

図1 DNAメチル化によるインプリント遺伝子の発現調節
 インプリント遺伝子の発現は、アレル特異的メチル化領域 (DMR) のメチル化、メチル化酵素により制御されている。

1. ゲノムインプリンティングの獲得に関する分子機構

1.1 ゲノムインプリンティング機構のリプログラミング

哺乳類では、特定の一方の親から継承した遺伝子が選択的に機能し、他方の遺伝子は機能しないユニークな遺伝子発現様式を示す、ゲノムインプリンティング (genomic imprinting; 遺伝子刷り込み) 機構が存在する¹⁾²⁾。ゲノムインプリンティングを受ける遺伝子は、定められた一方の親 (父あるいは母) から継承した遺伝子のみが選択的に機能し、他方の遺伝子は機能しないというアレル特異的発現がみられる (図1)。

このゲノムインプリンティング機構は、哺乳類の正常な発生、あるいは生体の恒常性の維持に必要である。例えば、雄核発生胚 (父由来アレルで構成される) は、胚体外組織の発達は良好であるが、胎仔の発育は不良となる。逆に、雌核発生胚 (母由来アレルで構成される) は、胚体外組織の発育も不良で、いずれも胎生中期に致死となる (前核移植実験)。これらの事実から、父由来アレルと、母由来アレルの機能が異

なること、および両親由来のアレルが正常の個体発生に必須であると解釈されている。また、ゲノムインプリンティング機構は、一部植物にみられるものの、胎盤を保有する哺乳類に特有な現象である。動物の哺乳類への進化は、インプリンティングの進化と関連するのかもしれない。インプリント遺伝子は、現在までに100以上報告されている。ヒトインプリント遺伝子に関する報告は多数なされている。例えば、英国 Mammalian Genetics Unit (MRC) の WWW サイト (<http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/research/imprinting/imprin-viewdatagenes.html>) や オタゴ大学 (ニュージーランド) の WWW サイト (<http://igc.otago.ac.nz/Search.html>) などを含む様々な学術用ウェブサイトにヒトを含む多様な生物由来のインプリント遺伝子のリストが掲載されている。

このインプリント遺伝子は生殖細胞形成過程において、何らかの機構で親の性別が認識され、そして子どもに伝達される。この遺伝情報は世代ごとに新しくプログラミングされ、かつエピジェネティックな修飾であるといわれる。生殖細胞での親の由来を認識するための目印

(記憶)としてDNAメチル化が有力視されている。ほとんどのインプリント遺伝子にはアレル間でメチル化状態の異なる領域(differentially methylated region; DMR)が存在する。DNAメチル化(CpGのシトシンのメチル化)は化学的に安定であるとともに可塑性でもある。また細胞分裂を経て伝達されるエピジェネティックな修飾であるため、ゲノムインプリンティング機構の重要な役割を担うと考えられている。一方、生殖細胞系列では始原生殖細胞が将来の生殖巣になる生殖隆起内へ移動した後(胎生11.5~12.5日)に、ゲノム全体の脱メチル化とともに両親に由来するインプリンティングの消去が起こる³⁾⁴⁾。さらに各々の配偶子形成過程で父・母由来の各インプリンティングは性特異的な規律に従い再確立する。

② 配偶子形成過程におけるインプリンティングの確立

前述のごとくDNAメチル化は細胞の記憶として働くが、一方で可塑性もある。外的、内的環境の影響が少ないマウス胎仔および新生児の生殖細胞を用い、インプリンティングの確立時期の解析が行われた。卵子型インプリンティング(母由来の遺伝子にメチル化が起こる)の解析では、Obataらは様々な発育段階にある未成熟卵と成熟卵を用いた単為発生胚を作成し、インプリント遺伝子の発現が消失する胎仔の存在により、インプリンティングの確立時期を推測した⁵⁾。またLuciferoらは実際に各発育過程の卵細胞を抽出し、さらに細胞の大きさに細分類し、DNAメチル化について解析した⁶⁾。この二つの実験結果は驚くほど類似しており、遺伝子ごとにメチル化獲得の時期が異なっていた。また、インプリント遺伝子ごとにメチル化開始時期と獲得終了の時期に多少の幅もみられた(図2, 右)。また、興味深い点は成熟卵になって初めてインプリンティングを獲得する遺伝子(Impact)があることである⁵⁾。妊娠可能な成体の雌の未成熟卵はすでに一定の割合でDMRのメチル化を獲得している⁷⁾。

一方、精子型インプリンティング(父由来の

遺伝子にメチル化が起こる)では、現時点で四つのインプリント遺伝子(H19, Dlk1-Gtl2, Rasgrfl, Zdbf2)が同定されている。雄の生殖細胞系列の詳細な解析により、三つの遺伝子のDMRは、有糸分裂期にある前精原細胞(胎生14.5日目から出生時)で新規メチル化が確立することが示された(図2, 左)^{8)~11)}。確立したメチル化インプリンティングは精原幹細胞、精原細胞の有糸分裂、精子形成の減数分裂を通して持続する。これら結果は、卵子型インプリンティングのメチル化が確立される時期よりも早く、この事実はDNA配列などの構造に依存するものであるか、transに作用する分子に依存するかなどは不明である。

また、DNAメチル化反応は、S-アデノシル-L-メチオニン(SAM)から、細胞内のDNAメチル基転移酵素(DNMT)の活性により引き起こされる。Dnmt1は、DNA複製時にゲノム各領域のメチル化状態を維持するために働く(維持型メチル化酵素)¹²⁾。一方、DNMT3のメンバーであるDnmt3aとDnmt3bはメチル化していないDNAを新たにメチル化させる働きを持つ(新規型メチル化酵素)。これらのメチル化酵素は、インプリンティングの獲得、維持に重要な働きを示す^{13)~19)}。

2. ARTとゲノムインプリンティング異常

反芻動物では、以前から体外授精による異常は、指摘されていた。ヒツジなどの動物の体外授精によって出生した胎仔では、過成長、呼吸障害、哺乳不足、突然死などが認められ、large offspring syndrome (LOS)が知られていた。この原因としてインプリント遺伝子IGF2Rのメチル化の異常と発現の消失、同時にIGF2の相対的増加に起因することが報告された。実験的には、培養液の種類や培養条件、胚操作そのものが影響し、インプリント遺伝子のDNAメチル化の状態が変化することも、数多くの報告がある。

ヒトにおいては、これまでにART出生児において、インプリンティング異常症の発症頻度

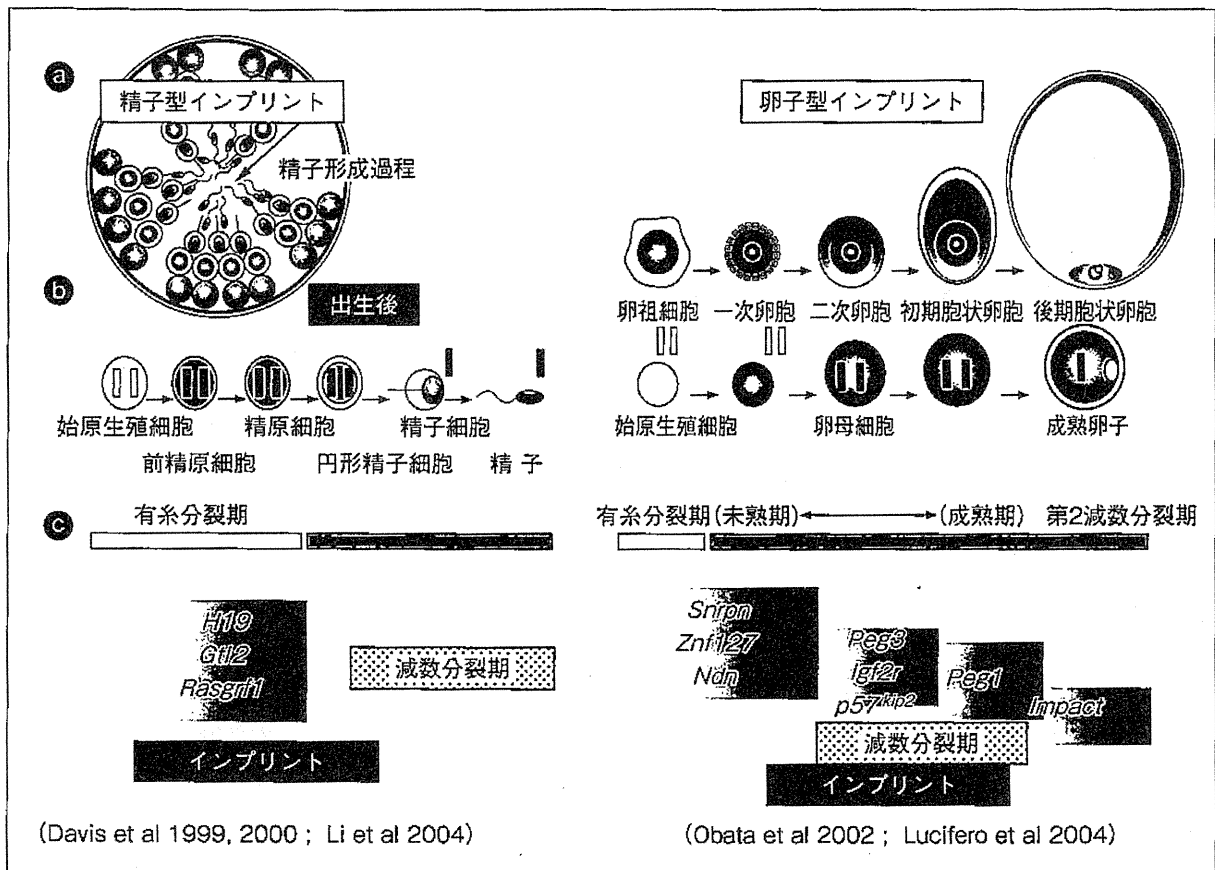


図2 配偶子（生殖細胞）成長過程における DNA メチル化の獲得
 メチル化の獲得は、生殖細胞成長過程で起こる。精子型メチル化インプリンティングは、すべて減数分裂期以前に完了する。卵子型メチル化インプリンティングは、少し遅れ、減数分裂期に段階的にメチル化を獲得される。

が高いことが、数多く報告されている（表 1）。特に、Beckwith-wiedemann 症候群や Angelmann 症候群の報告が多くみられる。

1 Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS)

BWS は、過成長、巨舌、臍帯ヘルニアを 3 主徴とする症候群であり、その他に新生児期の低血糖、耳垂の線状溝などの症状を呈し、約 10% の患児に Wilms 腫瘍、肝芽腫、横紋筋肉腫などの胎児性腫瘍が発生する。この疾患では新生児期に最も徴候が顕著で、成長とともに症状が軽快する。BWS のほとんどは孤発例で、家族例は 15% 程度で常染色体優性遺伝形式をとり、その場合、母由来の異常が子に受け継がれたときのみ発症する。その責任遺伝子座は 11p15.5 領域で、IGF2 など成長関連遺伝子の過剰発現が原因と考えられている。BWS でも他のインプリ

ンティング異常による症例が 3~5 割に達する。

ART によって生まれた子において、この疾患の頻度が高くなるという報告がある。この報告では、米国での通常妊娠における BWS 発生頻度は 0.8% であるが、ART の場合はその約 6 倍、4.6% と有意に高く、ART で生まれた BWS 患者では、7 例中 5 例に母由来 KvDMR1 のメチル化喪失、母由来 H19-DMR の高メチル化などの異常があり、ART に関連する手技が imprinting control region (ICR) のメチル化に影響を及ぼすことが推測されている。

2 Angelmann 症候群 (AS)

AS は、精神発達遅滞、てんかん、失調歩行、容易に引き起こされる笑いなどを主徴とする疾患である。責任遺伝子座は 15 番染色体 15q11-q13 の領域で、SNRPN や UBE3A といった遺伝

表1 ART 治療後のインプリンティング異常の報告例

■ BWS 発症率 米国一般集団 0.76% ; 体外受精 4.1% (DeBaun 2003)

■ オーストラリア約 10 倍の頻度 (Halliday 2004)

疾患	総数	症例数	解析結果	ART 手技	報告者
Beckwith-Wiedemann syndrome	不明	6	・ LIT1 の低メチル化 (n=5)	IVF & ICSI	DeBaun ら (2003)
	65	2	・ H19 のメチル化 (n=1)	IVF & ICSI	Maher ら (2003)
	149	6	・ LIT1 の低メチル化 (n=2)	IVF & ICSI	Gicquel ら (2003)
Angelman syndrome	不明	2	・ SNRPN の低メチル化 (n=2)	ICSI	Cox ら (2002)
	149	1	・ SNRPN の低メチル化 (n=1)	ICSI	Orstavik ら (2003)
Silver-Russell syndrome	60	2	・ H19 の低メチル化 ・ PEG3 の高メチル化	IVF & ICSI	Kagami ら (2007)

子が含まれる。2002 年, Cox らは ICSI で生まれた AS2 例を, また Orstavik らはやはり ICSI で生まれた 1 例を報告し, いずれも SNRPN 遺伝子の ICR が低メチル化となっており, インプリンティング異常であることを確認している。

3 網膜芽細胞腫やその他の小児癌

網膜芽細胞腫では 13 番染色体 q24 にある RB1 遺伝子の変異が認められるが, この片側性症例のなかにはインプリンティング異常による症例も認められる。Moll らは, 体外受精で生まれた網膜芽細胞腫の 5 例を報告し, ART でリスクが高くなる可能性を指摘しているが, これを否定するデータもある。

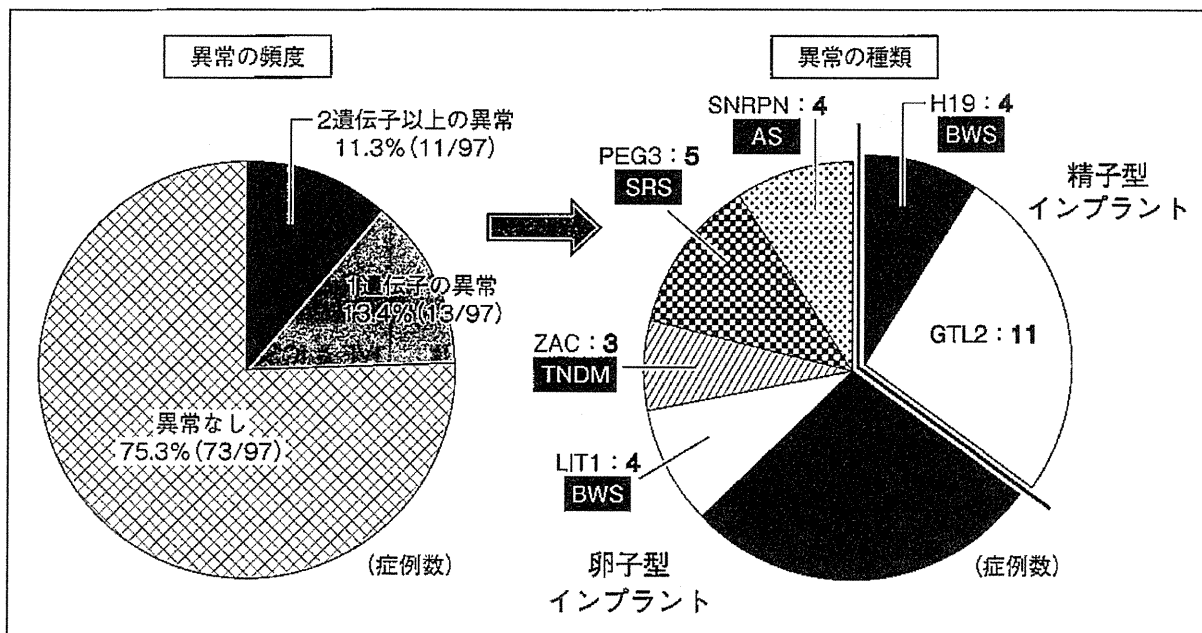
4 成人病との関係

Silver-Russell 症候群 (SRS) の報告もみられる。成人では, がんや高血圧や糖尿病の発症に DNA メチル化異常が関与する報告が多数みられる。これら生活習慣病を含めた ART 児の成人期・老年期に至る長期 follow up は早晚必要になることが予想される。

3. 不妊症患者精子とインプリンティング異常

ART 治療を受ける患者が一般の人口統計と異なる特殊な集団であるため, 単純に ART 治

療がそのような危険を引き起こすのか, 正確に評価することは難しい。ART 治療を受ける患者は, 一般に低い妊娠率で, 生殖能力も弱く, また, 比較的高齢で, 胎児, 新生児異常と関連することも考えられる。われわれは, 男性不妊症患者 97 名の精子の DNA メチル化について解析した。79 名は正常精子数 ($>20 \times 10^6/\text{ml}$), 残りの 18 名の患者は, 乏精子症 (10 名は, 重度な乏精子症) について, 七つのヒトインプリント遺伝子 [H19, GTL2, PEG1 (MEST), LIT1 (KCNQ1OT1), ZAC (PLAGL1), PEG3 と SNRPN] の DMRs の DNA メチル化パターンを解析した²⁰⁾。精子型インプリント遺伝子, H19 と GTL2 では解析した精子症例の大多数はメチル化されていた。しかし, H19 では, 乏精子症 4 例 (中等度 1 例; 重症 3 例) で, GTL2 では乏精子症 6 例 (中等度 2 例; 重症 4 例) がメチル化されていなかった。メチル化されないパターンを示した 5 例は, 精液検査で正常な症例であった。また, 卵子型インプリント遺伝子 PEG1, LIT1, ZAC, PEG3, および SNRPN では, ほとんどすべての症例の精子は, 非メチル化パターンを示したが, いくつかの症例では, メチル化されたバンドパターン (PEG1 12 症



【図3】 不妊症精子におけるインプリント遺伝子のメチル化異常

97例の不妊症患者精子の七つのインプリント遺伝子における精子の結果。およそ25%にメチル化の異常を示す。そのうち半数は、1領域だけの異常で、残り半数は、複数の領域での異常を示した。領域別では、H19、LIT1といったBWS、ASをもたらず異常に頻度は少なく、胎盤形成に働くGTL2や胎児発育、行動に影響を与えるPEG1の異常が多くみられる傾向にあった。

(文献20より)

例、LIT1 4症例、ZAC 3症例、PEG3 5症例、SNRPN 4症例)を示した。異常なメチル化パターンを示す24症例中12症例は、一つのインプリンティング領域の異常で、10症例は、精子型インプリンティングと卵子型インプリンティングの両方の異常がみられた。また、6例の重症な乏精子症のうち、5例は、精子型、卵子型インプリンティングの両方で異常なメチル化パターンを示した。正常な精子所見を示す症例でも、ごく少数で、両方のメチル化の異常がみられた²¹⁾(図3, 4)。

4. 卵子のインプリンティング異常

ARTと関連すると報告されているインプリンティング異常症(ASやBWS)のメチル化の異常は、正常では母(卵子)由来のアレルでメチル化を受ける領域の異常(消失あるいは低下)である。父(精子)由来のアレルでメチル化を受ける領域の異常であるPWSは、その頻度は高くない。これには、卵細胞でのメチル化の異

常が原因と考えられるが、インプリンティング領域(DMR)のメチル化は、卵子由来のメチル化が圧倒的に多いことが原因の一つかもしれない。また、SRSの原因として父(精子)由来のアレルでメチル化を受ける領域H19のDMRの異常も報告されている。インプリンティング異常の受けやすさを決めるのは、親由来ではなく、領域特異性であるのかもしれない。

メチル化インプリンティングは、精子の場合は減数分裂の前に、卵子の場合は減数分裂の間に起こる。ヒトでもマウスでも過剰排卵誘発のメチル化インプリンティング異常は報告されている(H19やPEG1)。また、別の研究では、低量の排卵誘発刺激がインプリンティング異常を起こすという報告もある。また、排卵誘発により、卵管や子宮の環境が変化し、初期胚発達の遅延、受精卵子数の減少、卵子細胞の減少と胎児の質、胎児の発育遅延などをインプリンティング異常がもたらすことも報告されている。繰り返す排卵誘発は、卵子のゲノム全体のメチル

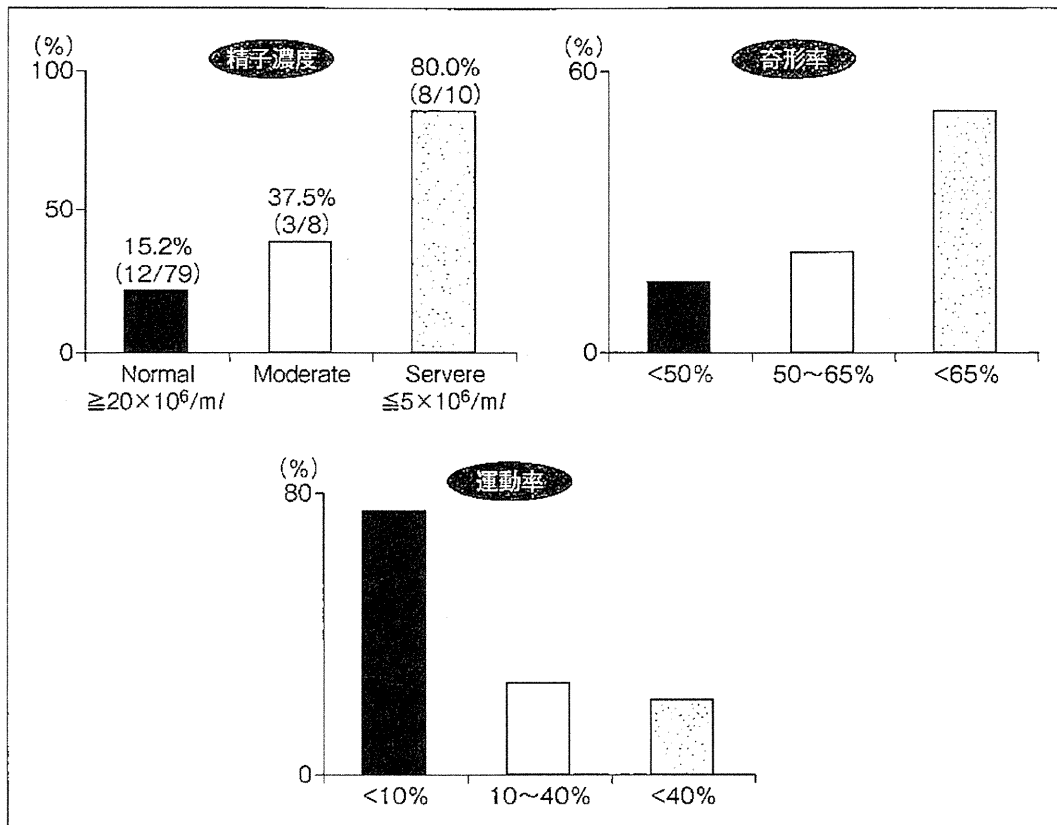


図4 インプリンティングメチル化の異常と精子所見との関係
 精子濃度では、精子濃度に反比例して、異常の頻度が高くなり、重度の乏精子症では80%と高率に異常を認めた。同様に、運動率、奇形率との相関もみられた。精子の形態学的な異常は、インプリント遺伝子のメチル化の獲得、維持と何らかの相関があることが示唆された。

(文献 20 より)

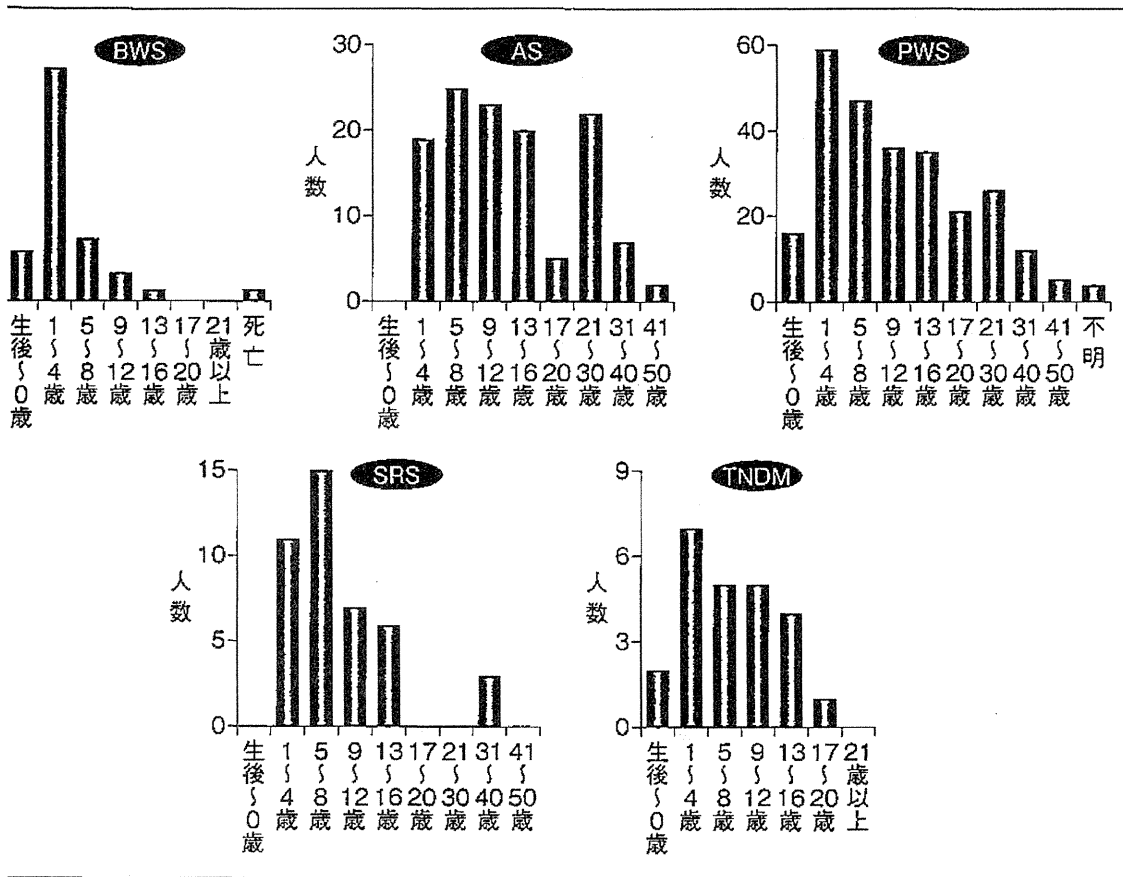
化の異常（質的低下）をもたらし、流産となるのかもしれないという仮説もある。

5. ARTとゲノムインプリンティング異常に関する全国調査

海外の報告では、ARTとゲノムインプリンティング異常の関連が報告されている。しかし、国内での実態は明らかではない。われわれは、先天性ゲノムインプリンティング異常症5疾患：Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）、Angelman 症候群（AS）、Prader-Willi 症候群（PWS）、Silver-Russell 症候群（SRS）、新生児一過性糖尿病（TNDM）の頻度について、またARTとの関連について全国多施設共同研究を行った（厚生省難治性疾患克服事業）。まず、療育センターや重症心身障害者施設含む多施設の

産科・小児科医の協力下に、全国規模の疫学調査を行い、インプリンティング病の発生頻度、病態、治療実態の把握を行う。さらに、試料の収集と遺伝子診断を行い、発症機序と影響を受ける遺伝子の解析を行った。次に、ART治療法やメチル化異常との関連について実態を把握し、リスク要因について評価することを目的とした。

その結果、調査対象科3,158科のうち、1,602科から有効回答があり（有効回答率56.3%）、報告患者総数は1,818人であった。その内訳は、BWSが216人、ASが415人、PWSが992人、SRSが161人、TNDMが34人であった。第1次調査報告患者1,818例のうち27.7%にあたる504例の第2次調査を行った。図5に各疾患別の年齢推移を示した。AS以外の4疾患で、近



先天性インプリンティング異常症の年齢推移

にも増加傾向を示す。特に BWS, SRS は急増している。性差, 地域性がなくほとんど孤発例で、1例のみ (AS)。

Beckwith-Wiedemann 症候群, AS : Angelmann 症候群。

傾向にあることが示唆されている。特に SRS は最近 5~10 年間に急増していることがわかった。

に不妊治療を受けたかどうか、また受胎はその内容について示す。不妊治療を視は 0~9.5% で、一般に不妊治療を受け割合が 10~15% なので、多いとはいえないが、PWS, BWS, AS, SRS の疾患の 1.5%, 8.6%, 1.6%, 9.5% が不妊治療を受けていた。またほとんどの症例は体外受精あるいは顕微授精 (ICSI) によるもので、平成 17 (2005) 年度の IVF+ICSI の年間 10,338 人で前出生児の 0.86% とならずの 4 疾患も発症率は高く、特に SRS 2 倍、BWS では 10 倍と圧倒的な高リスクを示した。表 2b に小児癌との関連を示す。

BWS は 8 例 (11.4%) に小児癌が認められ、PWS, SRS にも 1 例認められた。

おわりに

ART 出生児にインプリンティング異常の発生頻度が増加するその原因は、まったく不明である。現在、患者の頬粘膜細胞 DNA を用い、原因遺伝子のメチル化の解析を行っている。現在までに、75 名の解析を行い、そのうち異常を認めた症例は、BWS が 1 人、AS が 5 人、PWS が 8 人、SRS が 4 人で、ART は、SRS の 2 例と関連していた。症例数が圧倒的に少ないため、結論を出すまでに至っていない。今後さらに解析を進め、メチル化異常の頻度、程度との関連性について疾患別に交絡要因を考慮し、正確に評価する必要がある。晩婚化、少子化によ

表2 インプリンティング異常症と不妊治療および小児癌との関連

a

BWS	年齢	性別	治療歴
case 1	4	女性	夫リンパ球免疫治療法
case 2	4	男性	体外受精 (IVF-ET) 人工授精 (AIH), 排卵誘発
case 3	4	男性	体外受精 (IVF-ET)
case 4	3	女性	体外受精 (IVF-ET)
case 5	2	男性	体外受精 (IVF-ET)
case 6	2	女性	顕微授精 (ICSI)

ARTによる出生率: 8.6% (6/70)

AS	年齢	性別	治療歴
case 1	11	女性	排卵誘発のみ
case 2	2	女性	人工授精 (AIH)

ARTによる出生率: 1.6% (2/123)

PWS	年齢	性別	治療歴
case 1	15	女性	人工授精 (AIH) *凍結精子
case 2	6	女性	顕微授精 (ICSI)
case 3	3	女性	顕微授精 (ICSI)
case 4	1	男性	顕微授精 (ICSI)

ARTによる出生率: 1.5% (4/261)

SRS	年齢	性別	治療歴
case 1	4	女性	体外受精 (IVF-ET)
case 2	2	男性	体外受精 (IVF-ET)
case 3	8	男性	顕微授精 (ICSI)
case 4	5	男性	体外受精 (IVF-ET) *凍結卵

ARTによる出生率: 9.5% (4/42)

(ゲノムインプリンティング異常症 5 疾患の実態把握に関する全国多施設共同研究より)

b

BWS	年齢	性別	癌腫
case 1	5	男性	肝芽腫
case 2	8	女性	右 Wilms 腫瘍, 2歳で化学療法と手術を施行
case 3	死亡	男性	急性骨髄性白血病 (M7)
case 4	3	男性	腎腫瘍
case 5	3	男性	腎腫瘍
case 6	2	女性	詳細不明
case 7	13	女性	肝芽腫 (stage IV, s3~s4 領域, 5.7×6.0 cm) AFP 37 万
case 8	3	女性	肝芽腫, 肝移植

発症率: 8/70=11.4%

PWS	年齢	性別	癌腫
case 1	13	女性	前胸部腫瘍

発症率: 1/261=0.4%

SRS	年齢	性別	癌腫
case 1	8	男性	悪性腹部腫瘍

発症率: 1/42=2.4%

り今後も ART 出生児が増加すると予想される。ART と先天性ゲノムインプリンティング病との関連性については、早急に実態を把握し、適切な対応をとる必要性があり、次世代社会の最重要な課題であると考えられる。

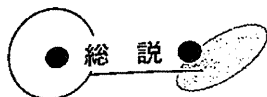
文 献

- 1) Surani MA et al : Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. Nature 308 : 548-550, 1984
- 2) McGrath J et al : Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal

and paternal genomes. Cell 37 : 179-183, 1984

- 3) Hajkova P et al : Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. Mech Dev 117 : 15-23, 2002
- 4) Lee J et al : Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. Development 129 : 1807-1817, 2002
- 5) Obata Y et al : Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. J Biol Chem 277 : 5285-5289, 2002
- 6) Lucifero D et al : Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. Hum Mol Genet 13 : 839-849, 2004

- Sato A et al : Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 22 : 26-35, 2006
- Davis TL et al : Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics* 58 : 18-28, 1999
- Ueda T et al : The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes Cells* 5 : 649-659, 2000
- Li JY et al : Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* 84 : 952-960, 2004
- Hiura H et al : A tripartite paternally methylated region within the Gpr1-Zdbf2 imprinted domain on mouse chromosome 1 identified by meDIP-on-chip. *Nucleic Acids Research* 38 : 4929-4945, 2010
- Bestor TH et al : CpG islands in mammalian gene promoters are inherently resistant to de novo methylation. *Genet Anal Tech Appl* 9 : 48-53, 1992
- Li E et al : Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69 : 915-926, 1992
- Li E et al : Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366 : 362-365, 1993
- 15) Howell CY et al : Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 104 : 829-838, 2001
- 16) Okano M et al : DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99 : 247-257, 1999
- 17) Kaneda M et al : Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429 : 900-903, 2004
- 18) Hata K et al : Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 129 : 1983-1993, 2002
- 19) Bourc'his D et al : Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294 : 2536-2539, 2001
- 20) Kobayashi H et al : Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human Mol Genet* 16 : 2542-2551, 2007
- 21) Sato A et al : Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation PCR-Luminex analysis. *Fertility and Sterility* 95 : 129-134, 2010



ゲノムインプリンティングと発がん

有馬 隆博 樋浦 仁 岡江 寛明 宮内 尚子 佐藤 美美*

[*Jpn J Cancer Chemother* 38(11):1745-1749, November, 2011]

Genomic Imprinting and Carcinogenesis: Takahiro Arima, Hitoshi Hiura, Hiroaki Okae, Naoko Miyauchi and Fumi Satou
(Dept. of Informative Genetics, Tohoku University Graduate School of Medicine)

Summary

Genomic imprinting is an epigenetic marking and a stable transmission of monoallelic gene expression patterns in a parent-of-origin-specific manner. Aberrant imprinting has been linked to a number of human genetic disorders, including congenital abnormalities, childhood cancer, behavior disorders, and cancer in adults. Imprinted genes play roles in carcinogenesis. Recently, progress in researched on epigenetic mechanisms of imprinted genes, in addition to analysis of the pathology of the oncogenetic mechanisms, has begun to be clinically applied to diagnostic methods, prevention, and cancer drug development. **Key words:** Genomic imprinting, Epigenetics, DNA methyltransferase, Histone modifier, **Corresponding author:** Takahiro Arima, Department of Informative Genetics, Environment and Genome Research Center, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai, 980-8575, Japan

要旨 ゲノムインプリンティング（遺伝子刷り込み）とは、母親と父親ゲノムに親由来が記憶される現象である。インプリントまたこの分子機構の破綻は、先天性疾患や小児期のがん発生および多種類のがんに関与する。インプリント遺伝子発現の調節にはエピジェネティックな分子機構が働く。近年のエピジェネティクス研究の進展は、がん化機構の病態解明に加え、がんの診断法の開発、予防法（リスク診断）、新薬開発、予後や治療効果の判定などに臨床応用されはじめている。

はじめに

『エピジェネティクス』とは、DNAの配列に変化を起さず、かつ細胞分裂を経て伝達される遺伝子機能の変化やその仕組みで、ゲノムの遺伝情報を正しく発現し、細胞の状態を正確に記憶する生命システムである。具体的には、DNAメチル化、ヒストン修飾、クロマチン構造などを介する遺伝子発現制御が主体であり、発生・分化・リプログラミングに関与する。その代表例として、ゲノムインプリンティング（遺伝子刷り込み）やX染色体の不活化があげられる。マウスをはじめヒト疾患の解析により、配偶子形成過程（卵子、精子の形成）や初期発生胚が極めて重要であることが判明してきた。ヒトにおけるインプリンティングを説明する代表的疾患として、雄核発生（androgenesis）を原因とする全胎状奇胎（complete mole）、単為発生（parthenogenesis）を原因とする

卵巣奇形腫（ovarian teratoma）の存在が知られている。前者は、胎児成分を欠き、胎盤絨毛の過形成（水腫様変性）、後者は胎児成分により構成され、胎盤成分は存在しない。正常なインプリンティングを保持しない両疾患は、それぞれ絨毛癌、卵巣癌へと進展する。

I. ゲノムインプリンティングの分子機構

ゲノムインプリンティング機構は、哺乳類特異的な現象で、特定の一方の親から継承した遺伝子が選択的に機能し、他方の遺伝子は機能しないユニークな遺伝子発現様式を示す^{1,2)}。つまり、インプリンティングを受ける遺伝子は、定められた一方の親（父あるいは母）から継承した遺伝子のみが選択的に機能し、他方の遺伝子は機能しないというアレル特異的発現がみられる（図1）。このインプリント遺伝子は生殖細胞形成過程において、何らかの機構で親の性別が認識され、そして子供に伝達され

* 東北大学大学院医学系研究科・情報遺伝学分野

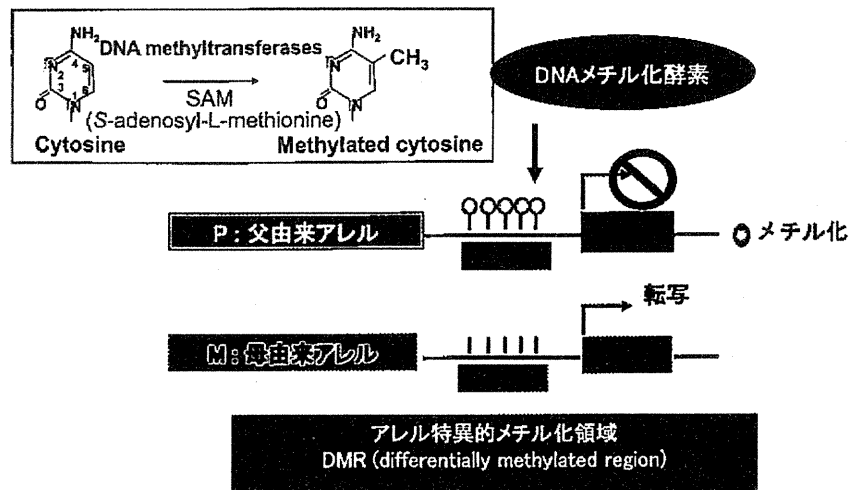


図1 DNAメチル化によるインプリント遺伝子の発現調節
インプリント遺伝子の発現はアレル特異的メチル化領域(DMR)のメチル化、メチル化酵素により制御されている。

る。この遺伝情報は世代ごとに新しくプログラミングされ、かつエピジェネティックな修飾であるといわれる。生殖細胞での親の由来を認識するための目印(記憶)としてDNAメチル化が主要な役割を果たす。ほとんどのインプリント遺伝子にはアレル間でメチル化状態の異なる領域(differentially methylated region: DMR)が存在する。DNAメチル化(CpGのシトシンのメチル化)は化学的に安定であるとともに可塑性でもある。また細胞分裂を経て伝達されるエピジェネティックな修飾は、生涯安定に維持される。また、組織間や年齢で影響を受けない特徴を有する。現在までに100以上のインプリント遺伝子が同定され、その機能として個体発生や胎盤形成、代謝、保育行動など多岐にわたることが明らかにされた³⁾。がん化に関連する遺伝子も数多く含まれる。また、複数のインプリント遺伝子は、特定の染色体領域に存在し、インプリンティングドメインを形成している。このドメイン内の遺伝子発現は、インプリンティング調節領域(imprinting control region: ICR)によりシスに調節されている。この領域のメチル化異常(epimutation)は、Beckwith-Wiedemann症候群(BWS)やAngelman症候群(AS)の発症に関与することは知られている。

また、DNAメチル化反応は、S-adenosyl-L-methionine (SAM) から、細胞内のDNAメチル基転移酵素(DNMT)の活性により引き起こされる。Dnmt1は、DNA複製時にゲノム各領域のメチル化状態を維持するために働く(維持型メチル化酵素)。一方、DNMT3のメンバーであるDnmt3aとDnmt3bはメチル化していないDNAを新たにメチル化させる働きをもつ(新規型メチル化酵素)。これらのメチル化酵素は、インプリンティングの獲得、維持に重要な働きを示す^{4,9)}。また、Dnmt2は癌組織で強発現を示すことも報告されている。

がん化に関与するインプリンティング遺伝子のDMRは、正常状態で一方のアレルで、すでにエピジェネティックな変化を受けており、かつ変化を受けやすい特徴を有することから、がん発生機構との関連が注目されている。

II. ゲノムインプリンティングと胎児性がん

1. Wilms腫瘍

前述のBWSでは、およそ10%に腫瘍を合併し、そのほとんどはWilms腫瘍である。Wilms腫瘍では、ほぼ全例にH19-DMRのメチル化異常(高メチル化)、増殖因子であるinsulin-like growth factor 2 (IGF2) 遺伝子のインプリント異常(loss of imprinting: LOI)が約70%にみられることが報告されている。本来メチル化されていない母由来アレルがメチル化されることにより、CTCF蛋白の結合が妨げられH19の下流のエンハンサーがIGF2に作用することにより、不活性であった母由来のIGF2が活性化され、IGF2の過剰発現を引き起こす。IGF2は細胞増殖因子として、またアポトーシス誘導因子としての作用をもつ。

2. 神経芽細胞腫

癌抑制遺伝子p53と構造の類似するインプリント遺伝子p73の異常が高頻度の観察されている。p73は、母由来アレル特異的発現を示し、この発現の低下が神経芽細胞腫発症原因と考えられている。興味深いことに、このp73はLIT1による発現調節を受ける(後述)。

3. 家族性全胎状奇胎

大部分の全胎状奇胎は、父由来アレルのみで構成される(雄核発生)異常妊娠として知られる。胎児成分を欠き、胎盤構成細胞が異常に増殖、水腫様変性を示す。また全胎状奇胎には、1精子受精の場合と2精子受精の場合が存在する。全胎状奇胎では、染色体全体でインプリ

表1 インプリンティング遺伝子のメチル化異常と癌の関連

インプリント領域 (DMR)	メチル化異常	癌腫	インプリント領域 (DMR)	メチル化異常	癌腫
DIRAS3 (DIRAS3)	Hypermethylation	卵巣癌 乏突起膠腫 濾胞性甲状腺癌 乳癌	IGF2-H19 (DMR0)	Hypermethylation	白血病 食道癌 家族性全胎状奇胎
ZAC	Hypermethylation	卵巣癌	IGF2-H19 (DMR2)	Hypermethylation	インスリノーマ 結腸直腸癌 乳癌 肺癌 白血病 結腸癌 白血病
MEST	Hypermethylation	多形性グリア芽腫	KCNQ1 (KVDMR)	Hypermethylation	
IGF2-H19 (H19)	Hypomethylation	骨肉腫 結腸直腸癌 膀胱癌 肝細胞癌 セミノーマ 肺癌 子宮頸癌 悪性混合ミューラ腫瘍 横紋筋肉腫 平滑筋肉腫 精巢生殖細胞腫瘍	KCNQ1 (CDKNIC promoter)	Hypermethylation	
	Hypermethylation	骨肉腫 Wilms 腫瘍 結腸直腸癌 頭頸部扁平上皮細胞癌 肝芽腫 肝細胞癌 卵黄嚢腫瘍 前立腺癌 絨毛癌 卵巣癌 結腸癌 膀胱癌 肝芽腫 卵巣癌 Wilms 腫瘍 乳癌 結腸癌 骨肉腫	KCNQ1 (PHLDA2 promoter)	Hypomethylation	B細胞リンパ腫 骨肉腫
	Hypermethylation	乳癌 肺癌	DLK1-MEG3 (IG-DMR)	Hypermethylation	神経芽細胞腫 褐色細胞腫 腎細胞癌 肝細胞癌 下垂体腺腫 多発性骨髄腫 急性骨髄性白血病 神経芽細胞腫 褐色細胞腫 ウィルムス腫瘍 下垂体腫瘍 セミノーマ 家族性全胎状奇胎 卵黄嚢腫瘍 急性骨髄性白血病 骨肉腫 卵巣癌 二親性全胎状奇胎 卵巣癌 神経膠腫 婦人科癌 急性骨髄性白血病 下垂体腺腫 骨髄悪性腫瘍
	Hypermethylation	乳癌 肺癌	DLK1-MEG3 (DLK promoter)	Hypermethylation	
	Hypermethylation	乳癌 肺癌	DLK1-MEG3 (MEG3 promoter)	Hypermethylation	
	Hypermethylation	乳癌 肺癌	SNRPN	Hypomethylation	
	Hypermethylation	乳癌 肺癌	IGF2R	Hypomethylation	
	Hypermethylation	乳癌 肺癌	PEG3-ZIM2 (PEG3)	Hypermethylation	
	Hypermethylation	乳癌 肺癌	PEG3-ZIM2 (PEG3)	Hypomethylation	
	Hypermethylation	乳癌 肺癌	PEG3-ZIM2 (PEG3)	Hypermethylation	
	Hypermethylation	乳癌 肺癌	NNAT	Hypermethylation	
	Hypermethylation	乳癌 肺癌	L3MBTL	Hypomethylation/ Hypermethylation	
	Hypermethylation	乳癌 肺癌	GNAS (NESP55)	Hypermethylation	家族性全胎状奇胎

ントの破綻がみられる。ごくまれに、正常の両親由来のゲノム構成による受精にもかかわらず、胎状奇胎様に水腫変性を示し、流産を繰り返す家系の報告がある。また、この流産産物は、多くの母由来 DMR のメチル化の欠損を示す。

4. その他

網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、慢性骨髄性白血病などインプリント遺伝子が関与すると考えられ、異常を示す親の起源に隔たりを認める (表1)。

III. 成人の体細胞がん

エピジェネティックな分子機構で制御されているイン

プリンティングが破綻すると、結果的にインプリントを受けているがん関連遺伝子の発現に異常を来し、がん化やがんの進展に寄与することが推測される。実際に、数多くのインプリント遺伝子の異常が様々ながんで報告され、DMR の DNA メチル化の異常を表1に示す。これは、遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドの過剰メチル化による遺伝子不活化とは異なる。頻度としては IGF2 が最も多い。前述のごとく、IGF2 の過剰発現は、組織の過形成とがん新生能を示す。大腸癌、乳癌、肺腺癌、肝細胞癌、卵巣癌などの成人癌で数多く報告されている。しかし、発生機序は、Wilms 腫瘍とは異なり、H19 の DMR の異常に加えて、IGF2 の DMR (DMR0) の異

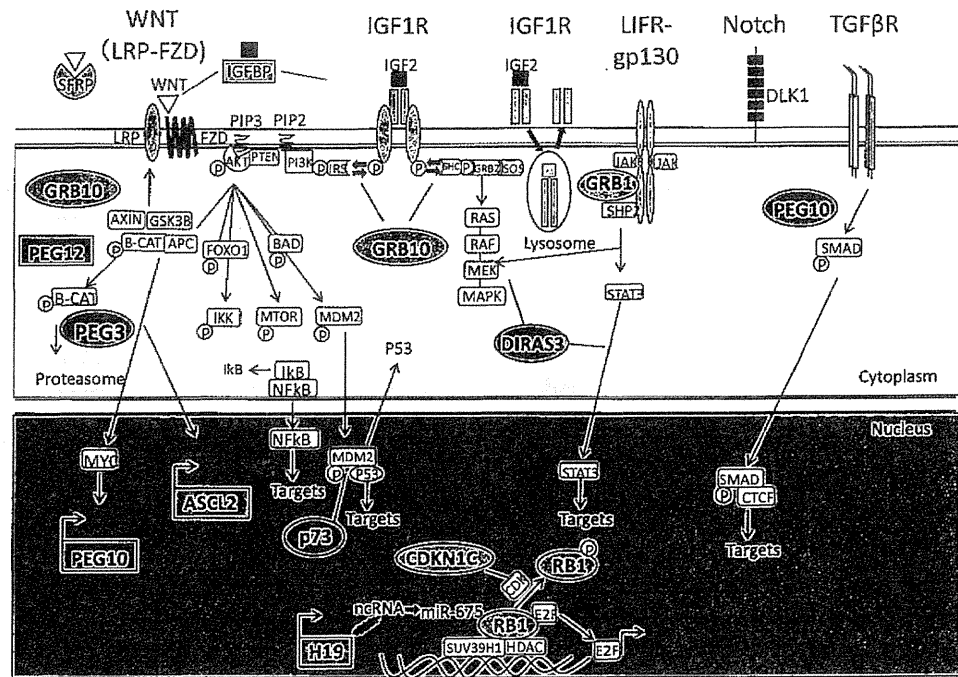


図 2 インプリント遺伝子のシグナル伝達機構 (文献¹⁵⁾引用, 改変)

常も加わる。KIP2の発現の異常も多くみられるが、癌腫や組織型によって、複雑なエピジェネティックな分子機構で、発現制御(抑制)されている可能性がある。また、早期癌において変異がみられるため、腫瘍予知マーカーとしても期待されている。

体細胞では、DNAメチル化以外にアレル特異的な発現を制御する因子として、ヒストン修飾が候補にあげられる。ヒストンのメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化は遺伝子発現とクロマチン構造を制御すると考えられている。いくつかのインプリント遺伝子座ではアレル特異的なヒストン修飾が観察されている¹⁰⁻¹⁴⁾。

IV. インプリントシグナル伝達機構とがん

インプリント遺伝子のいくつかは、細胞増殖を制御するシグナル伝達に重要な役割を果たす。インプリント機構の破綻は、増殖を活性化させ、がん化を導くと予想される。

たとえば、growth-receptor-bound protein 10 (GRB10)は、母由来遺伝子発現を示す癌抑制遺伝子で、細胞内蛋白 AXIN, LRP6 と結合し、WNT シグナルを抑制する。同様に父由来遺伝子発現で癌抑制遺伝子である PEG3 は、 β -catenin の輸送を阻害する。反対に、PEG12 は WNT シグナルを正に制御する。ASCL2 は、 β -catenin を直接標的とする転写因子と報告されている。WNT シグナルと IGF1 receptor (IGF1R) シグナルのクロストークは、細胞内外でみられる。最近、IGFBP4 は直接

膜蛋白 FZD に作用し、WNT シグナルを抑制することも報告された。IGF2 は、WNT シグナルと IGF1R シグナルの調節に働くと考えられている。また、IGF2 は IGF2 receptor (IGF2R) とも結合する。IGF2R は、陽イオン非依存性マンノース 6-リン酸レセプターと同一の蛋白質で、IGF2 が結合してもシグナル伝達に関与せず、むしろ IGF2 の分解に働くと考えられている。この IGF2 は、IGF1R あるいはインスリンレセプターのリン酸化を誘導し、PI3K や Ras-MAPK 経路を活性化する。GRB10 は IGF1R や insulin receptor substrate (IRS) 間の相互作用をブロックする。また、GRB10 は p53 の安定性にも関与する。さらに ncRNA である MEG3 も MDM2 の機能を抑制し、p53 の安定性に寄与する。DIRAS3 は、ヒトにのみ存在する父由来遺伝子発現で癌抑制遺伝子としての機能を有し、RAS と構造上類似する。また、DIRAS3 は JAK-STAT シグナル伝達を抑制する。父由来遺伝子発現 DLK1 は Notch シグナルを抑制する。また、PEG10 は TGF- β pathway を抑制に働き、同時に MYC の標的として、p53 を機能調節する(図2)。

H19 ncRNA miR-675 は大腸癌で強発現する。miR-675 は、最近インプリント遺伝子として報告された RB1 に働き、この RB1 はインプリント遺伝子 CDKN1C (KIP2) と相互作用を示す。われわれも ZAC が LIT1 を介して、KIP2 の発現調節に関与することを示した。その後、p73 も KIP2 の発現調節に関与することが報告された。

このように、胎児の発育・発達過程の遺伝子発現調節に関与するインプリント遺伝子は、がん化過程においても重要な役割を果たすことがしだいに明らかとなってきている。また、インプリント遺伝子間のシグナル伝達機構の存在もあり、インプリント異常がもたらすがん化機構の仕組みも明らかになってきている。

V. がん治療への応用

エピジェネティックな分子機構の異常を修復するため、メチル化酵素阻害剤 (DNMT 阻害剤: RG108) はすでに治療に応用されている。これらの薬剤は、DNMTの活性部位に不可逆的に結合することで過剰メチル化を防止し、主に血液系のがんでその有効性は示されている。しかし、固形がんでは副作用の効果が大きく、他の薬剤との併用療法が期待されている。同様に、脱アセチル化阻害剤 (HDAC 阻害剤: vorinostat) も癌抑制作用を示し、その有効性は臨床試験で証明されている。また、ncRNAを標的とした治療の開発も行われている。さらに詳細なエピジェネティックな分子機構が明らかになれば、新薬開発は進むと予想される。

一方、インプリント遺伝子間のシグナル伝達機構の解明は、既存の治療法の応用が可能である。そのため、複数の薬剤との併用は相乗効果があり、副作用低減に有効であると予想される。また将来、個人個人のエピゲノム状態に応じて、薬剤の量や種類の選択ができるいわゆるテーラーメイド医療の実現も可能となる。

おわりに

エピジェネティクスはポストゲノム分野における最も重要な研究領域の一つであり、精緻な遺伝子発現を制御する機構として注目されている。ゲノムインプリンティング機構の研究は、エピジェネティクス研究の先駆けとして解析が進められてきた。インプリント遺伝子座の発現制御モデルは、インプリント遺伝子以外の遺伝子との比較により、エピジェネティクス制御の詳細かつ広範囲な解析に応用されている。しかし、これらエピジェネティックな修飾が領域・時期特異的に起こる仕組みはほとんどわかっておらず、さらなる研究の展開が望まれる。また近年、生殖補助医療 (ART) 出生児において、BWSやASなどのインプリンティング異常症の発症頻度が高いことが、数多く報告されている。ARTはインプリンティングが獲得される時期の配偶子を操作するため、排卵誘発、配偶子操作、培養液などのメチル化異常への影響について懸念されている。成人では、がんの発症に

DNAメチル化異常が関与することから、ART出生児の成人期・老年期に至る長期 follow up は必要である。また、エピジェネティクス解析は、技術的な面で現時点では困難な点もあるが、新たな研究分野あるいは治療方法の開発の意味でも今後の研究の進展が期待される。今後、包括的なゲノムインプリンティングまたはエピジェネティクス研究が展開し、医学分野に応用されることが期待される。

文 献

- 1) Surani MA, Barton SC and Norris ML: Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308: 548-550, 1984.
- 2) McGrath J and Solter D: Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37: 179-183, 1984.
- 3) Souma S, Machida Y, Sato T, et al: The origin of multiple superconducting gaps in MgB₂. *Nature* 423: 645-647, 2003.
- 4) Li E, Bestor TH, Jaenisch R, et al: Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926, 1992.
- 5) Li E, Beard C, Jaenisch R, et al: Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366: 362-365, 1993.
- 6) Howell CY, Bestor TH, Ding F, et al: Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 104: 829-838, 2001.
- 7) Okano M, Bell DW, Haber DA, et al: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247-257, 1999.
- 8) Kaneda, M, Okano M, Hata K, et al: Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429: 900-903, 2004.
- 9) Hata, K, Okano M, Lei H, et al: Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 129: 1983-1993, 2002.
- 10) Saitoh, S and Wada T: Parent-of-origin specific histone acetylation and reactivation of a key imprinted gene locus in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 66: 1958-1962, 2000.
- 11) Fournier C, Goto Y, Ballestar E, et al: Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *Embo J* 21: 6560-6570, 2002.
- 12) Higashimoto K, Urano T, Sugiura K, et al: Loss of CpG methylation is strongly correlated with loss of histone H3 lysine 9 methylation at DMR-LIT1 in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet* 73: 948-956, 2003.
- 13) Lewis A, Mitsuya K, Umlauf D, et al: Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat Genet* 36: 1291-1295, 2004.
- 14) Vu T, Li T and Hoffman AR: Promoter-restricted histone code, not the differentially methylated DNA regions or antisense transcripts, marks the imprinting status of IGF2R in human and mouse. *Hum Mol Genet* 13: 2233-2245, 2004.
- 15) Uribe-Lewis S, Woodfine K, Stojic L, et al: Molecular mechanisms of genomic imprinting and clinical implications for cancer. *Expert Rev Mol Med* 25: 13 e2, 2011.

