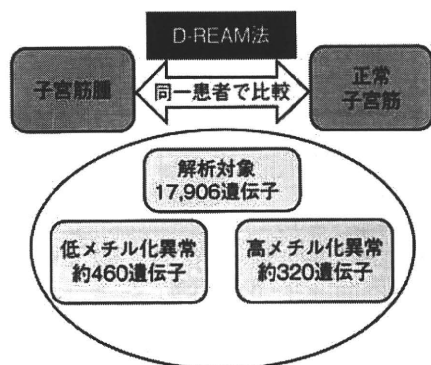


A)



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<sup>12)</sup>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<sup>13)</sup>。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

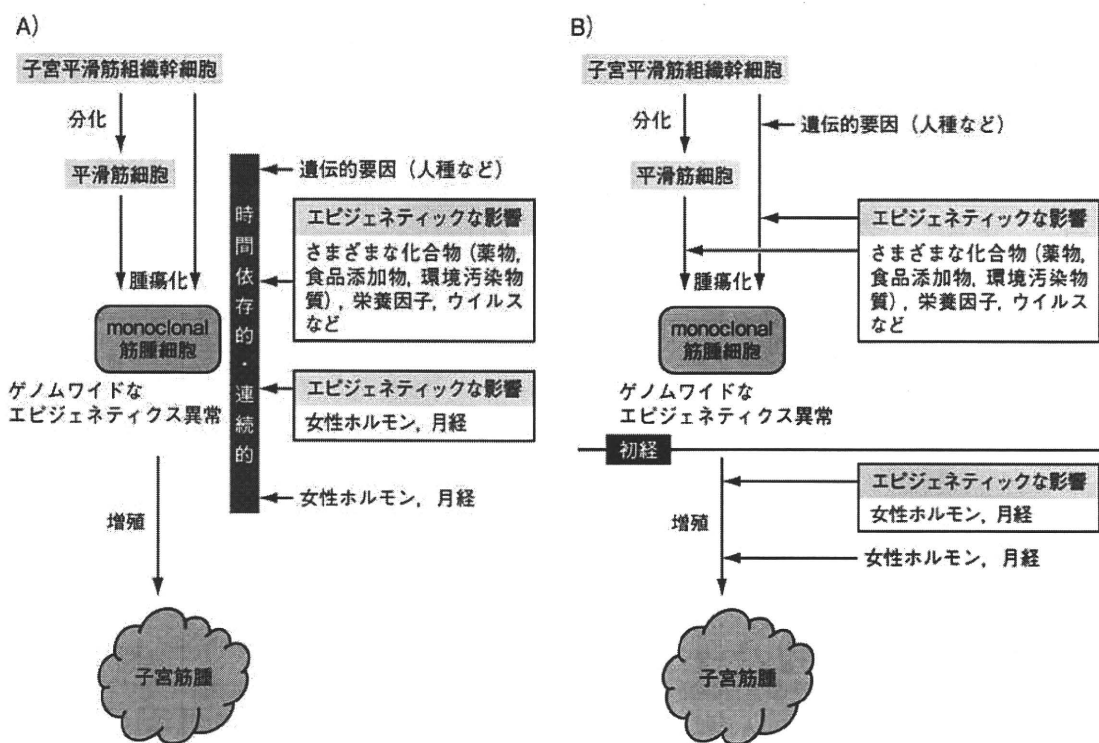


図7 われわれが考える子宮筋腫の発生・進展モデル

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 $\alpha$ 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 $\alpha$ が結合する標的遺伝子が明らかにされている<sup>19)</sup>。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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 遺伝子そのもののDNAメチル化異常やER $\alpha$ 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) Ricr, 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。最近はこちらに、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\*<sup>1</sup>, 尾形聡子\*<sup>2</sup>, 塩田邦郎\*<sup>3</sup>

### 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

現在のオン・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<sup>1,2)</sup>(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

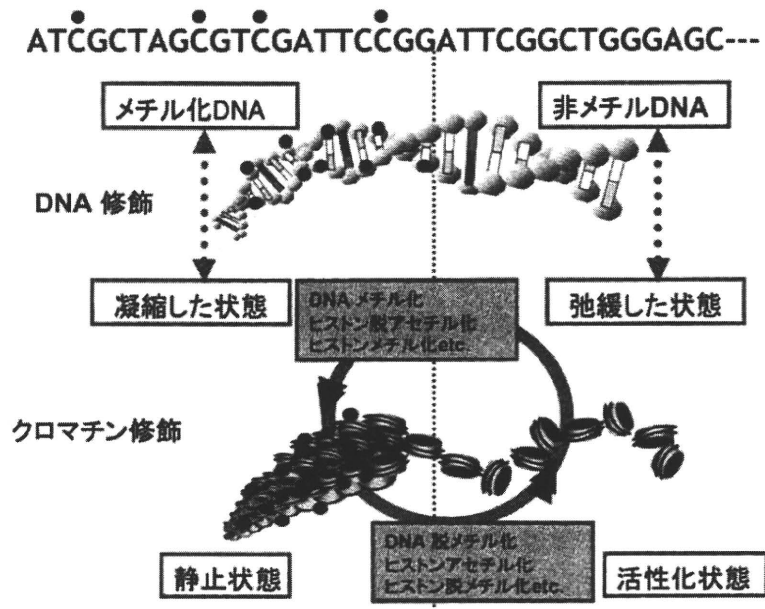


図1 DNA修飾とクロマチン修飾によるエピジェネティック制御

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<sup>3)</sup>。

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<sup>4)</sup>。

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。

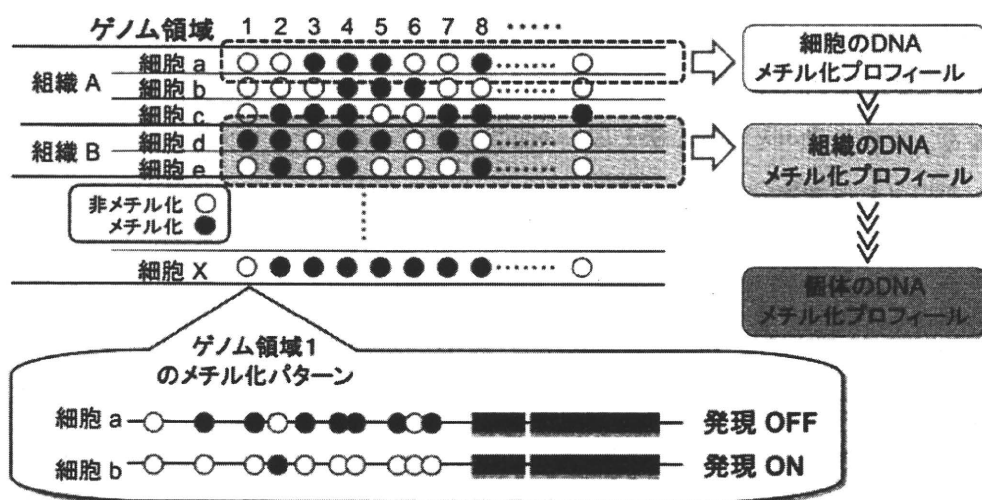


図2 DNAメチル化プロフィール

つまり、DNAメチル化プロフィールは、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<sup>5)</sup>。

#### 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メチル化プロフィールの継承は、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<sup>1)</sup>。

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<sup>6)</sup>。

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pi(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

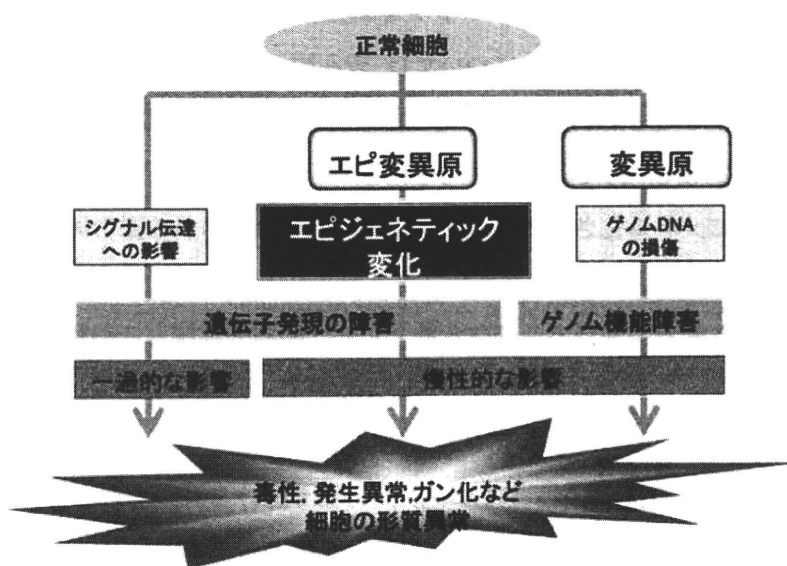


図3 変異原およびエピ変異原による細胞形質への影響



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<sup>7,8)</sup>。

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<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>。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 メチル化プロファイ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<sup>11)</sup>。

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 メチル化プロファイ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綻は、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

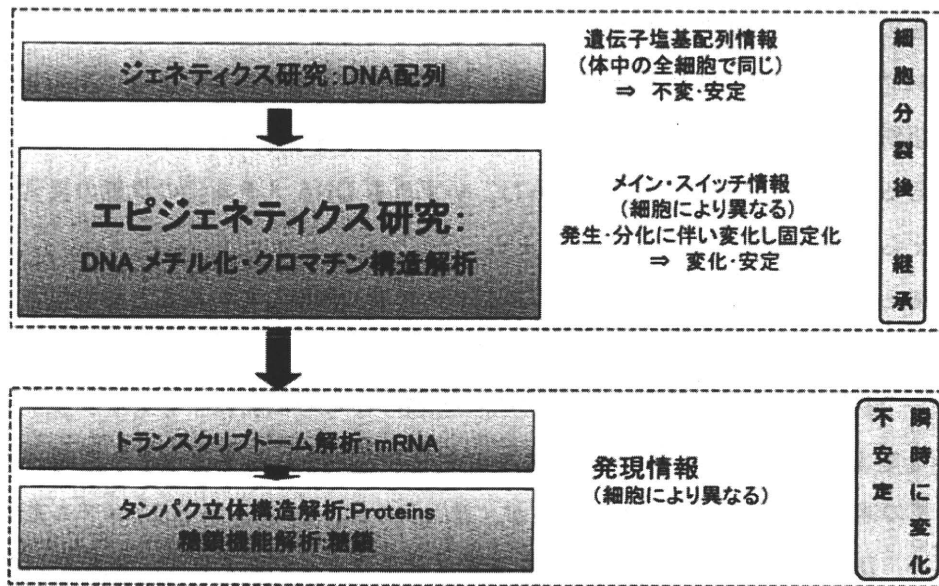


図4 エピジェネティクス研究の位置付け

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.*, *Cytoget. Geneome 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. Cnser*, **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)

# 母児環境における化学物質

## Chemicals in Feto-Maternal Environment

(社)有隣厚生会東部病院院長

牧野恒久

約40年前に「地球の日」が制定されて以来、私どもを取りまく生活環境は、水質汚染、大気汚染などを見回しても次第に改善されてきたかの印象が持たれる。一方で、生活環境の中での化学物質は5,000万種類ともいわれ、年間1,000トン以上製造される化学物質に限ってもその種類は5,000種以上と報告されている。近年、生活環境の改善の報告とは裏腹に、これら化学物質による食品汚染、農薬汚染、食物連鎖による生物濃縮などの報告も増加してきた。このような状況下で、今一度、母体、胎児、子どもにおける母体血、臍帯血、羊水、乳汁の試料中の化学物質の暴露状況を検討することは重要と思われる。

「目的」胎児ならびに子どもは外来化学物質に対して脆弱な集団で、有害な化学物質から早期に保護しなければならない。此の事は、どのような化学物質がどの程度暴露されているか正確な情報を入手するとともに、暴露量の範囲内で速やかに健康評価を下せることが必須である。私どもは平成11年度より厚生労働省化学物質リスク研究事業の一環として、子どもの健康影響に与える化学物質の絞り込み、多岐にわたる生体試料中の化学物質の信頼しうる測定法の開発、それによる真の暴露量の入手、暴露量の範囲内での健康評価方法の開発に携わり、それらをこの機会にまとめてみた。

「方法」子どもの生活環境から絞り込まれた化学物質は以下の通りである。

(A) ビスフェノールA (B) フタル酸エステル (C) ノニ

ルフェノール (D) ポリ臭素化ジフェニールエーテル (E) 有機フッ素系化合物 (F) ピレスロイド系農薬 (G) 有機リン系農薬 (H) ニコチン、コチニン

ビスフェノールAはポリカーボネートに代表される樹脂原料であり過去に国内だけでも年間約30万トンの生産量が記録されている。フタル酸エステルはプラスチックの可塑剤として塩ビ、シート、電線の被覆材などに多用されている。体内では多くの代謝産物に分解され、催奇形性や雄性生殖期への異常が報告されている。ノニルフェノールはアルキルフェノールとして総称される一群の化学物質でとくにC9のノニルフェノールは早くから内分泌かく乱化学物質として注目されてきた。本物質は界面活性剤、フェノール樹脂としてその多くが用いられている。

ポリ臭素化ジフェニールエーテルは合成樹脂の難燃剤として電子機器に多量に使用され、環境汚染物質にも指定されている。近年、北欧ではヒト母乳中での増加が報告されている。わが国では1980年以降毎年数万トンのPBDEsを消費しているが健康、とくに子どもに対する報告はない。有機フッ素系化合物はパーフルオロ化合物に代表され、繊維の撥水剤、消火剤、界面活性剤として多用され、野生動物、魚類への汚染が以前から報告されてきた。生体内では難分解性で血液に特異的に蓄積され血中半減期はPFOSで8年、PFOAで4年と極めて長いことが特徴的である。すでに甲状腺機能かく乱作用、催奇形性などが報告されているが、ヒトでの臍帯血、母乳を通じての胎児、新生児への汚染、影響は

その詳細が不明である。ピレスロイド系農薬は家庭で使用される殺虫剤の90%を占め、有機リン系農薬は世界で最も使用される農業殺虫剤としての使用は全農薬の約50%を占める。後者のクロロピリホスは以前から神経系や脳の発達に影響を及ぼすことが報告され、メキシコの農業地帯では子どもたちの体力低下、協調性の低下などが報告されている。一方、母胎への暴露量とその影響についての詳細は検討されていない。ニコチン、コチニンについては臍帯血中での暴露量の同時測定から母胎児への濃度勾配を検討した。

測定法の開発に際しては、これまでのELISA法、RIA法などの免疫学的測定法の得失を考慮し、すべて特異性と測定感度に優れた質量分析法を開発した。すなわち、ビスフェノールAの測定には内部標準物質に BPA-d16 を用いて選択的イオン検出法(SIM)でLCMS/MS上で測定した。その結果、定量感度0.5ppbの鋭敏な測定感度を持つ測定法を開発しえた。アルキルフェノールについては内部標準物質に NP-d5 を用いた LCMS 上で electrospray イオン化法で測定し、定量限界 5ppb の新しい測定法を開発した。フタル酸とくにジエステルヘキシルフタル酸(DEHP)については内部標準物質に DEHP-d4 を使用し GCMS 上で展開し、フタル酸エステル類のピーク面積を内部標準のピーク面積で除した数値と標準溶液のそれとを比較して定量する測定法を開発、定量限界 10ppb を得た。ポリ臭素化ジフェニールエーテルの測定には NIST から提供された標準参照試料(SRM2585)を使用し同位体希釈法を利用した GCMS による測定法を開発した。有機フッ素系化合物についてはオンライン固相抽出-高速液体クロマトグラフィー(LC)タンデム質量分析法(MS/MS)から成る測定システムを構築することに成功した。ピレスロイド系農薬については共通する代謝産物 3-phenoxybenzoic acid(3PBA)をターゲットとする LCMS/MS 高感度分析法を、有機リン系農薬についてはジアルキルリン酸を指標と同じく LCMS/MS 高感度迅速分析法を開発した。ニコチン、コチニンについては親水性相互作用クロマトグラフィー質量分析法による血中両物質を同時測定し、定量限界値 1.0ng/ml (ニコチン)、0.4ng/ml (コチニン)の高感度分析法を開発した。

#### 「成績」 化学物質暴露量の実態

(1) ビスフェノールAの健常人 (n=37) 尿中排泄量は平均  $1 \mu\text{g/day}$  となり、EUの暫定TDI  $500 \mu\text{g/day}$  の約500分の1で

あった。血中のカットオフ値を  $0.5\text{ng/ml}$  として妊婦血中(n=86)のビスフェノールAを測定すると僅か1例(1.2%)のみが陽性であり、臍帯血中では検出されなかった。

(2) ジエチルヘキシルフタル酸(DEHP)の血中カットオフ値を  $10\text{ng/ml}$  とすると、妊婦血中(n=79)で4例(5.1%)、臍帯血中(n=46)で1例(2.1%)が陽性であった。胎脂からは極めて高濃度( $3,590\text{--}92,100\text{ng/gm}$ )のDEHPが検出された。フタル酸モノエステルについては12組の母子について、全ての母体血中からフタル酸モノブチル(MBP)、フタル酸モノエチルヘキシル(MEHP)を検出した。母体血中のMBPおよびMEHPの中央値は13.9および  $3.1\text{ng/ml}$  であった。一方、臍帯血中のMBPおよびMEHPの中央値は12.7および  $2.2\text{ng/ml}$  となり、母体血中値と臍帯血中値が同程度の濃度であることは、これら2化学物質が母体から胎児へ移行している事が窺われた。母乳中(n=11)からもMBP(中央値:  $2.6\text{ng/ml}$ )、MEHP(中央値:  $27.9\text{ng/ml}$ )がそれぞれ検出された。

(3) ノニルフェノール(NP)は血中カットオフ値を  $5\text{ng/ml}$  とした場合、母体血中 (n=78) で6例(7.7%)、臍帯血中(n=48)で4例(5.1%)、尿中(n=16)で12例(75%)の陽性率であった。

(4) ポリ臭素化ジフェニールエーテル(PBDEs)については、子どもの生活空間(床上  $30\text{--}50\text{cm}$ )を勘察してハウスダストを分析したところ、平均  $740\text{ng/g}$  と比較的高濃度のPBDEsが検出された。

(5) 有機フッ素系化合物(PFCs)については全てのハウスダスト(n=20)からPFOSが、全ての母乳中(n=10)からPFOS、PFOAが検出された。

(6) ピレスロイド系農薬の代謝産物である3-PBAは尿中で抱合型の中央値が  $0.58\text{ng/ml}$ 、有機リン系農薬のクロロホスピスの中央値が  $0.58\text{ng/ml}$  と検出された。

(7) ニコチン、コチニンは母児同一試料から検出され、コチニンは、母体血中(n=51)では  $0.4\text{--}177.2\text{ng/ml}$  であった。

#### 「考案ならびに結論」

最新の測定方法を用いて、化学物質の母児暴露の状況を提示した。

「参考文献」 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク事業「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究」平成17-19年度、主任研究者 牧野恒久

## Epigenetics for Biomedical Sciences

Mitsuko Hirosawa-Takamori, PhD, Hui Wen Lim, PhD,  
Shintaro Yagi, PhD, and Kunio Shiota, DVM, PhD

**Abstract:** Epigenetics is fundamental to the development and maintenance of cellular phenotypes. Epigenetic status is inherited by the next cell generation and is changeable during the process of cellular differentiation. DNA methylation, in association with histone modifications and chromatin condensation, is a major epigenetic event that causes gene silencing. Every cell type or tissue has a unique DNA methylation profile comprising at least thousands of tissue-dependent differentially methylated regions (T-DMRs), suggesting that the epigenetic changes at T-DMRs underlie cellular differentiation. Genome-wide epigenetic information is called the epigenome. Disruption of the normal epigenome produces aberrant cells with prolonged abnormal phenotypes. Epimutation may be more common than previously thought considering there are numerous T-DMRs in the mammalian genome. Mutation and epimutation are inherited by the next cell generation, and both continue throughout life. However, epimutation is reversible, and drug treatment could potentially reverse the epigenetic status. Analysis of the epigenome will provide insight into novel advances in diagnosis and treatment of, as well as drug development for, complex chronic diseases.

**Key Words:** epigenetics, DNA methylation, epigenome, tissue-dependent differentially methylated regions (T-DMRs), human diseases

(*Cornea* 2009;28(Suppl. 1):S7-S13)

Epigenetics has been defined as “the study of mitotically and/or meiotically heritable changes in gene function that cannot be explained by changes in DNA sequence.”<sup>1</sup> Recently, epigenetics has been more broadly defined as “the study of processes that produce a heritable phenotype that does not strictly depend on DNA sequence.”<sup>2</sup>

Most human diseases are related in some way to loss or gain of gene function. Indeed, it has been established that >8000 human diseases are caused by defects in single genes.<sup>3</sup> In addition, more complex diseases with chronic symptoms including diabetes,<sup>4</sup> hypertension,<sup>5</sup> and corneal dystrophies<sup>6</sup> are thought to be related to multiple gene mutations. To study the genetic component of many human

diseases, large sets of human single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified and mapped to referenced human genome sequences.<sup>7</sup> For human health, the importance of mutation research is well recognized because pathological changes caused by mutations may continue throughout life.

“Heritable changes in gene function without changes in DNA sequence” are a fundamental phenomenon of mammalian development. A single fertilized egg gives rise to a complex multicellular organism consisting of various differentiated cell types. Based on a variety of physiological and morphological criteria, there are >200 differentiated cell types in mammals. In general, cellular differentiation occurs without changes in DNA sequence. Cell phenotypes may be maintained even after mitosis, when the cell is equipped with epigenetic mechanisms that enable the inheritance of gene function.

Epigenetic mechanisms regulate DNA accessibility for extended periods as described in this review. Therefore, epimutation should be recognized as another critical cause of general and chronic diseases because the resulting pathological conditions are theoretically continued for extended periods, even throughout a human life.

### EPIGENETIC MECHANISMS OF DNA METHYLATION AND HISTONE MODIFICATIONS

Methylation of cytosine residues in DNA, a unique DNA modification in vertebrate genomes, is the most studied among epigenetic inheritance mechanisms. DNA methylation occurs at the 5'-position of cytosine in a 5'-CG-3' dinucleotide (C paired G; CpG).<sup>8,9</sup> Methylcytosine is the only chemical modification of mammalian genomic DNA. The status of methylated or unmethylated CpGs is maintained after DNA replication; therefore, the DNA methylation signal is heritable throughout future cell generations, indicating that DNA methylation is a vehicle for transferring epigenetic information.<sup>10</sup>

Another major epigenetic mechanism is modification of histone proteins. To date, >60 different residues on core histones (H2A, H2B, H3, and H4) have been reported as modified. Modifications include acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, adenosine diphosphate ribosylation, deimination, and proline isomerization.<sup>11</sup>

In the nucleus, DNA is wrapped around clusters of globular histone proteins to form nucleosomes that are organized into chromatin. Changes to chromatin structure influence gene expression: genes are inactivated (switched off) when chromatin is condensed (silent) and expressed (switched on) when chromatin is open.<sup>12-14</sup> These dynamic chromatin

From the Laboratory of Cellular Biochemistry, Animal Resource Sciences/Veterinary Medical Sciences, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Reprints: Kunio Shiota, DVM, PhD, Laboratory of Cellular Biochemistry, Animal Resource Sciences/Veterinary Medical Sciences, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan (e-mail: [ashiota@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp](mailto:ashiota@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)).

Copyright © 2009 by Lippincott Williams & Wilkins

*Cornea* • Volume 28, Number 9, Suppl. 1, October 2009

[www.corneajnl.com](http://www.corneajnl.com) | S7

states are controlled by reversible epigenetic patterns of DNA methylation and histone modification, which play crucial roles in gene silencing and stabilizing chromosomal structure<sup>12-14</sup>— as shown in Fig. 1. Epigenetic mechanisms underlie various biological phenomena that include differentiation,<sup>15</sup> development,<sup>16,17</sup> X-inactivation,<sup>18</sup> and imprinting.<sup>19,20</sup>

**DYNAMIC CHANGES IN DNA METHYLATION**

The maternal genome is demethylated gradually, whereas the paternal genome undergoes rapid DNA demethylation immediately after fertilization.<sup>21</sup> However, change in the methylation status of bulk DNA is not always parallel with changes in gene coding areas.

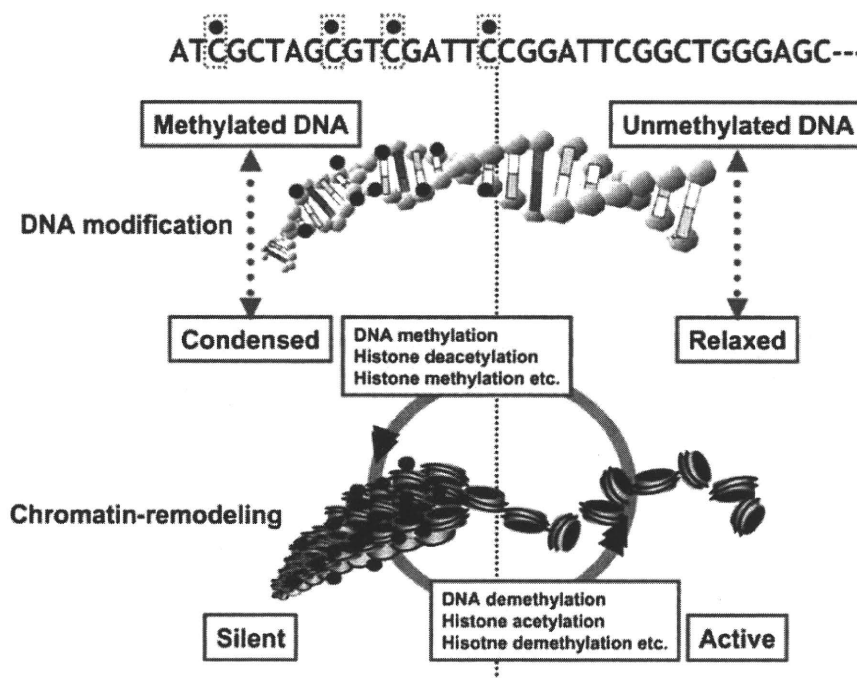
Human and mouse genomes consist of a  $3 \times 10^9$  base pairs per haploid genome, and a large amount of the genome is composed of nongenic repetitive elements, including interspersed repeats and satellites.<sup>22-24</sup> Approximately 60%–90% of CpGs are methylated in the mammalian genome.<sup>9,25,26</sup> Therefore, global demethylation of the maternal or paternal genome immediately after fertilization<sup>21</sup> mainly reflects changes in methylation levels in these nongenic loci. Analysis of genic area DNA methylation reveals that changes occur by de novo methylation and demethylation after fertilization, depending on the loci,<sup>27</sup> and the epigenetic status of gene coding areas shows more dynamic changes than nongenic regions.

**CPG ISLANDS WITH TISSUE-DEPENDENT DIFFERENTIALLY METHYLATED REGIONS**

In mammals, CpGs exist in relatively low numbers compared with estimates based on average base pair composition. CpGs are unevenly distributed throughout the

mammalian genome and form clusters near gene coding regions. These CpG-rich regions are called CpG islands.<sup>28,29</sup> Gardiner-Garden and Frommer<sup>29</sup> originally defined CpG islands as regions >200 base pairs with high GC content and an observed/expected ratio for the occurrence of CpG >0.6. A slight modification of the definition has been proposed to exclude small repetitive sequences.<sup>30</sup> CpG islands usually stretch approximately 1–2 kb and are located most often near promoters and early exons of genes. Therefore, CpG islands have been used as landmarks to find gene coding regions in the genome.<sup>28,29,31</sup> The CpG islands have long been believed unmethylated in normal tissues.<sup>26,32-34</sup> However, it became evident that there are many CpG island-associated genes that are repressed by DNA methylation.

The sphingosine kinase 1 (*Sphk1*) gene, consisting of 6 messenger RNA subtypes (*Sphk1a-f*), is an example of a CpG island-associated gene repressed by DNA methylation.<sup>35</sup> Sphingosine kinase 1 catalyzes production of sphingosine 1-phosphate, an intracellular signal messenger that plays critical roles in signal transduction, cell growth, and differentiation.<sup>36</sup> In the upstream region of the *Sphk1* gene, there is a CpG island with a tissue-dependent differentially methylated region (T-DMR). Methylation status of the T-DMR is highly correlated with expression of *Sphk1a*. When *Sphk1a* is expressed in the adult rat brain, T-DMR is hypomethylated, whereas it is hypermethylated and silenced in other tissues. Several other CpG island-associated genes such as those encoding e-cadherin,<sup>37</sup> endothelin receptor B,<sup>38</sup> and proopiomelanocortin<sup>39</sup> are reported to have T-DMRs with methylation states that are correlated with gene expression. Recent studies indicate that there are numerous CpG island-associated genes with T-DMRs.<sup>40</sup>



**FIGURE 1.** Epigenetic regulation by DNA methylation links to chromatin remodeling. Methylation of CpGs occurs in the regulatory region of genes. Methylation of DNA and chromatin structure are coordinated through various modifications of core histones, including acetylation and methylation. In general, DNA methylation and chromatin condensation are associated with gene silencing.

### CELL AND TISSUE-SPECIFIC GENES WITH T-DMRS

In mammalian embryogenesis, the first differentiation event that determines lineage of the trophectoderm and inner cell mass (ICM) occurs during the blastocyst stage. Embryonic stem (ES) cells established from ICM are pluripotent and can contribute to all ICM lineages.<sup>41,42</sup> Trophoblast stem (TS) cells, established from trophectoderm, have the ability to differentiate into trophoblast lineage *in vitro*.<sup>43</sup>

The *Oct-4* gene, a POU family transcription factor, is expressed in the oocyte and preimplantation embryo, but expression is restricted later to ICM of the blastocyst.<sup>44–46</sup> The *Oct-4* gene has a CG-rich and TATA-less promoter.<sup>46,47</sup> In *Oct-4*-deficient embryos, ICM loses pluripotency and trophoblast cells do not proliferate to develop the placenta.<sup>48</sup> The *Oct-4* gene is expressed in ES cells but not in TS cells.<sup>43</sup> Reduction of *Oct-4* gene expression induces transdifferentiation of ES cells into TS cells under certain culture conditions.<sup>49</sup> Based on these observations, the *Oct-4* gene seems the master gene that determines pluripotency and differentiation of these stem cells. There is a T-DMR in the upstream regulatory region of the *Oct-4* gene that is hypomethylated in ES cells but hypermethylated in TS cells.<sup>50</sup> In addition, the *Oct-4* region is associated with hyperacetylated histones in ES cells in contrast to TS cells,<sup>50</sup> implying that DNA methylation status is correlated with chromatin structure of the *Oct-4* gene.

*Nanog* gene encodes for another transcription factor involved in the multipotency of ES cells.<sup>51</sup> *Nanog* gene has a T-DMR and is regulated by DNA methylation and histone modifications.<sup>52</sup> Expression of master transcription factors such as *Oct-4* and *Nanog*, which govern early development and differentiation, has been used as a marker for stem cells including ES cells and induced pluripotent stem (iPS) cells.<sup>53,54</sup>

In addition to *Oct-4* and *Nanog*, some tissue-specific genes with poor CpGs in promoter regions have T-DMRs. Expression of *rPL-1* is tissue specific and strictly limited to trophoblast giant cells of the placenta.<sup>55</sup> In the *rPL-1* gene promoter, a T-DMR exists that consists of only 17 CpG sites in the 3.4-kb section of the 5'-flanking region. The T-DMR of *rPL-1* is hypomethylated specifically in the placenta, and hypermethylated in other tissues.<sup>56</sup> Thus tissue-specific restricted expression of *rPL-1* is controlled by methylation of CpGs.

The *Sry* gene, which encodes a master protein that initiates testis differentiation in mammals,<sup>57</sup> also has a T-DMR.<sup>58</sup> In mice, expression of *Sry* is restricted to gonadal somatic cells at 10.5–12.5 days postcoitum (dpc). The T-DMR is hypermethylated in 8.5-dpc embryos, when *Sry* gene expression is not observed, and hypomethylated only at 11.5 dpc. Although there are only 8 CpGs in the 2-kb upstream region of the linear form of *Sry*, methylation of this small number of CpGs regulates spatiotemporal expression of the *Sry* gene.

Thus, various types of tissue-specific genes are under epigenetic regulation regardless of CpG content. These genes encode transcription factors, enzymes, and hormones as described above.

### TISSUE/CELL TYPE-SPECIFIC DNA METHYLATION PROFILES

The human genome project uncovered 30,000 genes and approximately 29,000 CpG islands,<sup>22,23</sup> and there are 30,000 genes and 15,000 CpG islands in the mouse genome.<sup>24</sup> It is reported that 50% of CpG islands are linked to tissue-specific genes.<sup>59</sup> How many loci are differentially methylated or unmethylated during development and within different tissues?

Restriction landmark genomic scanning, used for genome-wide DNA methylation analysis, enables us to focus on thousands of T-DMRs and analyze comprehensively methylation status of the entire genome.<sup>60–62</sup> We previously analyzed genomes from 10 different cell types and tissues including ES cells and TS cells. When 1500 loci of 10 cell/tissue types were analyzed, there were 247 T-DMRs, and importantly, the unique methylation status of each tissue and cell type was observed at these 247 T-DMRs.<sup>15</sup> The DNA methylation profiles clearly show that differentiation involves massive alteration of methylation status, with both methylation and demethylation changes occurring at genome-wide multiple loci.

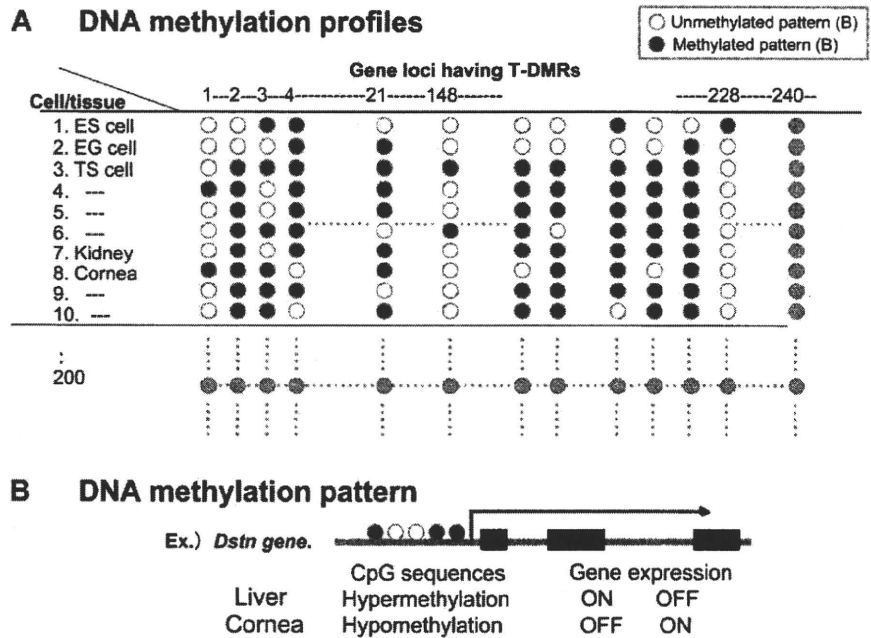
Taken together, these findings indicate that each cell/tissue type has a specific DNA methylation profile at T-DMRs (Fig. 2). The DNA methylation profile is specific to cell and tissue type, much like a fingerprint is distinct, and can be used as an identification tag for cells. The DNA methylation profile also provides a novel method to evaluate similarities of cells because it reflects the similarity in patterns of various lineages during differentiation.<sup>63</sup> Because DNA methylation profile is a unique identification tag for cells, a change in the DNA methylation profile will cause an alteration in cell properties.

### EPIGENOME: GENOME-WIDE EPIGENETICS

Genome-wide epigenetic information is called the epigenome. Recently, we developed D-REAM, a genome-wide DNA methylation analysis method for T-DMR profiling using restriction tag-mediated amplification combined with microarray technology.<sup>40</sup> Previously, genome-wide DNA methylation analyses such as restriction landmark genomic scanning were performed using restriction enzyme *NotI* or *HapII*, whose targets are located mainly at CpG islands. In contrast, D-REAM uses *HpyCH4IV*, a methylation-sensitive restriction enzyme whose recognition sites are distributed throughout the mouse genome in a less biased manner than that of *HapII* and *NotI*. Therefore, D-REAM was developed as a low-bias method. Another advantage is that D-REAM is more flexible than other methods because it enables selective amplification of DNA fragments digested with any restriction enzyme. Our experience indicates that D-REAM is more effective at providing detailed methylation profiles than previously available methods.<sup>40</sup>

We performed D-REAM using a mouse promoter tiling array covering a region from –6 to 2.5 kb (–30,000 transcription start sites) and revealed 3000 T-DMRs that were hypomethylated in liver compared with in cerebrum. The DNA methylation profile of liver was distinct from that of kidney and spleen.<sup>40</sup> Furthermore, tissue-specific expression of genes with T-DMRs was highly correlated with liver





**FIGURE 2.** Cell type-specific and tissue type-specific DNA methylation profiles comprising DNA methylation patterns of T-DMRs. For example, focusing on mouse *Dstn* gene, a DNA methylation pattern in cornea is different from that of liver. A, These patterns constitute cell/tissue-specific DNA methylation profiles. The DNA methylation profile of a cell type is unique and can be a novel tool to define and characterize the cell type. B, Each cell/tissue has a unique pattern of DNA methylation status at each T-DMR.

hypomethylation status, indicating that DNA methylation profile reflects tissue-specific gene expression profile. D-REAM analysis revealed that T-DMRs are located a few kilobases both upstream and downstream of the transcription start sites. Previous studies to locate T-DMRs have focused on the promoter region only. Although preferential tissue-specific expression of non-CpG island genes has been reported previously, D-REAM confirmed that hypomethylation and gene expression are observable in CpG island genes as well, as discussed above.<sup>40</sup>

D-REAM analysis was used to identify T-DMRs, which could provide investigative insight into the roles of genome-wide DNA methylation. T-DMR profiles are tissue specific and facilitate tissue identification by reflecting tissue-specific gene function. The multilayered regulation of tissue-specific gene function could be elucidated by DNA methylation tissue profiling.<sup>40</sup>

**EPIGENETIC BASIS OF HUMAN DISEASES**

Aging is characterized as a time-dependent decline in responsiveness or adaptation to the environment. The loss of phenotypic plasticity could be mediated epigenetically. Loss of the normal balance between gene promoting/silencing factors could occur throughout the genome during the process of aging. Indeed, evidence is accumulating that the epigenome is an important target of internal and external environmental factors such as toxins, growth factors, dietary methyl donors, and so on.<sup>64,65</sup> The human genome encodes approximately 30,000 genes, as mentioned previously,<sup>22,23</sup> that are expressed in specific cells at precise times according to cell type-specific DNA methylation profiles. In addition to primary genetic mutations, epimutations, detectable as aberrant epigenetic

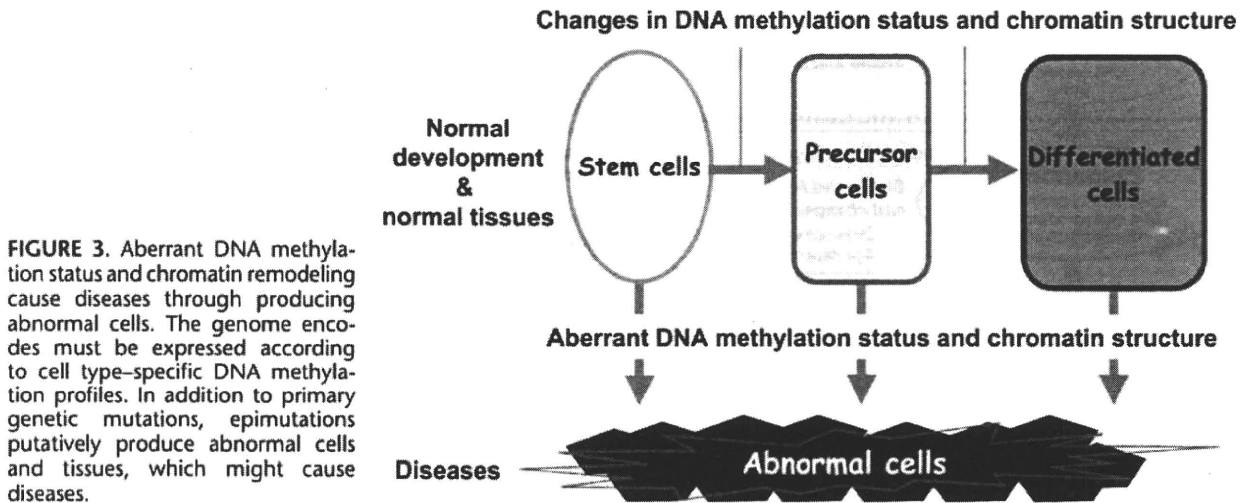
status, should be considered as a process of gene deregulation. Disruptions of DNA methylation profiles, that putatively produce abnormal cells and tissues, might help to explain how particular diseases—especially age-dependent diseases—can occur and why common diseases increase generally in an age-dependent manner. Thus, changes in DNA methylation profiles could impact on human health, and epigenetic mechanisms might gain new perspective in human diseases related to gene deregulation, as shown in Fig. 3.

Recent developments in corneal genetics (Table 1)<sup>66-81</sup> have led to implementation of a new classification scheme that takes into account the responsible gene defect, particularly the tissue growth factor beta inducible (TGFB1) group in the case of corneal dystrophy, rather than simply by clinical appearance.<sup>6,82</sup> It is feasible that a single gene such as *TGFB1* can be silenced by DNA methylation and DNA mutation, resulting in disease.

We are now confronted with even more questions about the role of genetic background and environmental influences in the phenotypic expression of corneal dystrophies. Clinicians will be able to use molecular genetic analysis to confirm or refute presumptive clinical diagnoses in cases of suspected dystrophic corneal disorders. Indeed, we have already found T-DMRs (Fig. 2) in several genes as listed in Table 1.<sup>66-81</sup> Therefore, in future, it is possible that DNA methylation profiles in corneal tissues could become effective clinical diagnostic tools in corneal dystrophies if epigenetic modification occurs on the genes associated with corneal disorders.

**CONCLUSIONS**

Numerous genes, which are tissue/cell type specifically expressed, are regulated by epigenetics. Methylation of DNA,



**FIGURE 3.** Aberrant DNA methylation status and chromatin remodeling cause diseases through producing abnormal cells. The genome encodes must be expressed according to cell type-specific DNA methylation profiles. In addition to primary genetic mutations, epimutations putatively produce abnormal cells and tissues, which might cause diseases.

associated with chromatin configuration changes, is the intermediate regulatory phase of gene expression and occurs between a stable genome and a rapidly changeable transcriptome (Fig. 4). Epigenetics is the study of this “cellular memory of gene expression” that results in maintenance of various cell types. Genome-wide DNA methylation profiles, which consist of information on methylation patterns of numerous loci, store the “cellular memory” that governs tissue/cell type features. Various environmental factors affect DNA methylation profiles, and their abnormalities seem involved in various diseases. Epigenetics is an emerging paradigm that explains various normal and abnormal biological phenomena from novel viewpoints. Tissue/cell type-specific

DNA methylation profiles, vehicles of epigenetic memory, could be useful tools in understanding health and disease. Epigenetics and epigenome analysis will provide distinct approaches for facilitating novel advances in diagnosis and treatment and drug development for various diseases, including corneal disorders.

**ACKNOWLEDGMENTS**

*We gratefully thank Dr. Akihiro Ikeda and Dr. Sakae Ikeda (University of Wisconsin-Madison) for discussion and Dr. Maddy Roberts for proofreading the article.*

**TABLE 1.** Summary of Corneal Disorders With Gene

Gene	Locus	Inheritance	Dystrophy	Layer	Reference
<i>TGFBI</i>	5q31	AD	RBD	Bowman	Kannabiran and Klintworth <sup>66</sup>
			Thiel-Behnkel	Bowman	
			GCD	Stromal	
			Lattice (LCD) type I	Stromal	
<i>Dstn</i>	2(mouse)	AR	Corneal surface disease	Epithelial	Ikeda et al <sup>67</sup> ; Verdoni et al <sup>68</sup>
<i>KRT3</i>	12q13	AD	Meesman	Epithelial	Irvine et al <sup>69</sup> ; Nishida et al <sup>70</sup>
<i>KRT12</i>	17q12	AD	Meesman	Epithelial	Irvine et al <sup>69</sup> ; Nishida et al <sup>70</sup>
<i>Gelsolin</i>	9q34	AD	Lattice (LCD) type II	Stromal	Rodrigues et al <sup>71</sup>
<i>Decorin</i>	12q22	AD	CHSD	Stromal	Bredrup et al <sup>72</sup>
<i>PIP5K3</i>	2q35	AD	Fleck (CFD)	Stromal	Li et al <sup>73</sup>
<i>MIS1</i>	1q32	AR	GDLD	Stromal	Tsujikawa et al <sup>74</sup> ; Tasa et al <sup>75</sup>
<i>CHST6</i>	16q22	AR	MCD	Stromal	Akama et al <sup>76</sup>
<i>CYP4V2</i>	4q35	AR	BCD	Stromal	Li et al <sup>77</sup>
<i>COL8A2</i>	1p23.3-1p32	AD	FECD	Endothelial	Biswas et al <sup>78</sup> ; Gottsch et al <sup>79</sup>
<i>SLC4A11</i>	20p11.2-20q11.2	AR	CHED type II	Endothelial	Vithana et al <sup>80</sup>
<i>TCF8</i>	10p11-10q11	AD	PPCD	Endothelial	Krafchak et al <sup>81</sup>

AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; BCD, Bietti corneal dystrophy; CFD, corneal fleck dystrophy; CHED, congenital hereditary endothelial dystrophy; CHSD, congenital hereditary stromal dystrophy; FECD, Fuchs endothelial corneal dystrophy; GCD, granular corneal dystrophy; GDLD, gelatinous drop-like dystrophy; LCD, lattice corneal dystrophy; MCD, macular corneal dystrophy; PPCD, posterior polymorphous corneal dystrophy; RBD, Reis-Bücklers dystrophy.

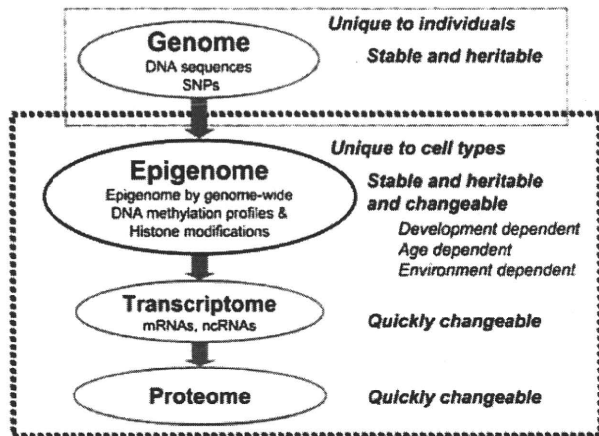


FIGURE 4. Genetic information flow with epigenetics.

## REFERENCES

- Russo U, Martienssen R, Riggs AD. *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Woodbury, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996: 1-4.
- Lieb JD, Beck S, Bulyk ML, et al. Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease. *Cytogenet Genome Res*. 2006;114:1-15.
- Kaplan J. Genomics and medicine: hopes and challenges. *Gene Ther*. 2002;9:658-661.
- Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4:200-213.
- Puddu P, Puddu GM, Cravero E, et al. The genetic basis of essential hypertension. *Acta Cardiol*. 2007;62:281-293.
- Poulaki V, Colby K. Genetics of anterior and stromal corneal dystrophies. *Semin Ophthalmol*. 2008;23:9-17.
- Voisey J, Morris CP. SNP technologies for drug discovery: a current review. *Curr Drug Discov Technol*. 2008;5:230-235.
- Bird AP. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation. II. The symmetry of methylated sites supports semi-conservative copying of the methylation pattern. *J Mol Biol*. 1978;118: 49-60.
- Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H, et al. Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett*. 1981;124:67-71.
- Cubas P, Vincent C, Coen E. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature*. 1999;401:157-161.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007; 128:693-705.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.
- Shiota K. DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet. Genome Res*. 2004;105:325-334.
- Ikegami K, Ohgane J, Tanaka S, et al. Interplay between DNA methylation, histone modification and chromatin remodeling in stem cells and during development. *Int J Dev Biol*. 2009;53:203-214.
- Shiota K, Kogo Y, Ohgane J, et al. Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells*. 2002;7: 961-969.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992;69: 915-926.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99:247-257.
- Okamoto I, Arnaud D, Le Baccon P, et al. Evidence for de novo imprinted X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. *Nature*. 2005;438:369-373.
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, et al. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*. 2001;294:2536-2539.
- Kaneda M, Okano M, Hata K, et al. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*. 2004;429:900-903.
- Morgan HD, Santos F, Green K, et al. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*. 2005;14:R47-R58.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291:1304-1351.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002;420:520-562.
- Razin A, Szyf M. DNA methylation patterns. Formation and function. *Biochim Biophys Acta*. 1984;782:331-342.
- Cross SH, Bird AP. CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev*. 1995;5: 309-314.
- Ko YG, Nishino K, Hattori N, et al. Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *J Biol Chem*. 2005;280:9627-9634.
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1986;321:209-213.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987;196:261-282.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:3740-3745.
- Larsen F, Gundersen G, Lopez R, et al. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*. 1992;13:1095-1107.
- Yen PH, Patel P, Chinault AC, et al. Differential methylation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase genes on active and inactive human X chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:1759-1763.
- Bird A, Taggart M, Frommer M, et al. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*. 1985; 40:91-99.
- De Smet C, Lurquin C, Lethe B, et al. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol*. 1999;19:7327-7335.
- 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*. 2001;76:117-125.
- Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:397-407.
- Bormman DM, Mathew S, Alsrue J, et al. Methylation of the E-cadherin gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly individuals. *Am J Pathol*. 2001;159:831-835.
- Pao MM, Tsutsumi M, Liang G, et al. The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells. *Hum Mol Genet*. 2001;10:903-910.
- Newell-Price J, King P, Clark AJ. The CpG island promoter of the human proopiomelanocortin gene is methylated in nonexpressing normal tissue and tumors and represses expression. *Mol Endocrinol*. 2001;15: 338-348.
- Yagi S, Hirabayashi K, Sato S, et al. DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression. *Genome Res*. 2008;18:1969-1978.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:7634-7638.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:8424-8428.
- Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, et al. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*. 1998;282:2072-2075.
- Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, et al. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell*. 1990;60:461-472.
- Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 1990;345:686-692.
- Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, et al. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*. 1990;344:435-439.

47. Sylvester I, Scholer HR. Regulation of the Oct-4 gene by nuclear receptors. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:901–911.
48. Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 1998;95:379–391.
49. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000;24:372–376.
50. Hattori N, Nishino K, Ko YG, et al. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem.* 2004;279:17063–17069.
51. Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 2003;113:643–655.
52. Hattori N, Imao Y, Nishino K, et al. Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes Cells.* 2007;12:387–396.
53. Do JT, Scholer HR. Cell-cell fusion as a means to establish pluripotency. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2006;60:35–45.
54. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126:663–676.
55. Peters TJ, Chapman BM, Wolfe MW, et al. Placental lactogen-I gene activation in differentiating trophoblast cells: extrinsic and intrinsic regulation involving mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Endocrinol.* 2000;165:443–456.
56. Cho JH, Kimura H, Minami T, et al. DNA methylation regulates placental lactogen I gene expression. *Endocrinology.* 2001;142:3389–3396.
57. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature.* 1991;351:117–121.
58. Nishino K, Hattori N, Tanaka S, et al. DNA methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonadal development. *J Biol Chem.* 2004;279:22306–22313.
59. Suzuki Y, Tsunoda T, Sese J, et al. Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res.* 2001;11:677–684.
60. Ohgane J, Aikawa J, Ogura A, et al. Analysis of CpG islands of trophoblast giant cells by restriction landmark genomic scanning. *Dev Genet.* 1998;22:132–140.
61. Shiota K, Yanagimachi R. Epigenetics by DNA methylation for development of normal and cloned animals. *Differentiation.* 2002;69:162–166.
62. Kremenskoy M, Kremenska Y, Ohgane J, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation status of CpG islands in embryoid bodies, teratomas, and fetuses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311:884–890.
63. Sakamoto H, Kogo Y, Ohgane J, et al. Sequential changes in genome-wide DNA methylation status during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;366:360–366.
64. Bjornsson HT, Fallin MD, Feinberg AP. An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends Genet.* 2004;20:350–358.
65. Iwatani M, Ikegami K, Kremenska Y, et al. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells.* 2006;24:2549–2556.
66. Kannabiran C, Klintworth GK. TGFBI gene mutations in corneal dystrophies. *Hum Mutat.* 2006;27:615–625.
67. Ikeda S, Cunningham LA, Boggess D, et al. Aberrant actin cytoskeleton leads to accelerated proliferation of corneal epithelial cells in mice deficient for destrin (actin depolymerizing factor). *Hum Mol Genet.* 2003;12:1029–1037.
68. Verdoni AM, Aoyama N, Ikeda A, et al. Effect of destrin mutations on the gene expression profile in vivo. *Physiol Genomics.* 2008;34:9–21.
69. Irvine AD, Corden LD, Swensson O, et al. Mutations in cornea-specific keratin K3 or K12 genes cause Meesmann's corneal dystrophy. *Nat Genet.* 1997;16:184–187.
70. Nishida K, Honma Y, Dota A, et al. Isolation and chromosomal localization of a cornea-specific human keratin 12 gene and detection of four mutations in Meesmann corneal epithelial dystrophy. *Am J Hum Genet.* 1997;61:1268–1275.
71. Rodrigues MM, Rajagopalan S, Jones K, et al. Gelsolin immunoreactivity in corneal amyloid, wound healing, and macular and granular dystrophies. *Am J Ophthalmol.* 1993;115:644–652.
72. Bredrup C, Knappskog PM, Majewski J, et al. Congenital stromal dystrophy of the cornea caused by a mutation in the decorin gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:420–426.
73. Li S, Tiab L, Jiao X, et al. Mutations in PIP5K3 are associated with Francois-Neetens mouchettee fleck corneal dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2005;77:54–63.
74. Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka T, et al. Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nat Genet.* 1999;21:420–423.
75. Tasa G, Kals J, Muru K, et al. A novel mutation in the MIS1 gene responsible for gelatinous droplike corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:2762–2764.
76. Akama TO, Nishida K, Nakayama J, et al. Macular corneal dystrophy type I and type II are caused by distinct mutations in a new sulphotransferase gene. *Nat Genet.* 2000;26:237–241.
77. Li A, Jiao X, Munier FL, et al. Bietti crystalline corneoretinal dystrophy is caused by mutations in the novel gene CYP4V2. *Am J Hum Genet.* 2004;74:817–826.
78. Biswas S, Munier FL, Yardley J, et al. Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2415–2423.
79. Gottsch JD, Zhang C, Sundin OH, et al. Fuchs corneal dystrophy: aberrant collagen distribution in an L450W mutant of the COL8A2 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:4504–4511.
80. Vithana EN, Morgan P, Sundaresan P, et al. Mutations in sodium-borate cotransporter SLC4A11 cause recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). *Nat Genet.* 2006;38:755–757.
81. Krafchak CM, Pawar H, Moroi SE, et al. Mutations in TCF8 cause posterior polymorphous corneal dystrophy and ectopic expression of COLAA3 by corneal endothelial cells. *Am J Hum Genet.* 2005;77:694–708.
82. Vincent AL, Patel DV, McGhee CN. Inherited corneal disease: the evolving molecular, genetic and imaging revolution. *Clin Exp Ophthalmol.* 2005;33:303–316.