

絨毛性疾患における hCG, hPL 遺伝子の Methylation と 遺伝子制御機構に関する研究

神戸大学医学部産科婦人科学教室

房 正規 保科 眞 望月 眞人

A Study on the Role of DNA Methylation within hCG and hPL Genes in Trophoblastic Disease

Masaki BOU, Makoto HOSHINA and Matsuto MOCHIZUKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Kobe University School of Medicine, Kobe

概要 DNA 中のメチル化シトシン量は一般に遺伝子活性と逆相関し、遺伝子制御の中心的役割を担っていると考えられている。そこで妊娠の進行あるいは、腫瘍化に伴う絨毛組織中 DNA のシトシン塩基のメチル化と、遺伝子発現との関連性を推察した。

ヒト妊娠初期、中期、末期絨毛ならびに、胎状奇胎、絨毛癌組織、絨毛癌培養株、白血球より DNA を抽出し各々をヌクレオシドに分解後、HPLC を用いて総 DNA 中のメチル化シトシンを定量した。次にメチル化感受性制限酵素ならびに非感受性制限酵素で DNA を消化後 Southern blotting を行い特定遺伝子 (hCG α , β , hPL) のメチル化を検討した。

その結果、総 DNA 中メチル化シトシン量は妊娠の進行に伴ってわずかに増加していた。hCG α , β ならびに hPL 遺伝子部分においても、妊娠の経過に伴ってメチル化が進行していた。白血球では、絨毛組織に比べメチル化の程度は強かつた。さらに、hCG を多量に分泌する胎状奇胎では hCG α 遺伝子が脱メチル化されていた。

これらの成績より hCG α , β 遺伝子の場合、その遺伝子近傍のメチル化と遺伝子発現がほぼ逆相関すると結論された。一方 hPL ではメチル化と遺伝子発現は相関し、この遺伝子の活性化の機序として脱メチル化以外の機序が考えられた。また hCG α , hPL 遺伝子には、MspI の restriction site についていくつかの polymorphism が新たに明らかとなり、そのいくつかは胎状奇胎に高頻度に出現した。従ってこの polymorphism とトロホプラストの malignant transformation との関連が示唆された。

Synopsis It has been shown that the extent of methylation of cytosine in DNA is inversely correlated with gene expression in many cases. The DNAs extracted from placental tissue, hydatidiform mole and choriocarcinoma tissue were examined to see whether the extent of cytosine methylation is correlated to the gene expression of placental peptide hormones and the transformation of trophoblast.

First of all we measured the amount of methylated cytosine per total DNA with HPLC.

We then examined cytosine methylation in hCG α , β and hPL genes using methylation sensitive (Hha I, Hpa II) and non sensitive (Msp I) restriction enzymes and molecular hybridization.

During pregnancy the total amount of methylated cytosine measured with HPLC increases gradually from 0.72 mol.% at first trimester to 0.92 mol.% at term. The DNA of WBC showed a higher level of methylated cytosine than placental DNA.

The extent of DNA methylation in the peptide hormone genes increases during placental development. Hypomethylation in the hCG α gene was also seen in molar tissue which expresses a high amount of hCG. Therefore it is inversely correlated that gene expression of hCG α , β and the extent of DNA cytosine methylation.

Furthermore some restriction polymorphisms were observed with Msp I in hCG α and hPL genes which might be related to malignant transformation of the trophoblast.

Key words: Gene expression • 5-methyl cytosine • Trophoblastic disease • Human chorionic gonadotropin (hCG) • Human placental lactogen (hPL)

緒 言

トロホプラストで産生、分泌される代表的胎盤

タンパクホルモンとして hCG: human chorionic gonadotropin と hPL: human placental

lactogen がある。正常妊婦血中の hCG レベルは妊娠初期にピークを持つのに対し、hPL は末期に向かつて増加し、両者の血中レベルは対照的な動態を示す。また胎状奇胎、絨毛癌では hCG が大量に産生分泌されるが、hPL は、特に絨毛癌の場合ほとんど産生されない¹⁰⁾。従つて、これらのホルモンの遺伝子発現は異なつた制御を受けていると考えられる。

ところで、DNA 構成塩基であるシトシンの 5 位のカーボンがメチル化した、メチル化シトシン (5-methyl cytosine: mC) は、一般に構造遺伝子の上流にある調節遺伝子部分に多く存在し、遺伝子制御の中心的役割を担つていて考えられている。そこで DNA シトシン塩基のメチル化に着目し、正常妊娠絨毛組織、胎状奇胎、絨毛癌組織及び対照としての白血球より DNA を抽出し、まず、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) により総 DNA 中の mC 量を測定した。次に、各々の DNA 中の hCG α , β , hPL 各遺伝子近傍のシトシン塩基のメチル化を各遺伝子に対応する相補性 DNA と制限酵素を用いて検討し、遺伝子発現とシトシン塩基のメチル化との関係を DNA レベルで解析した。

実験材料ならびに実験方法

1. DNA の抽出と材料

DNA は、治療的流産ならびに、分娩時に得た、妊娠初期絨毛組織 (FT)、中期絨毛組織 (MT)、末期絨毛組織 (TP) 及び、胎状奇胎 (Mole)、絨毛癌組織 (摘出組織; Cho, 培養株; JAR)、ヒト白血球 (WBC) より phenol chloroform 法で抽出した⁹⁾。

2. HPLC 用 sample の調製

抽出した DNA 100 μ g を DNase I (40 μ g/ml) で、37 $^{\circ}$ C 18 時間消化した。次に NaAc pH 5.2 を加えた後、Nuclease PI (50 μ g/ml) で、37 $^{\circ}$ C 7 時間消化した。さらに、alkaline phosphatase を加える事によりヌクレオシドとした⁸⁾。

3. HPLC 溶出条件

HPLC 分析の溶出バッファーとして A 液には 2.5% メタノール, 0.01mol. リン酸ナトリウム pH 5.3 を、B 液には 10% メタノール, 0.01mol. リン

酸ナトリウム pH 5.1 を用い、M & S, GYLSON 社製 HPLC で分析した。column は MS pack C18, 4.6 $\times$ 150mm を用いた。

分離溶出したヌクレオシドは 260nm の吸光度を測定し、クロマトコーダーで定量分析することによつて、総 DNA 中の mC が占める割合ならびに塩基組成を検討した⁸⁾。

4. 相補性 DNA (cDNA) の調製

hCG α , hCG β , hPL 各遺伝子の検出に用いた cDNA は、ワシントン大学の I. Boime 博士より供与されたものである。これらは、mRNA を胎盤より抽出し、pBR322 にクローン化したものである。なお使用した cDNA は各々、440, 474, 500bp の DNA 鎖である。

5. DNA の制限酵素処理、寒天ゲル電気泳動ならびに Southern blotting

制限酵素 Hha I は GCGC, Hpa II は CCGG の四つの特定 DNA 塩基配列を認識しこれを切断する酵素であり、両者は 2 番目のシトシンがメチル化されると働かない。一方、Msp I は Hpa II と同様 CCGG の塩基配列を認識するが、シトシンのメチル化の有無にかかわらず作用する。各 DNA 10 μ g をこれらの制限酵素で消化し、1% 寒天, 1 $\times$ TBE (Trismabase, bolic acid, EDTA) 水平ゲル中で、1 $\times$ TBE を泳動緩衝液として電気泳動し DNA を分離した。泳動後、Southern blotting 法によりゲル内 DNA をナイトロセルロースフィルターに移行した⁹⁾。

6. nick translation と hybridization

cDNA の³²P による標識は、DNase I, DNA polymerase を用いた nick translation によつて行つた (specific activity 2 $\sim$ 5 $\times$ 10⁸dpm/ μ g)。フィルターを prehybridization した後、鮭精子 DNA を加えて 50 μ g/ml とし、さらに³²P 標識相補性 DNA (hCG α , hCG β , hPL cDNA) を加えて 65 $^{\circ}$ C で 12 時間 hybridization させた⁹⁾。フィルターを洗浄後、オートラジオグラフィーを作成した。メチル化の有無により DNA の切断部位が変化し、これらの特定遺伝子のゲル上での泳動距離に差異が生じることを用いて特定遺伝子のメチル化の程度を検討した。

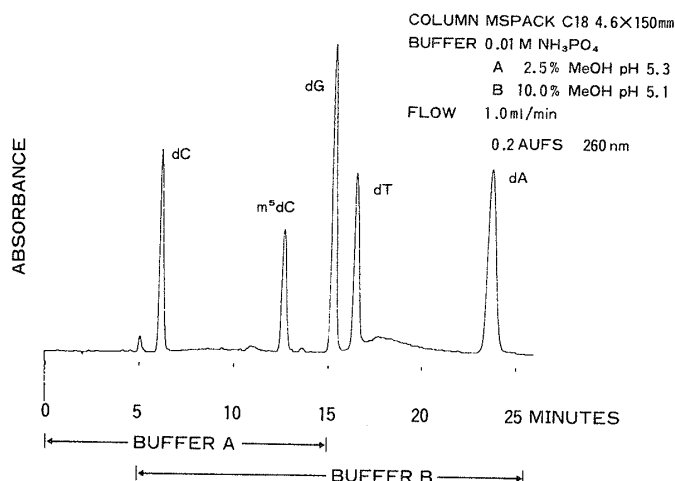


図1 本文に示された HPLC 溶出条件で描かれた standard ヌクレオシドの溶出パターン。

研究成績

1. HPLC による成績

HPLC で溶出したサンプルのピークが、各々の塩基に該当するかを同定ならびに定量化するために、既知の各ヌクレオシドを1マイクロモルずつ同時に HPLC を用いて分離した。ヌクレオシドは、デオキシシチジン、5メチルデオキシシチジン、デオキシグアノシン、チミジン、デオキシアデノシンの順に、明瞭に分離された(図1)。総DNAに占めるmC量(mol.%)は、FT: 0.72(n=2), MT: 0.78(n=4), TP: 0.92(n=3), WBC: 1.03(n=3)であつた。なお、他の塩基組成は著変を示さなかつた。

2. Southern blotting による成績

1) 正常絨毛

図2は、初期、末期絨毛の、hCG α 遺伝子部分について検討した成績である。制限酵素 Hpa II の消化では TP DNA は約20kbの single band として泳動されており、一方 FT は約10kbであつた。制限酵素 Msp I の消化では、3~4のバンドが観察された。

hCG β 遺伝子については、明瞭なバンドの形成は認められず、スミア状となつた(データは示されていない)。

図3は hPL 遺伝子についての成績である。Msp I 消化と比較して、Hpa II 消化では泳動距離は短かつた。Hpa II 消化での FT と TP では TP が短く

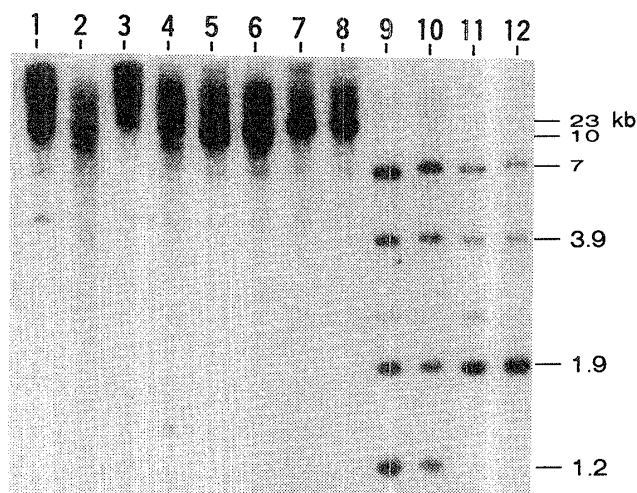


図2 ヒト絨毛組織より抽出した DNA と hCG α cDNA との filter hybridization.

lane, 1, 2, 5, 6, 9, 10は妊娠初期絨毛(FT), lane, 3, 4, 7, 8, 11, 12は末期絨毛(TP)である。lane, 1~4は制限酵素 Hha I, lane, 5~8は制限酵素 Hpa II, lane, 9~12は制限酵素 Msp I を用いて消化した。

lane, 7, 8の TP DNA は約20kbとして、また lane, 5, 6の FT DNA は約10kbとして泳動されている。これは TP DNA の Hpa II 認識部位がメチル化され、DNA が切断されにくくなっているためである。lane, 9, 10, 11, 12の Msp I 消化で、hCG α 遺伝子近傍に3~4カ所の Msp I 認識部位があることがわかる。Hpa II での消化で FT (lane, 5, 6) が single band であつたことから FT DNA の場合でもすでにメチル化されている。lane, 11, 12は、1.2kbのバンドが消失していることから hCG α 遺伝子には、Msp I の restriction site について R.F.L.P.s が存在することが明らかである。

なお Hha I 消化では、大きなバンドとして泳動されることから、どの DNA の場合にもこの認識部位について著しいメチル化が生じているといえる。

泳動された。

2) 絨毛性疾患

絨毛癌については、摘出組織の1例: Cho と、培養株1例: JAR につき検討した。Cho は DNA の量が少なかつたため十分な結果が得られなかつた。JAR DNA では hCG α 近傍の4カ所の Msp I 認識部位が認められた(データは示されていない)。

WBC DNA の場合は FT DNA に比べて、泳動距離がさらに短かつた。Mole DNA は FT DNA に比べて、泳動距離が長く、塩基対の小さいフラ

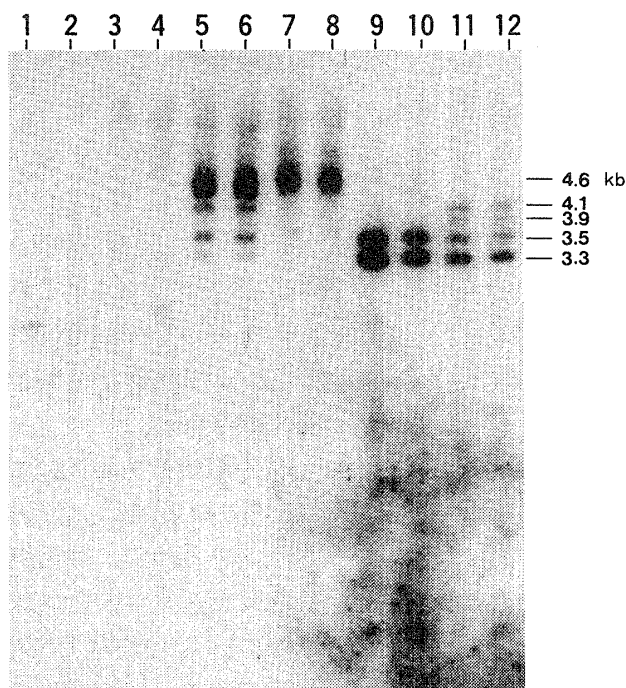


図3 ヒト絨毛組織より抽出したDNAとhPL cDNAとのfilter hybridization.

DNAと制限酵素の配列は図2と同様である。

lane, 9, 10で見られる3.3と3.5kbのバンドは, lane, 5, 6でより大きなバンド(4.6, 4.1, 3.9, 3.5 kb)として観察され, この部位にメチル化が生じていることを示している。

グメントが認められた, また Mole DNA に1.2kbのバンドが消失しているものが見られたが, TP DNA に認められた Restriction Fragment Length Polymorphisms (R.F.L.Ps) と同一のものであった(図4)。図4の Mole DNA では, hCG α 近傍に約4kbの数個のバンドが認められ, 正常絨毛DNAがsingle bandに泳動されるのとは対照的であった。

絨毛性疾患における, hPL 遺伝子近傍のメチル化を観察したところ, 胎状奇胎では Msp I 消化で, 正常絨毛では認められない, 2.5, 2.2, 1.8, 0.4kbのより短いバンドが検出された(図5)。しかも, Hpa II 消化でも正常DNAに比べてより小さなバンドに分離された。一方 Hpa II 消化で FT DNA は4.6kbであるのに対し WBC DNA の場合さらに泳動距離が短かった。

考 察

トロホプラストで産生, 分泌される胎盤タンパクホルモンである hCG と hPL の主たる産生部位

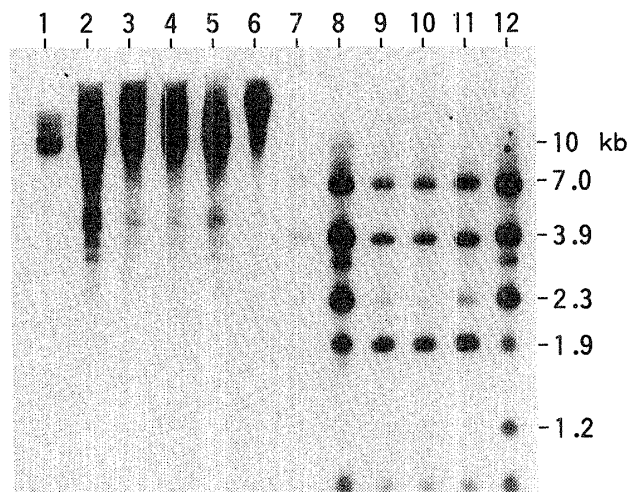


図4 ヒト絨毛, 胎状奇胎組織, 白血球より抽出したDNAとhCG α cDNAとのfilter hybridization.

lane, 1, 7は妊娠初期絨毛, lane, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11は胎状奇胎, lane, 6, 12は白血球である。lane, 1~6は制限酵素 Hpa II, lane, 7~12は制限酵素 Msp I を用いて消化した。

Hpa II 消化で FT DNA では10kbとして泳動される (lane, 1)。WBC DNA の場合さらに泳動距離が短い (lane, 6) ことから, FT DNA よりさらに, WBC DNA がメチル化されていると考えられる。Mole DNA は Hpa II 消化で FT DNA に比べて, はるかに泳動距離が長く塩基対が小さいフラグメントが認められる (lane, 2, 3, 4, 5)。

は, 各々の mRNA の局在部位から, 合体細胞であることがすでに知られている⁹⁾。これらのホルモンの正常妊婦血中でのレベルは hCG は妊娠初期にピークを持つのに対し, hPL は末期に向かって増加する。

また胎状奇胎, 絨毛癌では hCG は大量に産生分泌されるが, hPL は, 特に絨毛癌の場合ほとんど産生されない¹⁰⁾。この場合, 絨毛癌組織中の hPL mRNA を in situ hybridization により観察すると, hPL mRNA の発現はほとんど認められず, hPL 遺伝子の発現が, 転写レベルより以前の段階で抑制されていることがわかる¹¹⁾。ところが, hPL mRNA をほとんど発現しない絨毛癌の DNA を分析してみると通常の制限酵素分析に関するかぎり, 正常 hPL 遺伝子とほぼ同一の hPL 構造遺伝子があり, 従って絨毛癌の場合では, この hPL の構造遺伝子ではなく, その遺伝子の発現を調節する調節遺伝子領域に何らかの変化が生じ

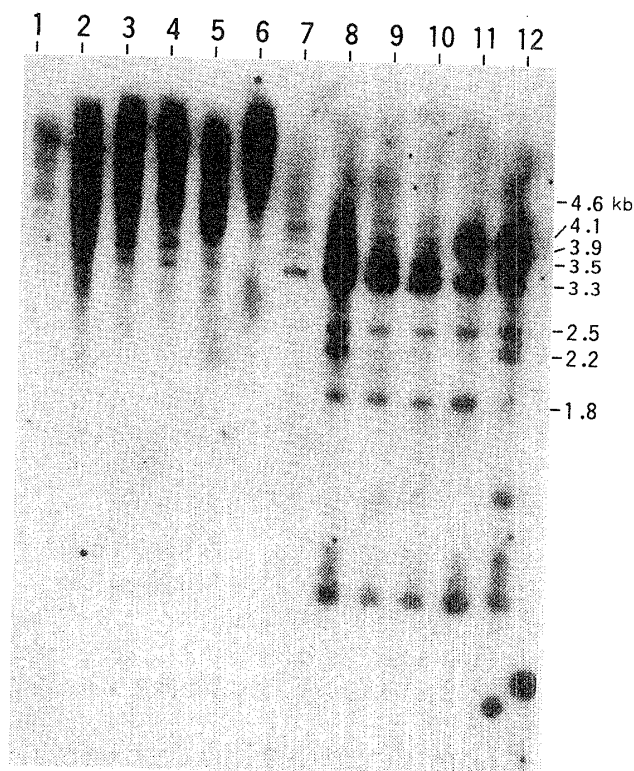


図5 ヒト絨毛, 胞状奇胎組織, 白血球より抽出した DNA と hPL cDNA との filter hybridization.

DNA と制限酵素の配列は図4と同様である。

Hpa II 消化で FT DNA は 4.6kb (lane, 1) であり WBC DNA の場合さらに泳動距離が短い (lane, 6). Msp I 消化の Mole DNA (lane, 8, 9, 10, 11) で 2.5, 2.2, 1.8, 0.4kb のより短いバンドが検出された。また, Hpa II 消化でも (lane, 2, 3, 4, 5) 正常では認められない 3.5, 3.3kb のバンドを認め, この部位での脱メチル化が生じていることを示している。

で遺伝子が発現されないものと推察される⁶⁾。

一方, hCG を大量に産生する絨毛癌 hCG α ならびに β の遺伝子の場合にもこれらの構造遺伝子には著変が生じていない。つまりトロホプラストにおけるこれら二つのホルモンの遺伝子発現は DNA の構造遺伝子よりもその上流にある調節遺伝子領域で, しかもお互いに独立した形で制御されていると推測される。

ところで mC は高等生物では唯一の修飾塩基であり, シトシンの 5 位のカーボンが, メチル化したものであるが, 一般に遺伝子上流の調節遺伝子部分に多く存在し, しかもこの部分に集中的に存在するシトシンとグアニンの連続配列に現れることが多い。シトシンのメチル化は DNA の高次

構造ならびに酵素等との相互作用に大きな影響を与えることが知られている。mC では, メチル基が DNA の二重らせんの溝に飛び出した形になり, この結果多くのタンパク質と DNA との結合能が変化する¹³⁾。さらに, シトシンのメチル化により, 通常とは逆巻きの, 左巻きらせんである Z-DNA が生じやすくなることが報告されている³⁾。これらの報告から, シトシンのメチル化は hCG や hPL 遺伝子発現の調節機構として重要な役割を担っているのではないかと推察される。

そこで, HPLC を用いて絨毛組織中総 DNA に占める総 mC 量を検討した。その結果, mC は妊娠の進行に伴いわずかに増加しているので, 絨毛組織の aging との関係が示唆された。また, 白血球 DNA で mC が高値であったことは, 白血球 DNA では多くの遺伝子が不活性であることに関係しているように思われる。

ところで, HPLC で観察されたメチル化の所見は総 DNA 中の変化であり各遺伝子の変化ではない。そこで次のステップとして, 各ホルモンの特定遺伝子部分のメチル化について, 各々の遺伝子に対応する cDNA を用いて検討した。

hCG α 遺伝子は, 図2のごとく正常妊娠末期絨毛 DNA のほうが妊娠初期絨毛 DNA に比較してよりメチル化されていると考えられた。つまりこの遺伝子のメチル化の進行に伴って hCG α の遺伝子発現が抑制されたといえる。

また hCG α 遺伝子近傍に制限酵素 EcoRI と Hind III についての R.F.L.Ps がすでに Hoshina et al. によつて報告され, 絨毛癌の発症との関連性が示唆されているが⁷⁾, 更に Msp I 消化についても 1.2kb と 1.9kb のバンドの有無についての R.F.L.Ps が新たに見出された。最近, 教室の Otani et al. によつて, 前述の R.F.L.Ps は, hCG α 遺伝子の 3' 末端部分に存在する 1 塩基対のみの変異によつて引き起こされる, いわゆる点突然変異に帰因するものと結論されている¹¹⁾。この変異は直接絨毛の発癌を誘導するとは思われないものの, 絨毛癌発癌遺伝子の活性化との関連が強く示唆される。

hCG β 遺伝子近傍については, 明瞭なバンドの

形成は認められなかつた。この現象はおそらく haploid としての染色体上に 6 個の hCG β 遺伝子が存在するため¹²⁾制限酵素処理でさまざまな大きさのフラグメントに分断されたからであろうと推察される。しかし Hpa II 消化と Msp I 消化の比較により、この遺伝子のメチル化は末期に向かい進行していると考えられた。すなわち、hCG β の遺伝子発現とその遺伝子のメチル化は hCG α の場合と同様逆相関しているといえる。

他方、hPL 遺伝子近傍では妊娠初期、末期絨毛ともにメチル化が既に認められ、しかも末期に向かいメチル化はより進行している。従つて hPL の場合は hCG α , β とは異なり遺伝子のメチル化と hPL の発現が相関しているといえる。このことは hPL 遺伝子発現が脱メチル化以外の他のメカニズムを介して調節されている可能性を示唆する。

ところで癌細胞 DNA 中の mC 含有量は、正常細胞の半分ぐらいであるという報告がある⁴⁾。Holliday は、DNA の複製速度と、損傷を受けた DNA の修復速度との相違が、脱メチル化を促進するという⁵⁾。脱メチル化の部位が不活性化された癌遺伝子の近位に位置した場合、特定あるいは一連の癌遺伝子の活性化とこれにつづく細胞の癌化が生じると考えられる²⁾。

そこで、絨毛性疾患について、各遺伝子近傍のシトシン塩基のメチル化を同様の方法で検討した。5 例の胎状奇胎 DNA について hCG α 遺伝子近傍の変化を観察すると Msp I 消化で正常 DNA には認められない 0.5kb のバンドが出現し、しかも Hpa II 消化で 4kb 付近に 3～4 本のバンドが観察された(図 4)。このことは、hCG α 遺伝子近傍に CCGG の DNA 配列が増加し、しかもそれらの部位のメチル化が低下していることを示しており、正常絨毛 DNA のこれらの部位がすべてメチル化されていたのとは対照的であつた。これは胎状奇胎における hCG レベルの上昇と関連するものと考えられる。さらに、これらの胎状奇胎のうち 1 例は存続絨毛症へ移行した。つまり胎状奇胎におけるシトシン塩基の脱メチル化と hCG α 遺伝子の発現あるいは、トロホブラストの malignant transformation との関連性が強く示唆され

た。

胎状奇胎における hPL 遺伝子近傍にも著明な変化が観察された(図 5)。胎状奇胎 DNA の Msp I 消化では正常絨毛 DNA に認められない、2.5, 2.2, 1.8, 0.4kb の多数のバンドが認められた(R.F.L.Ps)。しかも Hpa II 消化で正常 DNA に比べてより小さなバンドとして泳動されている。つまり、これらの部位に CCGG 配列が 3～4 カ所増加し(R.F.L.Ps)しかも、メチル化が低下していることを示している。

今回の研究で、hCG α , β については DNA シトシン塩基のメチル化とそれらの遺伝子発現は逆相関することが明らかとなつた。一方、hPL の遺伝子発現とメチル化は相関し、hPL については脱メチル化以外の遺伝子発現のメカニズムの関与が示された。また、胎状奇胎では hCG α ならびに hPL 遺伝子近傍の脱メチル化が明らかとなつたが、さらに hPL 遺伝子近傍に見出された DNA 配列の変化は胎状奇胎における hPL 遺伝子発現の抑制と密接な関連を持つものと考えられる。しかし、絨毛癌培養株より抽出した DNA に、このような変化が観察されなかつたことは、トロホブラストの malignant transformation にとつてこの変化が必須の条件ではなく、ある種の癌遺伝子がさらに関与しているものと考えられる。従つて、絨毛性疾患における各種癌遺伝子の発現態度は興味ある課題として今後の検討が待たれる。

この研究に御協力いただいた西尾明彦、岡村昌幸両先生に感謝致します。

本論文の要旨の一部は、第37回日本産科婦人科学会学術講演会において発表した。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(課題番号一般 B-60480368, 一般 C-61570795, 61570796, 62570758, 62570756)によるものである。

文 献

1. 保科 眞, アーピング・ボイメ, 望月真人: 分子生物学的手法による hPL, ならびに hCG(α , β) mRNA の絨毛組織内分泌。日産婦誌, 36: 397, 1984.
2. 佐野 浩: DNA のメチル化—その生物学的機能。細胞工学, 2: 1493, 1983.
3. Behe, M. and Felsenfeld, G.: Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: The B-Z

- transition in poly (dG-m⁵ dC) • poly (dG-m⁵ dC).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78 : 1619, 1981.
4. *Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. :* Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301 : 89, 1983.
 5. *Holliday, R. :* A new theory of carcinogenesis. *Br. J. Cancer*, 40 : 513, 1979.
 6. *Hoshina, M., Boothby, M. and Boime, I. :* Cytological localization of chorionic gonadotropin α and placental lactogen mRNAs during development of the human placenta. *J. Cell Biol.*, 93 : 190, 1982.
 7. *Hoshina, M., Boothby, M., Hussa, R.D., Pattilo, R.A., Camel, H.M. and Boime, I. :* Segregation patterns of polymorphic restriction sites of the hCG α gene in trophoblastic disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 81 : 2504, 1984.
 8. *Kuo, K.C., McCune, R.A. and Gehrke, C. :* Quantitative reverse-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucleic Acids Res.*, 8 : 4763, 1980.
 9. *Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. :* In molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
 10. *Mochizuki, M., Morikawa, H., Kawaguchi, K. and Tojo, S. :* Growth hormone, prolactin and chorionic somatomammotropin in normal and molar pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 43 : 614, 1976.
 11. *Otani, T. and Boime, I. :* Structural analysis of the polymorphic 3' region of the human chorionic gonadotropin- α gene in normal placenta and choriocarcinoma cells. *Endocrinology*, 119 : 2124, 1986.
 12. *Policastro, P., Ovitt, C.E., Hoshina, M., Fukuo-ka, H., Boothby, M. and Boime, I. :* The beta subunit of chorionic gonadotropin is encoded by multiple genes. *J. Biol. Chem.*, 19 : 11492, 1983.
 13. *Razin, A. and Riggs, A.D. :* DNA methylation and gene function. *Science*, 210 : 604, 1980.
(No. 6228 昭62・8・10受付)