

審査の結果の要旨

氏名 阿部 雅修

癌抑制遺伝子として知られる *p16* 遺伝子の不活化には、ヒトでは、染色体相同欠失、突然変異と並び、プロモーター領域の CpG アイランドの過剰メチル化による遺伝子サイレンシングが重要である。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 *p16* 遺伝子の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り、中でもラットはヒトのがんの実験モデル系として広く利用されている。ラットでの *p16* 遺伝子のサイレンシングには、従来、ヒトと異なり、エクソン 1 のメチル化が重要であるとされてきた。本研究は、ラット *p16* 遺伝子のエクソン 1 においてメチル化を調べることの妥当性について検討するとともに、メチル化状態が発現と最も明瞭に相関する領域の同定を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 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巣 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 検体について、*p16* の発現及びエクソン 1 のメチル化状態を検討した。RT-PCR 解析により、*p16* の発現は、正常乳腺及び乳がん原発巣では保たれている一方、すべての細胞株で消失していた。にもかかわらず、正常乳腺 3 検体及び乳がん原発巣 2 個では、エクソン 1 のメチル化が認められ、エクソン 1 のメ

チル化と *p16* 遺伝子の発現とは完全には相関しなかった。

2. ラット *p16* 遺伝子 5'上流域約 1.4kb をクローニングし、翻訳開始点上流約 480bp の CpG アイランド (CpG 部位 22 箇所) のメチル化状態を、bisulfite sequence 法により検討した。この領域は、正常乳腺及び乳がん原発巣ではメチル化されていなかったのに対し、細胞株 3Y1 では、ほぼ完全にメチル化されていた。残り 3 種類の細胞株については、Southern blot 法により、*p16* 領域の染色体相同欠失が認められた。また、メチル化された DNA 分子を鋭敏に検出する methylation-specific PCR 法でも、同様の結果が確認された。今回クローニングした 5'上流域は、そのメチル化状態と発現との相関が明瞭であり、メチル化による発現調節に重要な領域であると考えられた。

以上、本論文はラット *p16* 遺伝子の 5'上流域のクローニングを行い、その発現とメチル化状態が明瞭に相関する領域を明らかにした。本研究で新たにデザインした 5'上流域における MSP プライマーは、ラット各種腫瘍での *p16* 遺伝子の不活化の研究に大いに貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。