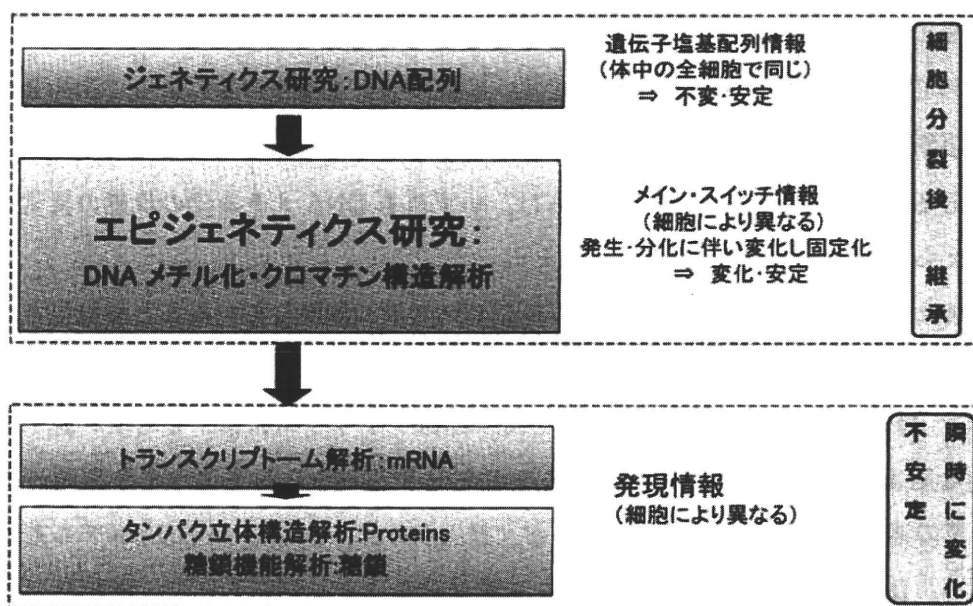


図4 エピジェネティクス研究の位置付け

に変化する RNA 発現情報との間に位置している (図4)。細胞の種類によって、異なるメチル化プロファイルを持つということは、体を構成するすべての種類の細胞において、メチル化を基準として、正常と異常を定義することが可能になる。エピジェネティクス異常が、細胞・組織の形態や機能の不可逆的な異常を引き起こす原因になることから、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が世界的な広がりを見せ、現在、ゲノム全体のエピジェネティクス状態を網羅的に解析するエピゲノム解析が盛んに行われている。エピジェネティクスはポストゲノム研究の新たなパラダイムで、食品安全性評価のみならず、さまざまな生活習慣病を含む病気の診断、創薬標的探索、再生医療など、21世紀の生命科学領域の新たな分子基盤となることは間違いない。

7 おわりに

我が国は、カロリーベースの約6割を輸入食品に依存している。全世界からの長距離輸送が瞬時に行われる時代において、カビや微生物の発生、あるいは乾燥を防ぎ、鮮度を保つ技術の追求が加速している。加えて、利便性を求める消費者の声にこたえて、輸入された遺伝子組換え原材料を用いた加工食品を含め、食卓に上る食品はますます多彩になっている。このように、著しい食のグローバル化が進む中、食の健全性を確保するために、世界対応のリスク評価システムを確立する必要がある。メチル化プロファイルを基盤にしたエピ変異原化合物の探索/検出システム構築は、食の安全に関する新規の評価系を提供できるであろう。

文 献

- 1) E. Li, *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 662 (2002)
- 2) K. Shiota *et al.*, *Cytogenet. Genome Res.*, **105**, 325 (2004)
- 3) N. Hattori *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 17063 (2004)
- 4) K. Nshino *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 22306 (2004)
- 5) S. Yagi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 22306 (2004)
- 6) K. Ikegami *et al.*, *Genes Cells*, **12**, 1 (2007)
- 7) C. D. Davis & E. O. Uthus, *J. Nutr.*, **133**, 2907 (2003)
- 8) G. John *et al.*, *実験医学*, **23**, 2122 (2005)
- 9) D. Umlauf *et al.*, *Methods Mol Biol.*, **287**, 99 (2004)
- 10) A. R. Florl *et al.*, *Br. J. Cancer*, **80**, 1312 (1999)
- 11) M. Iwatani *et al.*, *Stem Cells*, **24**, 2549 (2006)
- 12) 塩田邦朗ほか編, DNAメチル化研究法, 学会出版センター (2006)
- 13) 中尾光善ほか編, 実験医学増刊, ゲノムワイドに展開するエピジェネティクス医科学, 羊土社 (2006)
- 14) 塩田邦朗企画, 特集: 疾患解明への新たなパラダイム, エピジェネティクス実験医学, 2005年9月号 (2005)

Epigenetic Assessment of Environmental Chemicals Detected in Maternal Peripheral and Cord Blood Samples

Yoshikazu Arai¹, Jun Ohgane¹, Shintaro Yagi¹, Rie Ito², Yusuke Iwasaki², Koichi Saito², Kazuhiko Akutsu³, Satoshi Takatori³, Rie Ishii⁴, Rumiko Hayashi⁵, Shun-Ichiro Izumi⁶, Norihiro Sugino⁷, Fumio Kondo⁸, Masakazu Horie⁴, Hiroyuki Nakazawa², Tsunehisa Makino⁹, and Kunio Shiota^{1,*}

¹Laboratory of Cellular Biochemistry, Animal Resource Sciences/Veterinary Medical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

²Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, Tokyo 142-8501, Japan

³Division of Food Chemistry, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka 537-0025, Japan

⁴Saitama Prefectural Institute of Public Health, Saitama 338-0824, Japan

⁵Department of Toxicology, Aichi Prefectural Institute of Public Health, Aichi 462-8576, Japan

⁶Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Tokai University, Kanagawa 259-1193, Japan

⁷Department of Obstetrics and Gynecology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube 755-8505, Japan.

⁸Department of Pharmacology, School of Medicine, Aichi Medical University, Aichi 480-1195, Japan

⁹Toubu Hospital, Shizuoka 412-0041, Japan

*Corresponding Author: Kunio Shiota

Phone: +81-3-5841-5472, Fax: +81-3-5841-8189

E-mail: ashiota@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Running head: Epimutagens in fetal environment

ABSTRACT

Epigenetic alteration is an emerging paradigm underlying the long-term effects of chemicals on gene functions. Various chemicals, including organophosphate insecticides and heavy metals, have been detected in the human fetal environment. Epigenetics by DNA methylation and histone modifications, through dynamic chromatin remodeling, is a mechanism for genome stability and gene functions. To investigate whether such environmental chemicals may cause epigenetic alterations, we studied the effects of selected chemicals on morphological changes in heterochromatin and DNA methylation status in mouse ES cells (ESCs). Twenty-five chemicals, including insecticides organophosphates insecticides, heavy metals, and their metabolites were assessed for their effect on the epigenetic status of mouse ESCs by monitoring heterochromatin stained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI). The cells were surveyed after 48 or 96 hr of exposure to the chemicals at the serum concentrations of cord blood. The candidates for epigenetic mutagens were examined for the effect on DNA methylation at genic regions. Of the 25 chemicals, five chemicals (diethylphosphate (DEP), mercury (Hg), cotinine, selenium (Se), and octachlorodipropyl ether (S-421)) caused alterations in nuclear staining, suggesting that they affected heterochromatin conditions. Hg and Se caused aberrant DNA methylation at gene loci. Furthermore, DEP at 0.1 ppb caused irreversible heterochromatin changes in ESCs, and DEP-, Hg-, and S-421-exposed cells also exhibited impaired formation of the embryoid body (EB), which is an *in vitro* model for early embryos. We established a system for assessment of epigenetic mutagens. We identified environmental chemicals that could have effects on the human fetus epigenetic status.

Key Words: DNA methylation, embryoid body, epigenetic mutagens, ES cells, heterochromatin

INTRODUCTION

Many chemicals have been widely used in the household, agricultural, and urban environment and there are various environmental chemicals in the fetal growth environment: organophosphate insecticides (chlorpyrifos), perfluorooctane sulfonate (PFOS), di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), elements of tobacco smoke (nicotine and cotinine), and heavy metals (lead (Pb), cadmium (Cd), and mercury (Hg)) [1–5]. Hg occurs in the daily intake of rice in China [6]. Prenatal exposure to environmental chemicals such as organophosphate insecticides, tobacco smoke, heavy metals, and perfluorinated compounds (PFCs) are associated with fetal growth restriction and low birth weight of infants [7–10]. The concentration of chemicals detected in the fetal environment is, however, relatively low (around 0.1–10 ppb level) and far from the pharmacological studies. Such a low concentration may accumulate in the fetus and placenta and may affect the fetal growth [11–14], and alternatively, some chemicals may have long-term effects on gene functions and stability even at low concentration without accumulation in the fetal tissues and placenta [15, 16].

Epigenetic alterations have become an emerging paradigm responsible for irreversible phenotypic change through long-term gene regulation. The epigenetic marks such as DNA methylation, histone modifications, and heterochromatin/euchromatin cause dynamic change of cellular conditions and cell types [17–19]. In mammals, heterochromatin, a highly condensed structure of chromatin, is characterized by DNA hypermethylation and histone modifications such as H3-K9 and -K27 methylation [20–22]. Pericentric regions of chromosomes involve major satellite repeats forming constitutive heterochromatin [23]. Heterochromatin can be visualized by nuclear staining with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in mouse cells. Chemical-induced epigenetic alterations in cell nuclei may be visualized by nuclear staining with DAPI as well as major satellite repeats.

There are a large number of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) in the mammalian genome [24–26]. Embryonic stem cells (ESCs) established from the inner-cell mass have an ability for pluripotency, which is critical for mammalian development. The profile of T-DMRs—termed the ‘DNA methylation profile’—is distinctive in every cell type, including ESCs and somatic cells [25, 27]. *Study of the DNA methylation profile of ESCs and somatic cells showed*