

# 審査の結果の要旨

氏名 高井 大哉

高等動物では DNA のメチル化により遺伝子の約半数が発現の制御を受けていると考えられ、細胞の分化や雌個体における X 染色体の不活化、遺伝子のすり込みに伴って様々な遺伝子のパターンが変わることが知られている。細胞の癌化においてもメチル化の変化が起こることが知られており、本研究ではヒトの癌で認められるメチル化の異常について主に検討した。以下に研究結果の要点を示す。

1. 以前、われわれは MS-RDA 法を用いて発癌物質である MeIQ で誘発したマウス肝臓癌で LINE1 が hypomethylation になることを見出した。今回ヒト肝臓癌 (hepatocellular carcinoma) について肝臓癌、周辺非癌部について LINE1 のメチル化の状態について検討を行った。解析を行った 9 例中 8 例という高い頻度で LINE1 の hypomethylation を認めた。このように非常に高い頻度で癌に特異的に認められた所見であることから、診断的な応用の可能性も考えられた。
2. 今回、すでにメチル化による発現の制御が報告されている遺伝子の構造の解析に基づき、CpG アイランド由来の DNA 断片を効果的に同定できるように本法を改良した。サブトラクションの対象を 500bp 以下の短い DNA 断端にすることおよび PCR buffer に betaine を加えることによるものである。後述のヒト正常気管上皮初代培養細胞および扁平上皮肺癌細胞株を用いたサブトラクションで得られた 17 の DNA 断端をザンハイブリダイズ法で濃縮の比率を比較したところ、従来法との比較で約 3 倍の濃縮効果を認めた。
3. ヒト正常気管上皮初代培養細胞および扁平上皮肺癌細胞株に対して、改良 MS-RDA 法を応用することにより、ヒト肺癌において過剰にメチル化を受ける 17 の DNA 断片を単離した。これらの断片がオーバーラップした遺伝子のうち、*endothelin-1* および *MEIS1* は、ヒト原発性肺癌 25 例の検討でそれぞれ 13 例、21 例で過剰なメチル化および発現の低下を認めた。とりわけ *endothelin-1* は受容体 B を介して、細胞増殖の抑制やアポトーシスを一部の細胞には誘導することが報告されており、*endothelin-1* のメチル化による発現低下は癌にとっては細胞増殖の調節・アポトーシスからの逸

脱という意味では合目的であるとも考えられた。

4. 既に改良 MS-RDA 法によりヒト肺癌で 17 の DNA 断片が過剰なメチル化を受けることを報告したが、その後のゲノム情報の更新に伴い、このうち新たに 1 つがセロトニン受容体 1B(*HTR1B*)遺伝子の近傍に存在することが明らかになった。この DNA 断片のメチル化と、*HTR1B* の発現抑制の間には相関が認められ、5-aza-dC の処理により、脱メチル化および再発現を認めた。*HTR1B* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化についても併せて検討を行った。過剰なメチル化および発現抑制を認める細胞株 EBC-1, LK-2 および *HTR1B* のプロモーター領域にメチル化を認めず、*HTR1B* を発現している細胞株 RERF-LCMS について、セロトニンの作用を検討したところ RERF-LCMS では濃度依存的な増殖抑制が認められたが、LK-2, EBC-1 では認めなかった。原発性肺癌（非小細胞癌）25 例の検討では 12 例で過剰なメチル化および発現低下を認めた。セロトニンが *HTR1B* を介して細胞増殖を抑制することから、*HTR1B* のメチル化による発現の抑制は、細胞増殖の制御からの逸脱という点で気管気管支上皮の癌化に関連していることが示唆された。

以上、ヒトの癌においてメチル化の異常について検討を行った。ゲノムはイントロン、偽遺伝子をはじめとして、なにもコードしていない部分が 97%もある。このためゲノムワイドスキャンは“ゲノムのゴミ”と戯れることに終始する危惧が指摘されていたが、最近のゲノム情報の充実は目を見張り、データベースサーチによりマッピングや近傍の遺伝子および EST の同定は一瞬にして終わるようになった。また、従来の制限酵素のみしかなかった、メチルシトシンのマッピングも bisulphite 法の開発によりより正確に緻密に行われるようになった。

今日までにわれわれの開発した MS-RDA 法をはじめとして、メチル化の違いをみるためのゲノムワイドスキャンの方法が複数報告されている。われわれは、本研究で MS-RDA 法をターゲットとなる CpG アイランドの構造に鑑み改良を行い、ヒト非小細胞肺癌で過剰なメチル化を受ける遺伝子を同定した。現在も癌におけるメチル化の異常は全世界的に、精力的に行われている。本研究は、癌で異常なメチル化を受ける遺伝子の究明のみならずゲノムワイドスキャン法を改良し、今後 DNA のメチル化のさらなる解明に重要な貢献をなすと考えられ学位の授与に値するものと考えられる。