

審査の結果の要旨

氏名 金田篤志

本研究は、新たな胃癌関連遺伝子を同定することを目的に、癌抑制遺伝子不活化の重要なメカニズムとなっている遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化をマーカーに用い、ゲノム解析を試みたものであり、以下の成果を得ている。

1. 4塩基認識メチル化感受性酵素 *HpaII* によるゲノム消化と、消化された DNA 断片の選択的増幅により、二つのゲノムでメチル化状態が異なる領域を抽出するゲノム解析法として報告されている methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)の感度をコントロール DNA を用いて測定した。その結果、MS-RDA はほとんど完全にメチル化している領域のみ選択的に抽出すること、つまり抽出する DNA 断片は限られるものの完全に不活化された遺伝子（サイレンシング遺伝子）に由来する可能性が高いこと、しかしそれゆえメチル化状態の異なる細胞が混入する癌組織ではなく、メチル化状態がより均一な癌細胞を用いなくてはならないことを示した。
2. 新たに 6塩基認識メチル化感受性酵素 *SacII*・*NarI* を用いるべくアダプター・プライマーを作成し、この MS-RDA の改良の結果、よりゲノムワイドに、より効率的に、CpG アイランド由来の DNA 断片を抽出することが可能になることを示した。
3. 改良した MS-RDA を用いて、胃癌細胞株 MKN28 と MKN74 において異常メチル化している CpG アイランドの同定を行った。その結果、9個の遺伝子 (*LOX*、*HRASLS*、*bA305P22.2.3*、*FLNc*、*HAND1*、a homologue of *RIKEN 2210016F16*、*FLJ32130*、*PGAR*、*Thrombomodulin*) が、プロモーター領域 CpG アイランドの異常メチル化により、2つの胃癌細胞株においてサイレンシングされていることを同定した。41例の胃癌手術材料を用いて解析したところ、9個の遺伝子のうち5個 (*FLNc*、*Thrombomodulin*、*HRASLS*、*HAND1*、*LOX*) は、手術材料の胃癌サンプルにおいても高頻度 (29% – 41%) にメチル化を認め、異常メチル化に相関して発現が低下しているのを認めた。これ

ら 5 個の遺伝子のうち 3 個 (*Thrombomodulin*、*HRASLS*、*LOX*) は細胞増殖抑制作用が報告されている遺伝子であり、本研究により癌における具体的な不活化機構が初めて示され、有力な新規癌抑制遺伝子候補と考えられた。

4. 今回同定された 9 個のサイレンシング遺伝子のメチル化を、高頻度におこなっている胃癌は 41 例中 11 例であり、この 11 例は既知のサイレンシング遺伝子 *p16*・*hMLH1* の異常メチル化も高頻度に認めた ($p < 0.0001$)。これら高頻度にメチル化を認める胃癌 11 例は全て未分化型であった ($p < 0.001$)。異常メチル化の蓄積が、未分化の原因となっている可能性を初めて示した。
5. もう一つのメチル化異常である遺伝子プロモーター領域の異常低メチル化を 3 個の *MAGE* 遺伝子を用いて解析した。異常低メチル化を高頻度におこなう胃癌は、異常メチル化を高頻度におこなう胃癌とは異なるグループを形成し、統計学的に有意に集積していた。これは、異常メチル化と異常低メチル化が異なるメカニズムにより生ずることを示唆し、この形質を「CpG アイランド低メチル化形質 (CpG island hypomethylator phenotype, CHOP)」と提唱した。

以上、本論文は、メチル化異常のゲノム解析法である MS-RDA の特徴を解析し、改良を加え、胃癌におけるメチル化異常の解析に応用し、9 個もの大量な新規サイレンシング遺伝子の同定を初めて報告した。9 個の中には、細胞増殖抑制作用が報告されている遺伝子 3 個など、機能的にも重要な遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子のメチル化プロファイルから、異常メチル化を高頻度に起こす胃癌と未分化型との相関、また新たな形質 CpG island hypomethylator phenotype を発見した。本研究は、メチル化異常のゲノム解析の指針を示し、胃癌の分子生物学的機構を解明する有力な候補遺伝子を同定し、またメチル化異常の胃癌組織多様性への関与の可能性にまで言及したものであり、学位の授与に値するものと考えられる。