

DNAメチル化による不活性化遺伝子群の解析（ヒト癌細胞ゲノムでの研究）

Analysis of genes silenced by DNA methylation: An exploration in human cancer genome.

吉川 浩英 (Yoshikawa Hirohide)

(財) 癌研究会・癌研究所 エピジェネシス発がん研究部・部長



研究の概要

RLGS法によって検出された癌特異的な変化を示す42個のDNAをクローニングし、異常DNAメチル化と関連遺伝子の発現抑制を見出した。これらの遺伝子は細胞増殖や浸潤能を抑制する作用を有していた。体細胞におけるDNAメチル化の広汎な変化が癌化に係わる遺伝情報を形成することに大きな影響を与えることが示唆された。

研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

医学／医学一般・人類遺伝学／体細胞遺伝

1. 研究開始当初の背景・動機

DNAメチル化は遺伝子の不活性化と密接に関連していることが知られており、また癌で見られる変化の一つでもある。しかしながら、癌におけるDNAメチル化の解析は散発的なものが殆どであった。本研究ではDNAメチル化の規模と重要性について包括的に検討した。

2. 研究の目的

癌におけるDNAメチル化と遺伝子の不活性化、ならびにその遺伝子機能を解析することによって、体細胞におけるDNAメチル化の広汎な変化が遺伝情報に与える重要性を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

独自に開発した方法によって異常DNAをクローニングし、購入したDNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。次いでジェンバンクサーチによって関連遺伝子を検索した。MSP法によって遺伝子のメチル化状態を、そしてRT-PCR法によって遺伝子発現を調べた。このようにして特定したメチル化不活性化遺伝子をクローニングし、癌細胞に導入またはノックダウンすることによって細胞増殖に対する影響を検討した。さらに、興味を持たれる遺伝子については関連するタンパク質との相互作用を詳しく検討して、新たな発がん経路の解明を行った。

4. 研究の主な成果

目標とした60個のDNA断片のうち42個を特定した。すべてに癌特異的なDNAメチル化の変化を認めた。そのうち38個が遺伝子と関連していた。22個は既報遺伝子であり、18個はメチル化不活性化を受ける新規遺伝子と考えられた。

機能推定可能遺伝子の内訳。シグナル伝達4個、核タンパク10個（転写因子4個を含む）、膜タンパク7個、代謝系2個であった。

10個について関連遺伝子のRNA発現を調べた所、そのすべてに癌特異的な遺伝子不活性化が見出された。

8個について増殖アッセイを行ったところ、これらの遺伝子すべてに細胞増殖抑制作用を検出した。

メチル化不活性化遺伝子の機能解析の例を以下に示す。

JAK/STAT系の抑制因子であるSOCS-1が肝臓癌で不活性化されることを既に報告しているが(Nature Genet. 28, 29-35, 2001)、上記60個のDNA断片のうちの別の一つが同じSOCSファミリーに属するSOCS-3であることを見出した。SOCS-3がSOCS-1と同様にJAK/STAT系を負に制御して癌細胞の増殖を抑制するとともに、

〔4. 研究の主な成果（続き）〕

FAK と直接結合することによって FAK のユビキチン化による分解を促進し、癌細胞の浸潤能を抑制することを明らかにした。

WNT10B が肝細胞において beta-catenin のターゲット遺伝子を活性化することを見出した。これは他の WNT ファミリーと同様に増殖促進作用と考えられた。しかしながら WNT10B は、ある種の肝臓癌で DNA メチル化による不活性化を受けることが判明した。また、不活性化を受けた細胞に WNT10B を導入した所、その増殖を抑制した。この作用は活性型の beta-catenin には見られず、beta-catenin とはインディペンデントな経路を介するものと推察された。興味深いことに、この増殖抑制作用は FGF が存在すると打ち消された。WNT10B は増殖抑制と促進の両作用を有し、癌細胞で FGF と協調することによって増殖を促進するケースと、DNA メチル化によって不活性化されるケースがあると考えられた。

DNA メチル化酵素と結合するタンパク質を新たに見出した。このタンパク質も細胞増殖抑制作用を有しており、癌細胞で DNA メチル化による不活性化を受ける。このタンパク質は顕微鏡下で DNA メチル化酵素と同じ局在を示し、免疫沈降法で強く相互作用することが判明した。さらに、このタンパク質には DNA メチル化酵素の機能を抑制する作用があることを見出した。本研究によって得られた貴重な候補癌抑制遺伝子の機能解析が、DNA メチル化機序の研究に繋がっていると考える。

同定したメチル化 DNA ローカスを癌の診断に利用するための基礎的な方法を開発した。6 個のローカスを用いて肝癌患者の血液を調べた所、癌特異的となるマーカーが見出された。

以上のように、癌における高頻度の DNA メチル化は多くの場合、細胞の増殖や浸潤能を抑制する遺伝子の不活性化を引き起こすと考えられた。このことによって癌化は促進される。体細胞における DNA メチル化は癌細胞で広汎に起こり、その遺伝情報を大きく変化させることによって、細胞増殖の亢進した状態を形成すると考えられた。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

高頻度な DNA メチル化が癌において広汎に生じ、発癌を促進することが判明した。遺伝子機能解析を合わせた DNA メチル化の包括的な解析は殆ど見当たらず、有意義な研究となった。

6. 主な発表論文

（研究代表者は太字、研究分担者には下線）

DNA メチル化と癌。 *Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy*. **Yoshikawa H.** 34, (2) 145-149. 2007. （総説）。

Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, Saiura A, Matsubara K, Kitagawa T, Yamamoto J, Kubo T and **Yoshikawa H.** *Oncogene*. 24, 6406-6417, 2005.

Cell type-specific regulation of the TGF-beta-responsive alpha2(I) collagen gene by CpG methylation. Yamane K, Suzuki H, Ihn H, Kato M, **Yoshikawa H** and Tamaki K. *J Cell Physiol.*, 202, 822-830, 2005.

Apoptotic Speck Protein-like, a highly homologous protein to Apoptotic Speck Protein in the pyrin domain, is silenced by DNA methylation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma. Kubo T, Yamamoto J, Shikauchi Y, Niwa Y, Matsubara K and **Yoshikawa H.** *Cancer Res.*, 64, 5172-5177, 2004.

SOCS-1, a negative regulator of interleukin-6 signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. Galm O, **Yoshikawa H,** Esteller M, Osieka R and Herman JG. *Blood* 101, 2784-2788, 2003.

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/>