
トピックス

ビタミンCはエピジェネティクスによる制御を介して白血病の発症を防ぐ**Vitamin C prevents leukemogenesis via epigenetic regulation**

エピジェネティクスは、「DNA塩基配列の変化を伴わない細胞分裂後も継承される遺伝子発現あるいは細胞表現型の変化を研究する学問領域」と定義される。このエピジェネティクス研究の代表的な機構としてDNAメチル化がある。DNAメチル化は、シトシンとグアニンがホスホジエステル結合した状態でシトシンの炭素5位がメチル化され、メチル化シトシンが生成する反応である。一般的にDNAがメチル化されると転写因子が結合できず、遺伝子発現が抑制される。一方、DNAが脱メチル化されると転写抑制が解除されるように、DNAのメチル化と脱メチル化という化学修飾が遺伝子発現の制御に関与している。このDNAメチル化による遺伝子発現の制御は、細胞の分化や初期化、疾患の発症などに関与することが明らかになってきており、現在盛んに研究が行われている¹⁾。2009年にTahilianiら²⁾は、ten-eleven translocation (Tet)と呼ばれるタンパク質にメチル化シトシンを脱メチル化する酵素活性があることを発見した。Tetは、補因子として二価鉄、2-オキソグルタル酸に加えてビタミンC (VC)を必要とし、メチル化シトシンの炭素5位を酸化して5-ヒドロキシメチルシトシンを生成する反応を触媒する(図1)。次いで、5-ヒドロキシメチルシトシンは、同様にTetにより5-ホルミルシトシン、5-カルボキシシトシンと変換される³⁾。この5-ホルミルシトシンおよび5-カルボキシシトシンはDNA修復機構のひとつである塩基除去修復の標的となっている。したがって、Tetにより生成した5-ホルミルシトシンおよび5-カルボキシシトシンはDNAから除去され、新たに未修飾のシトシンが結合することでシトシンの脱メチル化が完結する⁴⁾⁵⁾。Tetには、現在までのところ3種類のアイソフォーム (Tet1, Tet2, Tet3)が知られている¹⁾。このDNA脱メチル化酵素Tetの補因子としてVCが必要であることが明らかにされたことから、VCがエピジェネティックな制御を介して遺伝子発現を調節していることがわかってきた。なお、TetとVCの関連性については以前本誌トピックスに詳細が掲載され

ているので、そちらをご参照頂きたい⁶⁾。

2017年、Agathocleousら⁷⁾とCimminoら⁸⁾の研究グループはそれぞれ独自にVCがTetの補因子であることに着目し、VCがTet2を介して造血幹細胞を正常に保つことで白血病の発症を抑制することを明らかにした(図1)。血液に含まれる細胞は、全て自己増殖能と多分化能を有する造血幹細胞から、分化能は維持するが自己増殖能を持たない多能性前駆細胞を経て、赤血球やリンパ球などの様々な血球系細胞へと分化する。白血病は、この造血幹細胞および多能性前駆細胞の遺伝子に変異が起こり分化異常と無秩序な増殖能を獲得した疾患と考えられており、白血病発症の特徴のひとつとしてTet2遺伝子の変異による不活性化が知られている⁹⁾。すなわち、VCが欠乏すると造血幹細胞が過剰な増殖を引き起こし白血病発症につながるが、VCは造血幹細胞が無秩序な状態にならないようにTet2を介してコントロールしていることが明らかにされた(図1)。これらの研究内容は、2017年にNature誌とCell誌にほぼ同時期に掲載された。そこで本稿では、この2報の研究概要を紹介する。

近年、メタボローム解析と呼ばれる生体内の代謝産物の網羅的解析が盛んに行われている。しかし、メタボローム解析には通常数百万個の細胞が必要となる。したがって、幹細胞に代表される生体内に極めて僅かにしか存在しない細胞の代謝産物を網羅的に解析するのは困難だった。Agathocleousら⁷⁾は、フローサイトメトリーで目的とする細胞集団を分取後にLC-MS/MSを組み合わせることでこの問題を克服し、約10,000個の細胞から代謝産物の網羅的解析を可能にした。彼らはこの手法を用いて、造血幹細胞および多能性前駆細胞の細胞集団と分化が進んだ様々な血球系細胞との間で代謝産物の比較を行った。その結果、造血幹細胞および多能性前駆細胞の細胞集団のVC含量は、骨髄系共通前駆細胞、巨核球/赤芽球前駆細胞、顆粒球/マクロファージ前駆細胞、B細胞などの血球系細胞と比較して2~20倍高く、分化が進むにつれて減少する

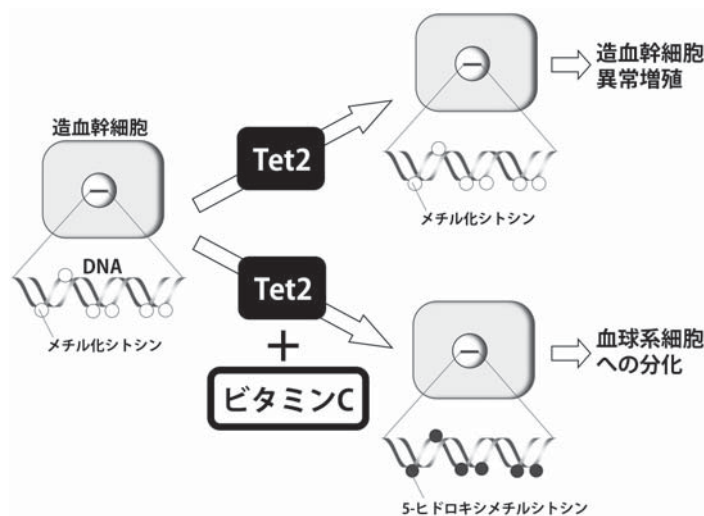


図1 ビタミンCが造血幹細胞に及ぼす影響

Tet2は、補因子として二価鉄、2-オキソグルタル酸に加えてVCを必要とする。細胞内にVCが存在すると、メチル化シトシンのメチル基が酸化されて5-ヒドロキシメチルシトシンとなる。そして、赤血球やB細胞などの血球系細胞へと分化する。しかし、VCが欠乏すると、5-ヒドロキシメチルシトシンが減少し、造血幹細胞の過剰な自己複製が起こり、その結果として白血病を発症する。

ことがわかった。なお、測定した代謝産物の中には他のビタミンとしてNAD、パントテン酸、ニコチンアミドの代謝産物であるN¹-メチルニコチンアミドなどが含まれていたが、造血幹細胞および多能性前駆細胞に顕著な変化が認められたのはVCのみであった。次に、VCを特異的に細胞内に輸送するナトリウム依存性VCトランスポーター2 (SVCT2)の遺伝子発現量が測定された。その結果、SVCT2遺伝子発現量はVC含量と同様に造血幹細胞および多能性前駆細胞の細胞集団で最も高いが、さらに分化が進むにつれて減少することがわかった。また、VCの輸送に関与する別のアイソフォームであるSVCT1およびVC合成の最終段階を触媒するL-グルノ-γ-ラクトン酸化酵素(遺伝子名: *gulo*)は血球系では発現していない¹⁰⁾。しかし、VC濃度とSVCT2遺伝子発現量に高い相関性が認められたことから、造血幹細胞や多能性前駆細胞などの未分化な細胞はSVCT2を発現することでVCを細胞内に高濃度保持すると考えられた。

次に、Agathocleousら⁷⁾は、何故VCが造血幹細胞で高濃度存在するのかを明らかにするため、VCを合成できない*gulo*^{-/-}マウスをVC欠乏状態にして骨髄および脾臓中の造血幹細胞数を調べた。その結果、*gulo*^{-/-}マウスは、VCを合成できる*gulo*^{+/+}マウスと比較して造血幹細胞数が有意に増加していた。また、致死量の放射線を照射して造血能を失わせたマウスの骨

髄に*gulo*^{-/-}マウス由来の骨髄細胞を移植した結果、*gulo*^{+/+}マウス由来の骨髄細胞を移植した場合と比較して骨髄系細胞やリンパ系細胞が血中に認められた。これは骨髄中の造血幹細胞がVC欠乏になると増殖と分化が促進されることを意味している。このように、VCには造血幹細胞の細胞数と機能を調節する役割があることがわかった。

次に、Agathocleousら⁷⁾はVCによる造血幹細胞の機能調節にTet2が関与しているかを明らかにするために、*gulo*^{-/-}マウスの各血球系細胞の5-ヒドロキシメチルシトシンの割合を解析した。その結果、*gulo*^{-/-}マウスの5-ヒドロキシメチルシトシンの割合は、野生型マウスと比較して造血幹細胞、多能性前駆細胞など測定したすべての細胞で有意な減少が認められた。同様に、Tet2遺伝子を骨髄、脾臓、胸腺などの造血器特異的に欠損させたTet2^{ΔΔ}マウスでも有意な減少が認められた。一方、*gulo*遺伝子とTet2遺伝子を両方欠損した*gulo*^{-/-}; Tet2^{ΔΔ}マウスの5-ヒドロキシメチルシトシンの割合はTet2^{ΔΔ}マウスと比較して減少傾向にあったが、その割合に両マウスの間で有意差は認められなかった。このことから、造血幹細胞における5-ヒドロキシメチルシトシンの生成反応の多くはTet2が担っていると考えられた。また、*gulo*^{-/-}マウスにVCを与えると5-ヒドロキシメチルシトシンの割合に加えて、造血幹細胞数が野生型マウスと同程度に回復したことか

らも、VCは主にTet2を介して造血幹細胞の機能調節を行っていることがわかった。

急性骨髄性白血病は、Tet2遺伝子の変異による不活性化とFlt3^{ITD}変異と呼ばれる細胞増殖に関与するタンパク質を恒常的に活性化してしまう変異が共に働くことで、発症が促進することが知られている¹¹⁾。このFlt3^{ITD}変異は、急性骨髄性白血病患者の約30%に認められるなど、患者の生命予後にとって極めて重要な変異である¹¹⁾。そこで、Agathocleousら⁷⁾は、VC欠乏でもFlt3^{ITD}変異と協調して白血病発症を促進するかを調べるため、Flt3^{ITD}変異した骨髄細胞を野生型マウスおよびgulo^{-/-}マウスの骨髄に移植し、造血能を測定した。その結果、Flt3^{ITD}が変異した骨髄細胞をgulo^{-/-}マウスの骨髄に移植することで、血中に骨髄系細胞やB細胞、骨髄中に骨髄系共通前駆細胞、巨核球/赤芽球前駆細胞、顆粒球/マクロファージ前駆細胞などの血球系細胞の有意な増加が認められた。このように、VC欠乏でもFlt3^{ITD}変異と協調して増殖を促進することがわかった。

さらに、Agathocleousら⁷⁾はTet2の不活化とFlt3^{ITD}の恒常的活性化という二つの変異を有した骨髄細胞をgulo^{+/+}マウスおよびgulo^{-/-}マウスに移植して、急性骨髄性白血病のマウスモデルを作成した。その結果、VCが欠乏したgulo^{-/-}マウスでは通常血中には存在しない骨髄芽球が検出され、そのマウスのすべてが移植後50日以内に死亡した。一方、同様の細胞をgulo^{+/+}マウスに移植しても少なくとも、300日はそのマウスは生存していた。また、Tet2遺伝子の片方を変異させた細胞(Tet2^{Δ+})をVCが欠乏したgulo^{-/-}マウスに移植した場合よりTet2遺伝子を完全に欠損した細胞(Tet2^{ΔΔ})をgulo^{-/-}マウスに移植した場合の方が早く死亡したことから、VC欠乏はTet2の機能低下を介して急性骨髄性白血病の発症を促進することがわかった。さらに、Agathocleousら⁷⁾はgulo^{-/-}マウスにTet2の不活化とFlt3^{ITD}が変異した細胞を移植して急性骨髄性白血病を発症させ、100 mg/LのVCを含有する飲料水を摂取させた。その結果、このマウスでは生存期間が有意に延長し、血中の骨髄芽球がほとんど検出されなくなることが明らかとなった。以上のように、Agathocleousら⁷⁾はgulo^{-/-}マウスを用い、VCがTet2の機能維持を介して白血病発症を抑制していることを明らかにした。

一方、Cimminoら⁸⁾はAgathocleousら⁷⁾とは異なるアプローチにより、VCが造血幹細胞の正常な機能維持に寄与して白血病発症を防いでいることを明らかにした。Cimminoら⁸⁾は、初めにTet2遺伝子の発現量を可逆的に調節できるトランスジェニックマウスを作出

し、Tet2遺伝子の発現が低下すると造血幹細胞が異常な自己増殖と過剰なDNAメチル化を引き起こすが、Tet2遺伝子の発現量を回復させることで造血幹細胞が正常化し、分化が進んだ細胞に認められる遺伝子の発現量が増加することを示した。次に、Cimminoら⁸⁾はVCを投与することでTetの酵素活性の増加を促し、Tet2遺伝子の発現が低下した造血幹細胞でもTet2遺伝子を回復させたのと同様の効果が得られるのではないかと考え、Tet2遺伝子を欠損させたTet2^{-/-}マウスから造血幹細胞を単離し、VCを添加してその造血幹細胞を培養した。すると、VCを添加していない造血幹細胞と比較して、VCを添加した造血幹細胞では5-ヒドロキシメチルシトシンが2倍に増加し、細胞の異常増殖も有意に抑制された。しかし、VC投与により完全に異常増殖が抑制されたわけではなかった。造血幹細胞ではTet2遺伝子に加えてTet3遺伝子が発現していることに着目し¹²⁾、Cimminoら⁸⁾はTet2欠損とTet3遺伝子の発現を抑制させた造血幹細胞で増殖能を調べた。その結果、VC投与による異常増殖抑制効果が打ち消されていることがわかった。これは、VCがTet2とTet3の活性を増強させることで、造血幹細胞の過剰な自己増殖を抑制していることを示している。さらに、Cimminoら⁸⁾はTet2^{-/-}マウスが生体内でVCを合成できるともかかわらず白血病を発症することから、Tetの酵素活性を増強させるには生体内で合成できるVC量では不足であると考えた。そこで、野生型マウスに大量のVCが腹腔内に単回投与(4 g/kg体重)された。その結果、末梢血中の5-ヒドロキシメチルシトシン含量は投与2時間後には投与前の2倍に増加し、その効果は2~6時間維持されることが確認された。さらに、Tet2遺伝子を欠損した骨髄細胞を移植し、白血球数の増加など慢性骨髄性白血病様の症状を呈した野生型マウスに4 g/kg体重のVCが週5回、腹腔内投与されると、末梢血中の白血球数や骨髄系細胞などの増加が抑制された。また、急性骨髄性白血病患者より単離したTet2遺伝子の変異を有する造血幹細胞にVCを添加して培養した結果、VC濃度に応じて増殖能の低下と細胞の分化が認められた。以上のように、Cimminoら⁸⁾は高濃度のVCは白血病の発症を抑制することができることを明らかにした。

さらに、Cimminoら⁸⁾はヒトでも高濃度のVCにより白血病の発症を抑制できるかを明らかにするため、6種類のヒト白血病細胞株(HL-60, MOLM13, K562, THP1, KG-1, KASUMI-1)に125~1000 μMのVCを72時間添加した。その結果、これらのヒト白血病細胞株でVC濃度依存的に細胞死と5-ヒドロキシメチルシ

トシン量の増加が認められた。さらに, Cimmino ら⁸⁾は5-ヒドロキシメチルシトシンがさらに酸化されることで生成する5-ホルミルシトシンと5-カルボキシシトシンがDNA修復機構のひとつである塩基除去修復の標的になっていることに着目し, DNA修復酵素であるポリADPリボースポリメラーゼ(PARP)の阻害剤を添加することでDNA修復機構が抑制され, VCによる白血病発症の抑制が増強されるのではないかと考えた。そこで, 上記6種類のヒト白血病細胞株にVCとPARP阻害剤が同時投与された。その結果, VCとPARP阻害剤が同時投与はVC単独投与よりもさらにヒト白血病細胞株の細胞死を誘導することがわかった。すなわち, Cimmino ら⁸⁾はVC投与でTet2の機能を促進させ, PARP阻害剤でDNA修復を抑制すると, 白血病細胞の生存率がさらに低下することを明らかにした。

以上のように, Agathocleous ら⁷⁾は主にVCを合成できない *gulo*^{-/-}マウスを用い, VCが欠乏するとTet2の酵素活性が低下し, 造血幹細胞の異常増殖につながることを明らかにした。また, Agathocleous ら⁷⁾は論文の最後にヒトの造血幹細胞中でもVCが高濃度存在しており, SVCT2が高発現していることを示している。これは, ヒトでもVCが造血幹細胞を正常に保つ役割を担っていることを示唆している。一方, Cimmino ら⁸⁾はTet2遺伝子を欠損させたTet2^{-/-}マウスやヒト白血病細胞株を用い, 高濃度のVCがTet2の酵素活性を増強して造血幹細胞の分化異常を抑制することやPARP阻害剤の併用による増強効果などを明らかにし, 白血病に対するVCの治療効果を示した。Cimmino ら⁸⁾がマウスに投与したVC量(4 g/kg体重)は, 投与10~30分後に血漿中濃度が10 μMから30 mMまで上昇するとされている。ヒトでこのようなVCの濃度を達成するためには, VCを経口投与するのではなく, VCを血中に直接投与する必要がある。現在, がん治療に対して高濃度VC点滴療法の有効性が研究されているが, その作用機構として活性酸素の産生などが考えられている¹³⁾¹⁴⁾。Agathocleous ら⁷⁾とCimmino ら⁸⁾の研究から, VCによるTet2の活性化も高濃度VC点滴療法の作用機構に関与していることが考えられる。また, 筆者らは本誌トピックスにおいて, 「今後, VCによる脱メチル化反応ががん抑制に及ぼす影響も研究の対象になっていくことが予想される。」と以前に記したが⁶⁾, 数年の時を経て現実のものとなった。Tetは, 様々な臓器で発現が認められている³⁾。今後もエピジェネティクスの観点からVCの新たな機能が見いだされるかもしれない。

(2018.5.14 受付)

Key Words: vitamin C, Tet2, leukemia, epigenetics, DNA demethylation

¹Department of Bioenvironmental Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University

²Molecular Regulation of Aging, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

Yasunori Sato¹, Akihito Ishigami²

¹北陸大学 薬学部 生体環境薬学講座

²東京都健康長寿医療センター研究所 分子老化制御
佐藤 安訓¹, 石神 昭人²

文 献

- 1) Young JI, Zuchner S, Wang G (2015) Regulation of the Epigenome by Vitamin C. *Annu Rev Nutr* **35**, 545-564
- 2) Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930-935
- 3) Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**, 1129-1133
- 4) He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL (2011) Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333**, 1303-1307
- 5) Maiti A, Drohat AC (2011) Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem* **286**, 35334-35338
- 6) 岸本祐樹, 石神昭人 (2014) ビタミンCによるエピジェネティクスの制御. *ビタミン* **88**, 40-43
- 7) Agathocleous M, Meacham CE, Burgess RJ, Piskounova E, Zhao Z, Crane GM, Cowin BL, Bruner E, Murphy MM, Chen W, Spangrude GJ, Hu Z, DeBerardinis RJ, Morrison SJ (2017) Ascorbate regulates haematopoietic stem cell function and leukaemogenesis. *Nature* **549**, 476-481
- 8) Cimmino L, Dolgalev I, Wang Y, Yoshimi A, Martin GH, Wang J, Ng V, Xia B, Witkowski MT, Mitchell-Flack M, Grillo I, Bakogianni S, Ndiaye-Lobry D, Martin MT, Guillamot M, Banh RS, Xu M, Figueroa ME, Dickins RA, Abdel-Wahab O, Park CY, Tsiganos A, Neel BG, Aifantis I (2017) Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression. *Cell* **170**, 1079-1095 e1020
- 9) Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, Vyas P, Weissman IL, Quake SR, Majeti R (2012) Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leu-

- 10) Seita J, Sahoo D, Rossi DJ, Bhattacharya D, Serwold T, Inlay MA, Ehrlich LI, Fathman JW, Dill DL, Weissman IL (2012) Gene Expression Commons: an open platform for absolute gene expression profiling. *PLoS One* **7**, e40321
- 11) Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci ND, Heguy A, Cherry A, Vance G, Higgins RR, Ketterling RP, Gallagher RE, Litzow M., van den Brink M. R., Lazarus H. M., Rowe J. M., Luger S., Ferrando A., Paietta E, Tallman MS, Melnick A, Abdel-Wahab O, Levine RL (2012) Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **366**, 1079-1089
- 12) An J, Gonzalez-Avalos E, Chawla A, Jeong M, Lopez-Moyado IF, Li W, Goodell MA, Chavez L, Ko M, Rao A (2015) Acute loss of TET function results in aggressive myeloid cancer in mice. *Nat Commun* **6**, 10071
- 13) Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC, Khosh DB, Drisko J, Levine M (2008) Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11105-11109
- 14) Yun J, Mullarky E, Lu C, Bosch KN, Kavalier A, Rivera K, Roper J, Chio, II, Giannopoulou EG, Rago C, Muley A, Asara JM, Paik J, Elemento O, Chen Z, Pappin DJ, Dow LE, Papadopoulos N, Gross SS, Cantley LC (2015) Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science* **350**, 1391-1396