

論文内容の要旨

論文題目 ラット *p16* 遺伝子 5'上流域のクローニング及び
 サイレンシングにおける役割

指導教官 高戸 毅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 阿部雅修

序論

p16 遺伝子は RB リン酸化反応の抑制により細胞増殖を阻害し、ヒトの様々ながんで不活化を認める重要ながん抑制遺伝子である。その不活化の機構として、突然変異・染色体相同欠失と並び、プロモーター領域のメチル化が重要である。しかし、ヒトの癌化の過程において、どのような時期に、どのような要因によりメチル化異常が生じるかについては、ほとんど知られていない。その解明のためには動物モデルを用いた解析が必要不可欠であるが、動物モデル、特にラットモデルにおいて、*p16* 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列は、本研究開始時には、知られていなかった。

多くの場合、メチル化状態が発現と密接に相関するのは、プロモーター領域の CpG アイランドのみである。特に、ヒト *p16* 遺伝子においては、5'上流プロモーター領域のみのメチル化が、遺伝子の不活化に重要とされている。しかし、ラット *p16* 遺伝子については、エクソン 1 α のメチル化状態が発現調節に重要であるとされてきた。

よって、本研究においては、まず、エクソン 1 α のメチル化状態を解析することの妥当性を検討した。次に、ラット *p16* 遺伝子の 5'上流域のクローニングを行い、最後に、遺伝子発現とより密接に相関したメチル化状態を示す CpG アイランドを見出した。

材料及び方法

腺管分離法により抽出した正常ラット乳腺 3 検体、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine により誘発した乳がん原発腫瘍 6 個、及び、細胞株 4 種類（乳がん細胞株 PhIP12-1, PhIP7-4, 及び、不死化線維芽細胞株 3Y1, BBR2）の、合計 13 検体を用いた。ラット *p16* 遺伝子の発現解析には RT-PCR を用いた。染色体の相同欠失はサザンブロット解析により確認した。エクソン 1 α のメチル化の解析には methylation-specific PCR (MSP)を、5'上流域のメチル化の解析には、重亜硫酸処理シーケンシング及び MSP を用いた。BAC ライブラリーのスクリーニングを行い、陽性クローン 63F13 を塩基配列決定に用いた。

結果

まず、正常乳腺 3 検体、乳がん原発腫瘍 6 個、細胞株 4 種類を用いて、ラット *p16* 遺伝子の発現、及び、エクソン 1 α のメチル化状態を検討した。正常乳腺 3 検体、乳がん原発腫瘍 6 個では発現していたのに対し、細胞株 4 種類では発現消失していた。一方、エクソン 1 α は、正常乳腺 3 検体、乳がん原発巣 2 個で部分的に、及び、細胞株 3Y1 で完全に、メチル化されていた。部分的にエクソン 1 α のメチル化を認めた検体でも、遺伝子発現はよく保たれており、エクソン 1 α のメチル化状態と *p16* 遺伝子の発現とは、完全には相関しなかった。

因みに、3Y1 以外の 3 種類の細胞株での発現消失の原因は、いずれも染色体の相同欠失であった。

そこで、ラット BAC ライブラリーをスクリーニングし、7 個の BAC クローンを得た。そのうちの 1 個を用いて、*p16* 遺伝子 5' 上流域約 1.4kbp について、塩基配列を決定した。翻訳開始点上流 480 bp について、CpG アイランド領域を見いだした。

次に、この CpG アイランド領域（CpG 部位 22 箇所）のメチル化状態を、重亜硫酸処理後塩基配列を決定する方法により、検討した。この領域では、エクソン 1 α でメチル化が認められた正常乳腺 3 検体および乳がん原発巣 2 個を含め、発現が認められた全ての検体では、完全に非メチル化状態となっていた。また *p16* 遺伝子の発現を認めなかった 3Y1 では、この領域も完全にメチル化さ

れていた。

最後に、メチル化状態と発現の相関が特に良好であった領域に、MSP 用のプライマーを設計し、重亜硫酸処理後塩基配列を決定する方法と同様の結果を確認した。

結論

ラット *p16* 遺伝子 5'上流域は、そのメチル化状態と遺伝子発現との相関が明確であり、メチル化による発現制御に重要な領域であると考えられた。本研究で開発したラット *p16* 遺伝子 5'上流域の MSP プライマーは、今後、ラットを用いた多くの発がん研究に役立つと考えられる。