

論文の内容の要旨

Comprehensive analysis of methylation status of CpG islands on the long arm of chromosome 7 in hematopoietic malignancy

造血器腫瘍における第七染色体上の CpG アイランドの網羅的メチル化解析

指導教官 宮園 浩平 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月 入学

病 理 学 専 攻

氏名 南谷 泰仁

遺伝子の不活化のメカニズムとして、遺伝子の欠失、変異に加えてプロモータ領域に存在する CpG アイランドのメチル化が近年数多く報告されている。一般的に腫瘍において CpG アイランドのメチル化は正常細胞と比べて高頻度であることが観察されるが、これは癌抑制遺伝子の発現を抑制するという機序を通じて、腫瘍化のメカニズムの一部を担っていると考えられている。プロモータ領域のメチル化は、転写抑制因子のリクルート、ヒストンの脱アセチル化、転写因子の結合に対する阻害などの機序によって遺伝子の転写を不活化することが明らかにされてきた。しかし、腫瘍において過度のメチル化が生じるメカニズムについては殆ど解明されていない。腫瘍におけるメチル化のパターンや頻度を正確に記述することは CpG アイランドの過剰メチル化のメカニズムを解明す

CpG アイランド以外の CpG dinucleotide は腫瘍化することによって CpG アイランド内の CpG dinucleotide とは逆に正常細胞よりメチル化の程度が減弱することが知られているため、クロマトグラフィーなどのメチル化シトシンを包括的に定量する方法を使用しても CpG アイランド内部のメチル化の程度は正確に測定できない事である。もう一つは、多くの包括的なメチル化異常検出法が開発されてきたが、これらの方法の多くはメチル化特異的制限酵素の特性を利用しており、それらの制限酵素認識部位が必ずしも CpG アイランド内部に存在しているわけではないため、CpG アイランドに対する特異性が低く、腫瘍においてメチル化を受けている CpG アイランドを見逃す可能性があるということである。そこで私は、各々の CpG アイランドのメチル化を個別に調べることで、CpG アイランドに特異的で見逃しの少ないメチル化プロファイルを作成することとした。

私は、2003年5月15日の時点で [Ensembl ftp site](#) に、第七染色体長腕上に登録されていた 279 個の CpG アイランドを抽出し、まず主に Alu 配列で構成される 27 個と、ゲノム上の他の部位に同一の配列がみられる 53 個を除外し、残りの 195 個の CpG アイランドを解析対象とした。このうち、128 個(66%)について、適切な PCR プライマーを設定することが出来た。第七染色体長腕を選択した理由は、この部位が造血期腫瘍において頻繁に欠失しており、またこの欠失が予後不良因子であるため、この部位に重要な癌抑制遺伝子が存在している可能性が示唆されているためである。従来の古典的な欠失解析では癌抑制遺伝子を特定出来ていない。ヒト胎盤 1 検体、正常成人の末梢血 4 検体、正常成人の骨髄 2 検体、骨髄系腫瘍患者骨髄 13 検体、MDS 由来細胞株 5 検体、骨髄系細胞株 15 検体、およびリンパ系細胞株 12 検体に対して DNA を抽出し、bisulfite 処理を行った後に PCR 増幅を行い、direct sequence 法を用いて増幅部位に含まれる CpG dinucleotide のメチル化を調べ、定量化してその程度に応じて色分けを行った。更に CpG アイランドを染色体上の位置の順に配列した。その結果を図に示す。正常細胞のメチル化は非常に低頻度であるが対照的に細胞株のメチル化は高頻度であり、患者検体のメチル化の頻度はその中間値をとることが分かった。メチル化への感受性は一定ではなく CpG アイランドに

よって、非常に大きなばらつきがあること、更にメチル化の感受性の高い（低い） CpG アイランドは、染色体上にランダムに分布しておらず、いくつかのクラスターを形成していることが分かった。この分布パターンは、患者検体においてメチル化の程度が弱い傾向があるものの、造血器腫瘍検体の種類、由来の病名に関わらず共通であった。

現在、メチル化を規定することが知られているいくつかの因子が存在するが、これらが実際にメチル化の程度に影響を及ぼすかを調べた。

CpG アイランドのメチル化反応は、3種類の DNA メチルトランスフェラーゼ(DNMT) すなわち DNMT1 は維持メチル化を、DNMT3a, 3b は *de novo* メチル化を担っている事が知られている。そこで、検体の各 DNMT の遺伝子発現量を real-time PCR 法で調べ、7q 全体のメチル化の程度との相関を調べた。DNMT1, 3a, 3b の発現量ともに、メチル化の程度との相関は認められなかった。しかし、各 DNMT の発現量の間には正の相関を認め、これら3つの遺伝子の発現がある共通の因子で支配されている可能性が示唆された。SP1 結合配列は、*aprt* 遺伝子プロモータを用いた検討により、CpG アイランドをメチル化から保護する働きを持つことがわかっている。そこで一般的に他の遺伝子のプロモータに対しても同様の機序が働いているかどうかを検証するために、今回検査対象となった全ての CpG アイランドに対して、その中に含まれる SP1 結合配列の密度とメチル化の頻度の相関を調べた。その結果、正常細胞においては SP1 結合配列の密度が高いほどメチル化の頻度が低いという負の相関が見られた。しかしこの相関は患者検体で減弱し、細胞株ではほぼ完全に消失していた。このことは、正常細胞においては CpG アイランドをメチル化から保護する機序が働いているが、腫瘍化するとこの機序が破綻することを示唆している。

更に、転写調節に関与する CpG アイランドと関与しない CpG アイランドのメチル化の頻度の違いを調べるために、遺伝子の 5'プロモータ領域を含む CpG アイランドと含まない CpG アイランドのメチル化の程度を調べたところ、前者の方がメチル化の程度が低いという結果が得られた。遺伝子の転写やタンパクの結合が DNA をメチル化から保護する

という機序が提唱されているが、これに矛盾しない結果となった。

今回の研究によって、CpG アイランドのメチル化パターンが染色体上にクラスターをなしているという結果が得られたがこのパターンを説明する機序は現在のところ知られていない。染色体上にクラスターを形成するものとして **house keeping gene** が知られているが、今回私が示したパターンとは一致しなかった。インプリンティングを受ける遺伝子も染色体上でクラスターを形成するが、クラスターの各構成要素の遺伝子群の転写調節領域のメチル化をまとめて制御するメカニズムが存在するといわれている。これが今回示されたパターンを説明することが可能かどうかは不明であり今後の検討課題である。

