

疾患とエピゲノム解析

豊田 実, 鈴木 拓, 甲斐 正広

DNAメチル化やヒストン修飾によるエピジェネティックな遺伝子制御機構は、がんや生活習慣病、精神疾患などに重要な役割を果たす。特にがんにおけるエピゲノム異常の解析により、発がんの分子機構解明や新しい診断法・治療法開発へ向けた知見が見出されてきた。エピゲノム異常が起こる分子機構は未だ解明されていないが、加齢や病原体の感染、炎症など細胞へのストレスが関与する。このように疾患のエピゲノム研究が進んだ背景には、エピゲノム解析法が次々と開発されたことが大きい。本稿では、疾患におけるエピゲノム異常の役割とその解析法について、筆者らの知見を交えて概説する。

1. はじめに

エピジェネティクスとは、DNAの一次構造の変化なしに遺伝情報を分裂後の細胞に伝えるもので、DNAメチル化やヒストン修飾が関与する。ヒトゲノム解読が終了し、塩基配列で規定される情報は、データベースから入手して使用可能な時代になってきた。一方、DNAメチル化やヒストン修飾は組織ごとに異なり、細胞内外の環境の影響で変化し、DNAの配列に刻まれた情報を的確に読み取るため、エピジェネティックなコードが重要な役割を果たす。ゲノム解読が終了しても、エピジェネティクスが“unfinished symphony”と言われる所以である¹⁾。本稿では、疾患とエピゲノム解析について、われわれの研究成果を含め、最近の知見について概説する。

2. エピジェネティックな遺伝子発現制御機構

2-1. DNAメチル化

哺乳類のゲノムでは、5'-CpG-3'配列のシトシンの5位がメチル化修飾を受ける。通常、遺伝子のプロモーター領域に存在するCpGアイランドはメチル化されていないが、メチル化を受けることにより遺伝子発現が抑制される。

DNAメチル化は3種類のDNAメチル基転移酵素DNMT1, DNMT3A, DNMT3Bにより起こる。DNAメチル化が関与する生理的現象として、ゲノムインプリンティング、X染色体不活化、AluやLINEなどのレトロトランスポゾンの不活化などがあげられる。

2-2. クロマチンとヒストン修飾

ヒストンのN末端部分のリジン残基(K)は、アセチル化やメチル化などの修飾を受ける。アセチル化は転写活性化に、H3K4のメチル化は転写活性化に、H3K9, H3K27のメチル化は転写抑制に関与する。メチル化されたCpG配列には、メチルCpG結合タンパク質が結合し、さらにヒストン脱アセチル化酵素やヒストンメチル化酵素、ポリコムタンパク質がリクルートされ、クロマチンは閉じた状態になる。

DNAメチル化やヒストン修飾は遺伝子の一次構造に影響を与えないエピジェネティックな変化であり、サイレンシングされた遺伝子は、細胞にDNAメチル化阻害剤を投与することにより、回復させることが可能である。

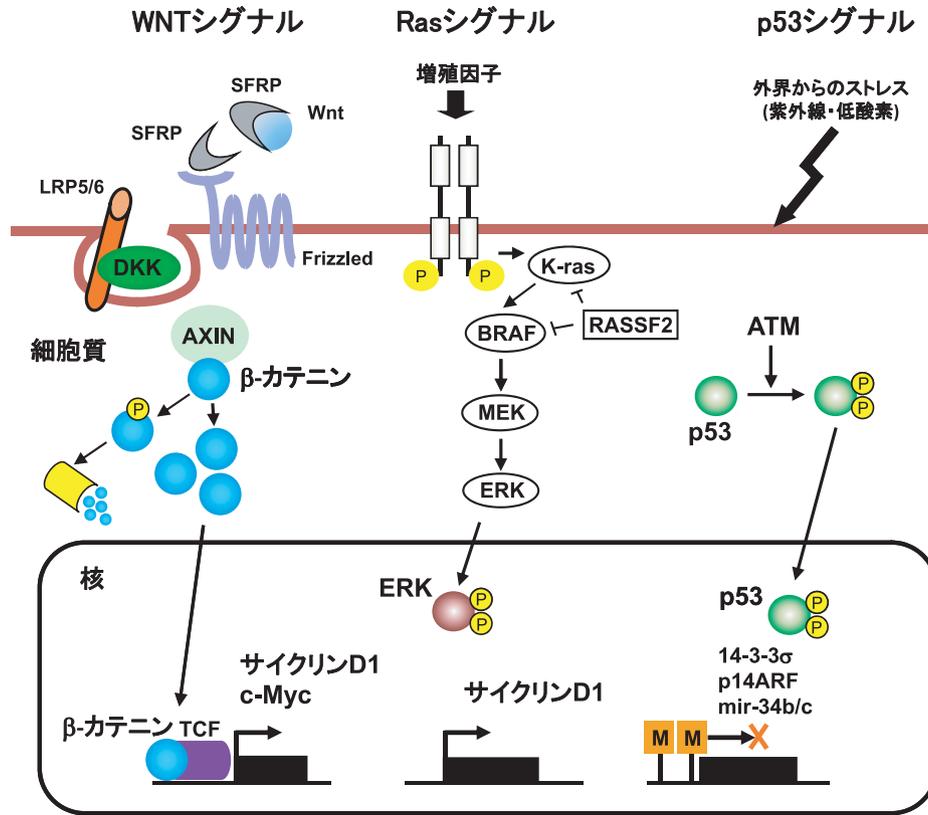
3. 疾患とエピゲノム異常

エピゲノム異常はDNAの一次構造に影響を与えないため、疾患の原因となるような異常なタンパク質を作り出すことはないが、遺伝子発現に影響を与え、細胞分裂後もその異常は受け継がれる。がんや代謝疾患、精神疾患、免疫疾患など後天的な疾患の多くにエピゲノム異常が関与すると考えられる。

札幌医科大学 生化学講座 (〒060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目)

Disease and epigenome analysis

Minoru Toyota, Hiromu Suzuki, and Masahiro Kai (Department of Biochemistry, Sapporo Medical University, South-1, West-17, Chuo-ku, Sapporo 060-8556, Japan)



細胞増殖

図1 がんのシグナル経路異常におけるエピジェネティックな異常の役割

がんの発生に重要な WNT, Ras, p53 などのシグナル異常には、ジェネティックな異常だけでなく、エピジェネティックな異常が関与する。WNT シグナルの活性化には、WNT の負の制御遺伝子 *SFRP* や *DKK* の異常な DNA メチル化が、Ras シグナルの活性化には、*RASSF2* の異常な DNA メチル化が関与する。*p53* の変異を有しないがんでも、*p53* の標的遺伝子が異常メチル化により発現しないことで、*p53* の機能に異常を来す場合がある。

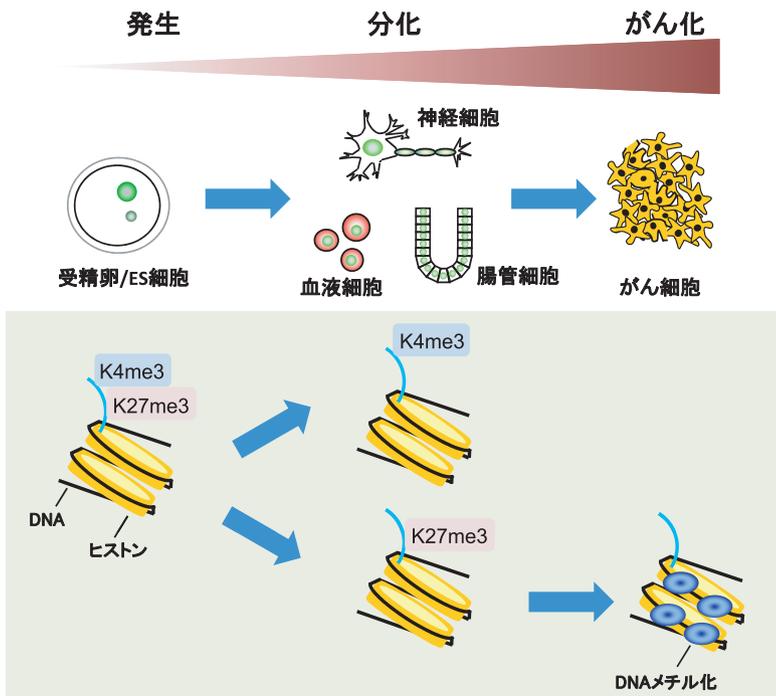


図2 発生、分化およびがん化とエピジェネティックな遺伝子発現制御

受精卵と成体を構成する組織は同じゲノム DNA を有するが、エピジェネティックな遺伝子発現制御により全く異なる遺伝子発現パターンを示す。ES 細胞におけるヒストン修飾の網羅的解析により、未分化な細胞では、転写の活性化のマークであるヒストン H3K4 のメチル化と、転写抑制のマークである H3K27 のマークが共存した bivalent な状態になっており、転写の可塑性が高い状態と言える。一方、分化した細胞では、組織特異的に発現している遺伝子は H3K4 により、発現していない遺伝子は H3K27 によりマークされる。がんでは、H3K27 から DNA メチル化へのスイッチが起こり、転写が強く抑制される状態になる。

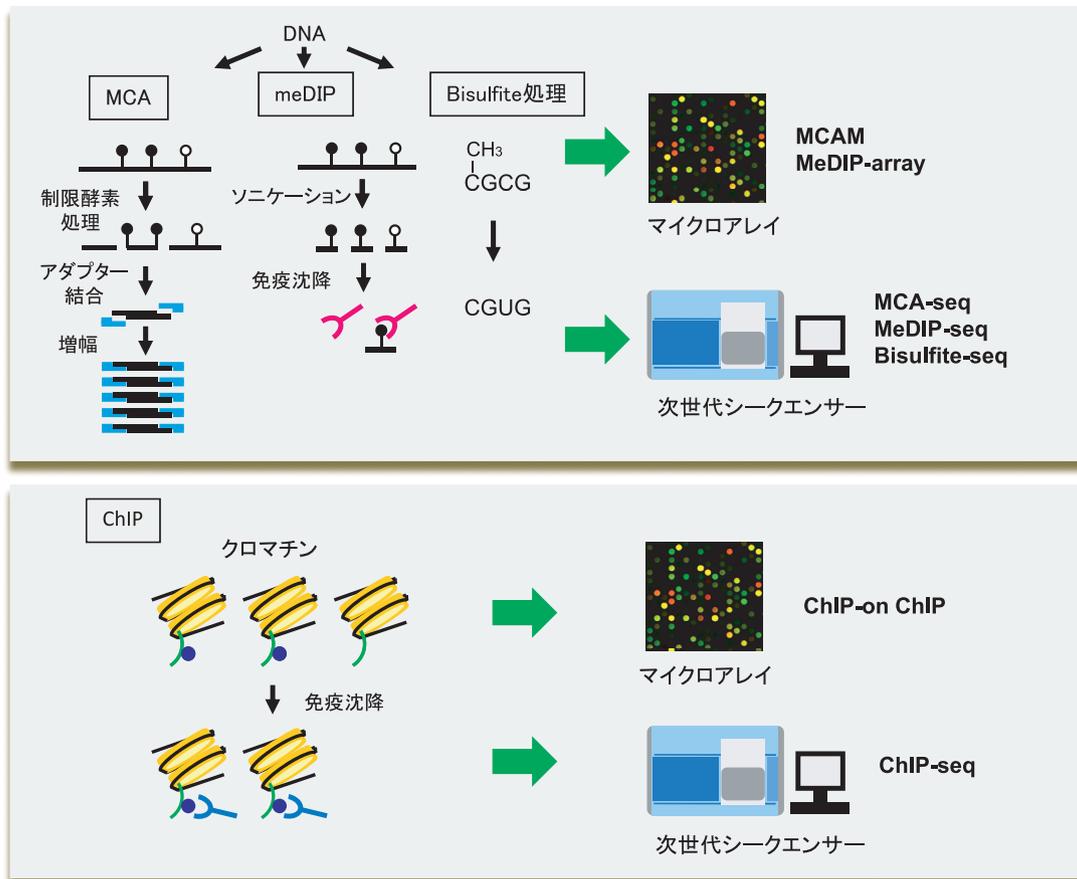


図3 ゲノム網羅的エピゲノム方法

ゲノム網羅的DNAメチル化解析法とヒストン修飾解析法。メチル化感受性制限酵素や、抗メチルシトシン抗体で免疫沈降したDNA、bisulfite処理したDNAを用いて、マイクロアレイ法や次世代シーケンサーによる網羅的メチル化解析が可能である（上図）。ヒストン修飾の解析には、クロマチン免疫沈降法で得られたDNAをマイクロアレイ法や次世代シーケンサーを用いて解析する（下図）。

3-1. がん化におけるエピゲノム異常の役割

細胞周期チェックポイントの異常はがん細胞にしばしば認められる。サイクリン依存性キナーゼの阻害遺伝子である *p16/CDKN2A* や *p15/CDKN2B* は、しばしばがんにおいてDNAメチル化により不活化されている^{2,3)}。これら遺伝子の遺伝子変異や染色体欠失による異常の頻度は低く、エピジェネティックな異常が細胞周期チェックポイント異常を引き起こすと考えられている。われわれは、分裂期チェックポイントに参与するユビキチンリガーゼ *CHFR* が大腸がん、胃がん、口腔扁平上皮がんなどで異常メチル化により不活化されていることを見出した⁴⁻⁶⁾。 *CHFR* が異常メチル化で発現消失しているがん細胞株を微小管阻害剤であるタキソールやドセタキセルで処理すると、 G_2/M 期での細胞周期停止が起こらず、細胞は分裂死を起こす^{4,5)}。よって、*CHFR* の異常メチル化は、微小管阻害剤に対する薬剤感受性マーカーとして有用な可能性が示唆された⁷⁾。

がん細胞ではしばしばDNA修復能の異常を認める。特に、DNA修復酵素のエピジェネティックな異常は様々な

腫瘍で認められる。*O*(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) は、メチル化されたグアニンを修復する酵素であり、大腸がんやグリオーマにおいてメチル化により不活化されている。MGMTがメチル化している腫瘍では、*K-ras* 遺伝子のGからAへの変異が高率に起こることが知られている⁸⁾。また、ミスマッチ修復酵素、hMLH1の異常メチル化は、マイクロサテライト不安定性を引き起こす。散発性大腸がんにおけるマイクロサテライト不安定性の原因のほとんどは、ミスマッチ修復酵素の変異ではなく、hMLH1の異常メチル化である⁹⁾。

家族性大腸腺腫症の原因遺伝子として同定された *APC* がWNTシグナルに参与することが明らかとなり、発がんにおけるWNTシグナルの関与が示唆された。大腸がんにおけるWNTシグナル活性化には、*APC* 遺伝子や β -カテンン遺伝子の点突然変異だけでなく、WNTの制御遺伝子のエピジェネティックな異常が関与する（図1）。われわれは、*SFRP* 遺伝子ファミリー、*DKK* 遺伝子ファミリーが、大腸がんにおいて高率にDNAメチル化により不活化

されていることを明らかにした^{10,11}。APCあるいはβ-カテニンに変異を認める大腸がん細胞株では、TCF/β-カテニンの転写活性化能が上昇しているが、*SFRP1*や*SFRP2*の遺伝子導入により、転写活性化能の抑制と細胞増殖の抑制が起こる¹¹。これらの結果は、*SFRP*遺伝子ファミリーのエピジェネティックな不活化が、大腸がんにおけるWNTシグナルの強い活性化に重要であることを示唆する。

増殖因子とその受容体を介したシグナルは、Rasを介して核へ伝わり、細胞増殖に関与する。がん細胞ではしばしば、*Ras*や*RAF*の点突然変異により、増殖シグナルに係りなしに増殖シグナルの活性化を認める。一方、正常組織においては、*Ras*の異常活性化は細胞老化やアポトーシスを誘導する。大腸がんでは、*K-ras*や*BRAF*の変異により*Ras*シグナルの活性化が起きている。その際、正常細胞で見られるような細胞老化やアポトーシスが起これないのはなぜであろうか。われわれは、がん細胞では*Ras*のシグナルを負に制御する因子の異常があると考え、*Ras*と相互作用する遺伝子群のエピジェネティックな異常について解析した(図1)。その結果、大腸がんにおいて*RASSF2*、*IGFBP7*がDNAメチル化により不活化されていた^{12,13}。*K-ras*や*BRAF*の変異を有する大腸がん細胞株に*RASSF2*を導入すると細胞形態の変化やアポトーシスを誘導できた¹²。また、*RASSF2*や*IGFBP7*のDNAメチル化が、*K-ras*や*BRAF*変異とよく相関することを見出した^{12,13}。

p53は、ヒト腫瘍で最も高頻度に異常を認めるがん抑制遺伝子である。われわれは最近、p53の標的遺伝子であるmir-34b/cが大腸がんにおいて高率にメチル化されていることを見出した。DNAメチル基転移酵素、*DNMT1*および*DNMT3B*をノックアウトした大腸がん細胞株(DKO細胞)において、発現が誘導されるmicroRNAをTaqMan PCR法で解析することにより、mir-34b/cの発現がDKO細胞で誘導されていることが分かった。また、mir-34b/cが大腸がん症例の90%において異常メチル化されていること、メチル化阻害剤処理により、mir-34b/cの標的であるCDK6、METの発現が抑制されることを明らかにした¹⁴。がん細胞では、mir-34b/cがメチル化により不活化されることで、p53による転写誘導が起これず、METやCDK6の高発現につながることを示唆された(図1)。他にも、*14-3-3σ*や*p14ARF*などのp53標的遺伝子がDNAメチル化で不活化されることが報告されており、p53の変異がないがんでもp53の標的遺伝子が転写されないことで、p53の機能異常が起こると考えられる^{15,16}。

消化器がんにおいてしばしば正常組織で見られる糖鎖の発現低下やがん特異的糖鎖の発現を認める。われわれは、糖転移酵素遺伝子の発現を網羅的に解析し、大腸がんおよび胃がんにおいて*B4GALNT2*遺伝子がDNAメチル化により不活化されていることを明らかにした¹⁷。*B4GALNT2*

は*Sd^a*糖鎖の形成に関与し、*Sd^a*糖鎖の低下により、がん特異的糖鎖である*sLe^x*の過剰発現が起こる。*B4GALNT2*の発現が消失している大腸がんおよび胃がん細胞株をDNAメチル化阻害剤で処理すると、*B4GALNT2*の発現回復と、*Sd^a*糖鎖の発現を認めた。がんにおける糖鎖異常は多数起きており、糖転移酵素のエピジェネティックな異常の解析によりその分子機構の一端が明らかになる可能性が示唆された。

がんにおいて、プロモーター領域の高メチル化だけでなく、ゲノムワイドな低メチル化が起こることが知られている。最近、繰り返し配列LINE1のメチル化レベルを定量的メチル化解析法である、bisulfite-pyrosequencing法で解析することにより、ゲノムワイドなメチル化レベルの解析が比較的容易になってきた¹⁸。ゲノムワイドな低メチル化は様々ながんにおいて認められる。DNAメチル基転移酵素、*DNMT3B*の遺伝子変異を有するヒトやマウスでは、染色体の転座を認め、DNA低メチル化が染色体異常を起こす可能性が示唆される¹⁹。しかし、ヒトがんにおけるゲノムワイドな低メチル化と染色体異常の関連に関しては報告が少なく、今後の検討が必要と考えられる。

がんにおけるメチル化は、メチル化により増殖速度が速くなった細胞が選択された結果か、メチル化の制御機構の異常により起こるのか長い間議論があった。われわれは、一部の胃がんにおいてゲノムワイドなメチル化の異常、CpG island methylator phenotype (CIMP)を有することを見出した⁹。CIMP陽性腫瘍は、高頻度に*hMLH1*遺伝子のメチル化を有し、散发性大腸がんにおいて、ゲノムワイドなメチル化異常の結果、マイクロサテライト不安定性が起きていると考えられた。CIMP陽性かつマイクロサテライト不安定性陽性の大腸がんは高率に*BRAF*遺伝子の変異を有し、ジェネティックな異常とエピジェネティックな異常は、ランダムに起きて蓄積するのではなく、互いに密接な関連を持って起こると考えられた^{20,21}。

3-2. 生活習慣病、精神疾患とエピゲノム異常

がん以外の後天的疾患におけるエピゲノム異常も大きな注目を集めつつある。Agoutiマウスでは、食餌中のメチル基ドナーの量により、Agouti遺伝子のDNAメチル化の状態や体毛色が変わることが知られている²²。Kameiらは、マウスにおいて、高脂肪食により*Dnmt3a*の発現が誘導されることを見出した²³。これらの結果より食餌によるエピゲノムの変化は、生活習慣病の病態に重要な役割を果たすことが示唆される。

DNAメチル化は神経、精神疾患の病態にも関与する。メチル化CpG結合タンパク質の一つであるMeCP2の変異は、精神遅延や自閉症を特徴とするRett症候群を引き起こす²⁴。後天性の精神疾患では、統合失調症やうつ病患者の脳のDNAメチル化にも異常が認められる。Millらは、

統合失調症および躁うつ病患者の前頭葉における DNA メチル化をマイクロアレイを用いてゲノム網羅的に解析し、脳の発達やストレス応答に関連する遺伝子のメチル化異常を認めることを報告している²⁵⁾。上皮細胞のように常に分裂している細胞に起こる DNA メチル化異常と異なり、環境因子がどのように神経細胞のエピゲノムに異常を引き起こすか解明が望まれる。

3-3. 組織およびがん幹細胞とエピゲノム

受精卵からヒトの体を構成する約 200 種類の細胞への分化において、ゲノム情報のエピジェネティックな制御が重要な役割を果たす。ES 細胞と分化した細胞におけるエピゲノム解析から、細胞の分化ではエピゲノムのリプログラミングが起こると考えられる (図 2)。ES 細胞では、転写の活性化マークであるヒストン H3K4 のメチル化と、抑制マークである H3K27 のメチル化が共存した状態 (bivalent) になっており、遺伝子を発現するか抑制するか、可塑性が保たれた状態になっていると考えられる²⁶⁾。一方、分化した細胞では、H3K4, H3K27 どちらか一方のメチル化だけを有するようになり、転写調節の可塑性は失われ安定な状態になる。これら bivalent なマークを有する遺伝子はがんにおいて DNA メチル化の標的となりやすいことも明らかとなってきた²⁷⁻²⁹⁾。

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立は再生医療に急速な進展をもたらした。iPS 細胞の樹立時には、エピゲノムのダイナミックなリプログラミングが起こると考えられる。最近、がんの iPS 化 (iPC 細胞) について報告がなされた³⁰⁾。がん細胞では、正常の分化と異なり、bivalent な遺伝子は H3K27 のメチル化から DNA メチル化にスイッチした状態になっている。iPS 細胞と iPC 細胞でエピゲノムのリプログラミングにどのような共通点や相違点があるか興味深い。

4. エピゲノム異常のメカニズム

疾患における DNA メチル化異常が起こる原因に関しては未知の点が多い。Issa らは、正常大腸粘膜におけるエス

トロゲン受容体遺伝子の DNA メチル化を解析し、メチル化レベルが年齢と強く相関することを見出した³¹⁾。この加齢によるメチル化は、炎症性腸疾患においても認められ、細胞分裂の回数が進むほど、DNA メチル化のエラーが蓄積することが示唆された³²⁾。Maekita らは、メチル化の原因として *Helicobacter pylori* 感染が重要であると報告した³³⁾。また、喫煙により遺伝子のメチル化が亢進することが報告されている³⁴⁾。葉酸やビタミン B₆, B₁₂ は DNA メチル化の基質である S-アデノシルメチオニンの代謝経路に関与する。食事内容やアルコール摂取によりこれら栄養素の細胞内の濃度が変化し、DNA メチル化レベルに影響を与える可能性が示唆される。ウイルス感染はしばしば DNA メチル化と関連する。Kaneto らは、肝細胞がんの背景組織である、慢性肝炎や肝硬変における *p16/CDKN2A* のメチル化について解析し、B 型および C 型肝炎ウイルス感染が *p16/CDKN2A* のメチル化に関与することを明らかにした。*p16/CDKN2A* のメチル化は、薬剤性肝炎や自己免疫性肝炎では認められず、ウイルス感染が異常メチル化を引き起こすことを示した³⁵⁾。胃がんの約 10% はエプスタイン・バーウイルス (EBV) が関与するが、EBV 陽性胃がんではがん遺伝子やがん抑制遺伝子の異常をほとんど認めず、ゲノムワイドなメチル化の異常を認める³⁶⁾。EBV により DNMT1 の発現が亢進することがメチル化異常の原因の一つと考えられるが、DNMT1 の発現亢進だけでは、なぜ特定の遺伝子のメチル化だけが起こるのか説明できず、メチル化を制御する機構の関与が示唆される。

5. エピゲノム解析法

従来 DNA メチル化の解析は、サザンブロット法を用いて行われ、大変煩雑であった。しかし、bisulfite-PCR 法が開発され、遺伝子のメチル化解析は飛躍的に広がった。また、クロマチン免疫沈降法が開発され、ヒストン修飾が遺伝子レベルで解析可能になった。ここでは、DNA メチル化およびヒストン修飾解析法について、筆者らが開発した手法を交えて解説する。

表 1 DNA メチル化に影響を与える因子

因子		文献
加齢	正常大腸粘膜において ER 遺伝子が加齢によりメチル化レベルが上昇していた。	31
炎症	炎症性腸疾患では、加齢によりメチル化される遺伝子のメチル化がさらに上昇していた。	32
<i>H. pylori</i> 感染	<i>H. pylori</i> による慢性胃炎では、DNA メチル化の上昇が認められ、発がんリスクに関連する。	33
喫煙	ニコチンは、DNA メチル基転移酵素の発現を誘導し、がん抑制遺伝子の DNA メチル化を引き起こす。	34
肝炎ウイルス	B 型および C 型肝炎や肝硬変では、非ウイルス性肝炎に比べ、 <i>p16/CDKN2A</i> のメチル化を高率に認めた。	35
エプスタイン・バーウイルス	EBV に関連する胃がんでは、既知のがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異を認めず、異常メチル化による遺伝子不活化が重要である。	36
栄養	食餌中のメチル基ドナーの量は、Agouti 遺伝子の DNA メチル化や体毛色に影響を与える。	22

5-1. 遺伝子のDNAメチル化解析

最近、DNAメチル化の解析技術の進展は著しく、その方向は多くの遺伝子を一度に解析する方法と、大量の検体を高速に解析する方法に2極化しつつある。bisulfite処理したDNAをPCR法により解析する方法が一般的であるが、解析する遺伝子が決まっている場合、より定量性の高いメチル化検出法を用いることが望ましい。定量的にメチル化を検出する方法としてCOBRA (combined bisulfite restriction analysis) 法が開発された。COBRA法はメチル化しているアレルとしていないアレルを平等に増幅した後、制限酵素で消化することにより、メチル化を検出する。pyrosequence法はCOBRA法よりも定量性に優れ、多くの検体を高速に処理できる。bisulfite処理したDNAをテンプレートに用いてビオチン化プライマーによりPCRを行った後、DNAを一本鎖にし、プローブをアニールさせる。さらに、DNAポリメラーゼによる伸長反応により、塩基配列をリアルタイムに検出する。他に、TaqMan PCRを利用するmethyLight法がある。最近では、質量分析装置を用いたメチル化解析法、mass array法を利用してメチル化解析した例も報告されている。ハイスループットな解析では、シグナル値やメチル化レベルの数値のみが一人歩きすることになるため、実際の波形や結果を他の方法で確認する必要がある。

5-2. 候補遺伝子解析から全ゲノム解析へ

様々な手法によりゲノム網羅的メチル化解析が可能となってきた(図3)。われわれは、メチル化しているCpGアイランドのみを効率よく増幅する方法、methylated CpG island amplification (MCA)法を開発した³⁷⁾。MCA法では、メチル化感受性制限酵素でゲノムを切断した後、メチル化非感受性制限酵素で再度切断し、アダプターをライゲーションして、PCR法によりメチル化しているDNA断片のみを増幅する。がん細胞および正常組織由来のDNAを用いて、MCAアンプリコンを作成し、representational difference analysis (RDA)法などのサブトラクション法により、がんで異常メチル化している遺伝子断片を同定することが可能である。これまで、大腸がん由来のMCAアンプリコンをテスターに、正常大腸粘膜由来のMCAアンプリコンをドライバーにしてサブトラクションを行い、アポトーシス関連遺伝子HRKやp53の標的遺伝子DFNA5が大腸がんや胃がんにおいて異常メチル化により不活化されていることを明らかにした^{38,39)}。

また、がんおよび正常組織由来のMCAアンプリコンをラベルし、BACアレイやCpGアイランドアレイを用いて、網羅的メチル化解析を行うことができる。東京医科歯科大学の稲澤教授らのグループは、BACアレイを用いて、がんおよび正常組織由来のMCAアンプリコンをハイブリダイズすることにより、異なるシグナルを示すゲノム領域

を特定し、nuclear receptor 1L2やCRABP1遺伝子が異常メチル化していることを明らかにした^{40,41)}。

MD AndersonがんセンターのIssaらの研究グループは、MCAアンプリコンを、BACアレイよりもさらに高解像度のCpGアイランドアレイにハイブリダイズすることにより、網羅的メチル化解析を可能にした(MCA microarray, MCAM)⁴²⁾。MCAM法により、大腸がん細胞株および臨床例で異常メチル化している遺伝子の網羅的解析を行い、bisulfite-PCR法により比較検討した。その結果、MCAM法により90%以上の感度・特異度でがんにおいて異常メチル化している遺伝子を同定可能としている。

Weberらは、DNAを抗メチル化抗体で免疫沈降したDNAを用いて、BACクローンを搭載したアレイや、プロモーターマイクロアレイにハイブリダイズすることにより、DNAのメチル化をゲノム網羅的に解析する手法、methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)法を開発した⁴³⁾。12,000CpGアイランドを搭載したマイクロアレイを用いて大腸がん細胞株においてDNAメチル化の亢進している遺伝子の解析を行い、26遺伝子が異常メチル化していることを明らかにした。Weberらは、大腸がんにおいて異常メチル化している遺伝子は予想したより少なかったとしている。しかし、抗メチル化抗体を用いた免疫沈降法は、感度や再現性の点で問題があり、さらなる改良が必要と考えられる。

ゲノム上のヒストン修飾状態を解析するには、クロマチン免疫沈降法(chromatin immunoprecipitation, ChIP)が用いられる。ChIP法ではDNAとヒストンをクロスリンクさせ、クロマチンを超音波で断片化した後、目的とするヒストン修飾を認識する抗体で免疫沈降を行う。沈降させたDNA-ヒストン複合体からDNAを抽出し、目的とする遺伝子特異的プライマーでPCR反応を行って、ヒストン修飾状態を定量する。ChIP法で得られたDNAをプロモーターアレイにハイブリダイズすることで、ゲノム上にヒストン修飾をマッピングする⁴⁴⁾。この方法は、ChIP on ChIP法と呼ばれ、ヒストン修飾だけでなく、転写因子の結合配列のゲノム網羅的解析に利用される。

5-3. 次世代シーケンサーを用いたエピゲノム解析

マイクロアレイを用いたDNAメチル化、ヒストン修飾の解析は、ゲノムワイドなエピゲノム解析を可能にした。しかし、プローブがない部分の解析ができないこと、全ゲノムを1塩基単位でカバーするには、膨大なアレイ数を必要とする、ハイブリダイゼーションを利用することにより、感度や特異度に限界があるなどの問題点を有する。最近、次世代シーケンサーが開発され、ヒトゲノムのリシーケンシングやがんにおける遺伝子変異解析に威力を発揮している。DNAメチル化やヒストン修飾の解析は、次世代シーケンサーの大変よいアプリケーションの一つであ

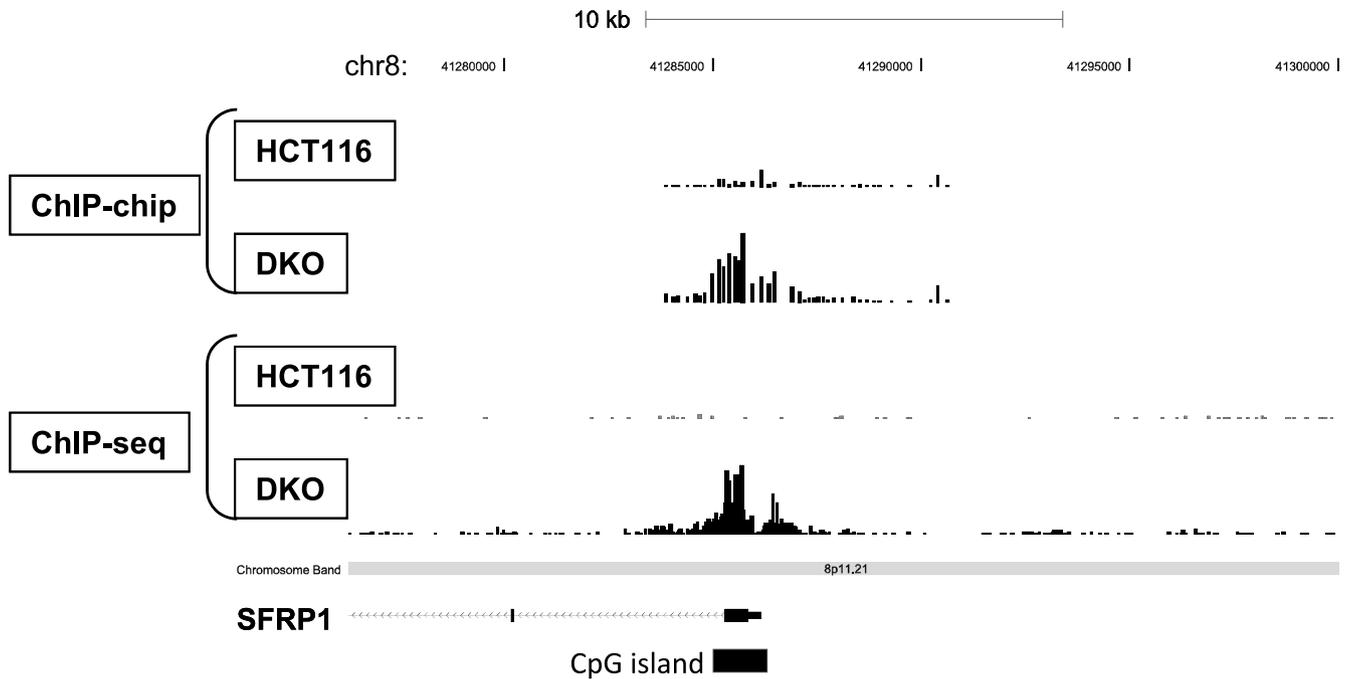


図4 ChIP on ChIPとChIPシーケンス法によるH3K4メチル化の解析

大腸がん細胞株 HCT116 および DNMT1 および DNMT3B をノックアウトした大腸がん細胞株 (DKO 細胞) を用いて, ChIP on ChIP 法および ChIP シーケンス法により, H3K4 のメチル化について解析した. どちらの方法でも, SFRP1 遺伝子の転写開始点近傍のピークは DKO 細胞にのみ認められる. ChIP シーケンス法のほうが, よりシャープなピークを得ることができた.

り, 数多くの応用法が考えられる.

次世代シーケンサーにより DNA メチル化を解析するには, 制限酵素処理と PCR 法の組み合わせによりメチル化したゲノム領域を濃縮する方法や, 抗メチルシトシン抗体や, メチル CpG 結合タンパク質 MBD2 によりメチル化した DNA 断片を濃縮し, ライブラリーを作成してシーケンスする方法⁴⁵⁾, bisulfite 処理した DNA からライブラリーを作成してシーケンスする方法がある⁴⁶⁾. Lister らは, ES 細胞と線維芽細胞における DNA メチル化について, 次世代シーケンサーを用いて全ゲノム bisulfite シーケンスで解析した⁴⁶⁾. ES 細胞ではメチル化しているシトシンの約 1/4 が非 CpG 配列のメチル化であり, 分化誘導により非 CpG のメチル化は消失した. ES 細胞と分化した細胞では DNA メチル化の制御機構や意義が異なると考えられる.

次世代シーケンサーではマイクロアレイに使用する鋳型の量が少ないため, クロマチン免疫沈降して得られた DNA を解析するのに適している. われわれは, 大腸がん細胞におけるヒストン H3K4 のメチル化状態を, クロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサー SOLiD3 を組み合わせで解析した. 1 検体あたり約 5,000 万のタグを解析でき, このうち, 3,500 万タグがヒトゲノムにマップされ, 3,000 万タグがゲノム上に 1 箇所だけマップできた. ChIP シーケンスでは, ChIP on ChIP の結果が確認でき, よりバックグラウンドの低いシャープなピークを得ることが

できた (図 4). 大腸がん細胞において転写のアクティブマークであるヒストン H3K4 のメチル化は, これまでマイクロアレイ法で得られた遺伝子発現とよく相関した. また, DNA メチル基転移酵素, DNMT1 および DNMT3B をノックアウトした細胞 (DKO 細胞) では, DNA 脱メチル化により, ヒストン H3K4 のメチル化を示す領域の増加を認めた. さらに, DNMT ノックアウトによりヒストン H3K4 と K27 のメチル化の両方を有する遺伝子の増加を認め, これらの遺伝子は bivalent な状態から DNA メチル化により安定的な遺伝子サイレンシング状態に誘導されたと考えられた. これらの結果より, 次世代シーケンサーを用いたエピゲノム解析はがんにおけるエピゲノム異常の標的遺伝子の解析だけでなく, エピゲノムを調節する分子基盤の解明に有用と考えられる.

今後, エピゲノム解析の主流は, マイクロアレイからシーケンサーを用いた解析にシフトしていくと考えられる. バーコードを用いた大量検体の解析や, 組織からの ChIP シーケンスなど超微量検体での解析, 1 分子シーケンスへと期待が高まる.

6. おわりに

疾患におけるエピゲノム異常の意義や新しい解析法について概説した. 最近 15 年間の研究で, DNA メチル化やヒストン修飾異常がどのようにして, 疾患の病態に関わるか明らかになりつつある. しかし, 多くのヒストンメチル化

酵素やヒストン脱メチル化酵素は同定されて間がなく、エピジェネティックな制御に関わる分子の多くは機能解析や疾患における役割が不明である。一番重要なのは、どのようにしてエピゲノム異常が起こるかという根本的な問題が解決されていない点である。今後、疾患エピゲノムの解析が益々進むと共に、その制御による疾患の治療法開発や、安全な再生医療技術開発へ進展することを期待する。

謝辞

本研究の遂行にあたりご協力頂いた、札幌医科大学内科学第一講座、同がん研究所分子生物学部門の皆様、東京大学医科学研究所の今井浩三先生にこの場を借りて深謝申し上げます。

文 献

- 1) Qiu, J. (2006) *Nature*, 441, 143-145.
- 2) Herman, J.G., Jen, J., Merlo, A., & Baylin, S.B. (1996) *Cancer Res.*, 56, 722-727.
- 3) Herman, J.G., Merlo, A., Mao, L., Lapidus, R.G., Issa, J.P., Davidson, N.E., Sidransky, D., & Baylin, S.B. (1995) *Cancer Res.*, 55, 4525-4530.
- 4) Ogi, K., Toyota, M., Mita, H., Satoh, A., Kashima, L., Sasaki, Y., Suzuki, H., Akino, K., Nishikawa, N., Noguchi, M., Shinomura, Y., Imai, K., Hiratsuka, H., & Tokino, T. (2005) *Cancer Biol. Ther.*, 4, 773-780.
- 5) Satoh, A., Toyota, M., Itoh, F., Sasaki, Y., Suzuki, H., Ogi, K., Kikuchi, T., Mita, H., Yamashita, T., Kojima, T., Kusano, M., Fujita, M., Hosokawa, M., Endo, T., Tokino, T., & Imai, K. (2003) *Cancer Res.*, 63, 8606-8613.
- 6) Toyota, M., Sasaki, Y., Satoh, A., Ogi, K., Kikuchi, T., Suzuki, H., Mita, H., Tanaka, N., Itoh, F., Issa, J.P., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Imai, K., & Tokino, T. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 100, 7818-7823.
- 7) Toyota, M., Suzuki, H., Yamashita, T., Hirata, K., Imai, K., Tokino, T., & Shinomura, Y. (2009) *Cancer Sci.*, 100, 787-791.
- 8) Esteller, M., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M.A., Watkins, D.N., Issa, J.P., Sidransky, D., Baylin, S.B., & Herman, J.G. (2000) *Cancer Res.*, 60, 2368-2371.
- 9) Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., & Issa, J.P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 96, 8681-8686.
- 10) Sato, H., Suzuki, H., Toyota, M., Nojima, M., Maruyama, R., Sasaki, S., Takagi, H., Sogabe, Y., Sasaki, Y., Idogawa, M., Sonoda, T., Mori, M., Imai, K., Tokino, T., & Shinomura, Y. (2007) *Carcinogenesis*, 28, 2459-2466.
- 11) Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J.G., & Baylin, S.B. (2004) *Nat. Genet.*, 36, 417-422.
- 12) Akino, K., Toyota, M., Suzuki, H., Mita, H., Sasaki, Y., Ohe-Toyota, M., Issa, J.P., Hinoda, Y., Imai, K., & Tokino, T. (2005) *Gastroenterology*, 129, 156-169.
- 13) Suzuki, H., Igarashi, S., Nojima, M., Maruyama, R., Yamamoto, E., Kai, M., Akashi, H., Watanabe, Y., Yamamoto, H., Sasaki, Y., Itoh, F., Imai, K., Sugai, T., Shen, L., Issa, J.P., Shinomura, Y., Tokino, T., & Toyota, M. (2010) *Carcinogenesis*, 31, 342-349.
- 14) Toyota, M., Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., & Tokino, T. (2008) *Cancer Res.*, 68, 4123-4132.
- 15) Esteller, M., Tortola, S., Toyota, M., Capella, G., Peinado, M. A., Baylin, S.B., & Herman, J.G. (2000) *Cancer Res.*, 60, 129-133.
- 16) Suzuki, H., Itoh, F., Toyota, M., Kikuchi, T., Kakiuchi, H., & Imai, K. (2000) *Cancer Res.*, 60, 4353-4357.
- 17) Kawamura, Y.I., Toyota, M., Kawashima, R., Hagiwara, T., Suzuki, H., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., Kannagi, R., & Dohi, T. (2008) *Gastroenterology*, 135, 142-151.
- 18) Yamamoto, E., Toyota, M., Suzuki, H., Kondo, Y., Sanomura, T., Murayama, Y., Ohe-Toyota, M., Maruyama, R., Nojima, M., Ashida, M., Fujii, K., Sasaki, Y., Hayashi, N., Mori, M., Imai, K., Tokino, T., & Shinomura, Y. (2008) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17, 2555-2564.
- 19) Bestor, T.H. (2000) *Hum. Mol. Genet.*, 9, 2395-2402.
- 20) Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., Hernandez, N.S., Chen, X., Ahmed, S., Konishi, K., Hamilton, S.R., & Issa, J.P. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 104, 18654-18659.
- 21) Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., Koh, H., Simms, L., Barker, M., Leggett, B., Levine, J., Kim, M., French, A.J., Thibodeau, S.N., Jass, J., Haile, R., & Laird, P.W. (2006) *Nat. Genet.*, 38, 787-793.
- 22) Wolff, G.L., Kodell, R.L., Moore, S.R., & Cooney, C.A. (1998) *FASEB J.*, 12, 949-957.
- 23) Kamei, Y., Suganami, T., Ehara, T., Kanai, S., Hayashi, K., Yamamoto, Y., Miura, S., Ezaki, O., Okano, M., & Ogawa, Y. (2010) *Obesity (Silver Spring)*, 18, 314-321.
- 24) Chahrouh, M. & Zoghbi, H.Y. (2007) *Neuron*, 56, 422-437.
- 25) Mill, J., Tang, T., Kaminsky, Z., Khare, T., Yazdanpanah, S., Bouchard, L., Jia, P., Assadzadeh, A., Flanagan, J., Schumacher, A., Wang, S.C., & Petronis, A. (2008) *Am. J. Hum. Genet.*, 82, 696-711.
- 26) Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L., & Lander, E.S. (2006) *Cell*, 125, 315-326.
- 27) Ohm, J.E., McGarvey, K.M., Yu, X., Cheng, L., Schuebel, K. E., Cope, L., Mohammad, H.P., Chen, W., Daniel, V.C., Yu, W., Berman, D.M., Jenuwein, T., Pruitt, K., Sharkis, S.J., Watkins, D.N., Herman, J.G., & Baylin, S.B. (2007) *Nat. Genet.*, 39, 237-242.
- 28) Schlesinger, Y., Straussman, R., Keshet, I., Farkash, S., Hecht, M., Zimmerman, J., Eden, E., Yakhini, Z., Ben-Shushan, E., Reubinoff, B.E., Bergman, Y., Simon, I., & Cedar, H. (2007) *Nat. Genet.*, 39, 232-236.
- 29) Widschwendter, M., Fiegl, H., Egle, D., Mueller-Holzner, E., Spizzo, G., Marth, C., Weisenberger, D.J., Campan, M., Young, J., Jacobs, I., & Laird, P.W. (2007) *Nat. Genet.*, 39, 157-158.
- 30) Miyoshi, N., Ishii, H., Nagai, K., Hoshino, H., Mimori, K., Tanaka, F., Nagano, H., Sekimoto, M., Doki, Y., & Mori, M. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 107, 40-45.
- 31) Issa, J.P., Ottaviano, Y.L., Celano, P., Hamilton, S.R., Davidson, N.E., & Baylin, S.B. (1994) *Nat. Genet.*, 7, 536-540.

- 32) Issa, J.P., Ahuja, N., Toyota, M., Bronner, M.P., & Brentnall, T.A. (2001) *Cancer Res.*, **61**, 3573-3577.
- 33) Maekita, T., Nakazawa, K., Mihara, M., Nakajima, T., Yanaoka, K., Iguchi, M., Arii, K., Kaneda, A., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Tamura, G., Saito, D., Sugimura, T., Ichinose, M., & Ushijima, T. (2006) *Clin. Cancer Res.*, **12**, 989-995.
- 34) Lin, R.K., Hsieh, Y.S., Lin, P., Hsu, H.S., Chen, C.Y., Tang, Y.A., Lee, C.F., & Wang, Y.C. (2010) *J. Clin. Invest.*, **120**, 521-532.
- 35) Kaneto, H., Sasaki, S., Yamamoto, H., Itoh, F., Toyota, M., Suzuki, H., Ozeki, I., Iwata, N., Ohmura, T., Satoh, T., Karino, Y., Toyota, J., Satoh, M., Endo, T., Omata, M., & Imai, K. (2001) *Gut*, **48**, 372-377.
- 36) Kusano, M., Toyota, M., Suzuki, H., Akino, K., Aoki, F., Fujita, M., Hosokawa, M., Shinomura, Y., Imai, K., & Tokino, T. (2006) *Cancer*, **106**, 1467-1479.
- 37) Toyota, M., Ho, C., Ahuja, N., Jair, K.W., Li, Q., Ohe-Toyota, M., Baylin, S.B., & Issa, J.P. (1999) *Cancer Res.*, **59**, 2307-2312.
- 38) Akino, K., Toyota, M., Suzuki, H., Imai, T., Maruyama, R., Kusano, M., Nishikawa, N., Watanabe, Y., Sasaki, Y., Abe, T., Yamamoto, E., Tarasawa, I., Sonoda, T., Mori, M., Imai, K., Shinomura, Y., & Tokino, T. (2007) *Cancer Sci.*, **98**, 88-95.
- 39) Obata, T., Toyota, M., Satoh, A., Sasaki, Y., Ogi, K., Akino, K., Suzuki, H., Murai, M., Kikuchi, T., Mita, H., Itoh, F., Issa, J.P., Tokino, T., & Imai, K. (2003) *Clin. Cancer Res.*, **9**, 6410-6418.
- 40) Misawa, A., Inoue, J., Sugino, Y., Hosoi, H., Sugimoto, T., Hosoda, F., Ohki, M., Imoto, I., & Inazawa, J. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 10233-10242.
- 41) Tanaka, K., Imoto, I., Inoue, J., Kozaki, K., Tsuda, H., Shimada, Y., Aiko, S., Yoshizumi, Y., Iwai, T., Kawano, T., & Inazawa, J. (2007) *Oncogene*, **26**, 6456-6468.
- 42) Estecio, M.R., Yan, P.S., Ibrahim, A.E., Tellez, C.S., Shen, L., Huang, T.H., & Issa, J.P. (2007) *Genome Res.*, **17**, 1529-1536.
- 43) Weber, M., Davies, J.J., Wittig, D., Oakeley, E.J., Haase, M., Lam, W.L., & Schubeler, D. (2005) *Nat. Genet.*, **37**, 853-862.
- 44) Ballestar, E., Paz, M.F., Valle, L., Wei, S., Fraga, M.F., Espada, J., Cigudosa, J.C., Huang, T.H., & Esteller, M. (2003) *EMBO J.*, **22**, 6335-6345.
- 45) Serre, D., Lee, B.H., & Ting, A.H. (2010) *Nucleic Acids Res.*, **38**, 391-399.
- 46) Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A.H., Thomson, J.A., Ren, B., & Ecker, J.R. (2009) *Nature*, **462**, 315-322.
-