

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 高田 恭臣

本研究は大腸癌において、Wnt シグナルに拮抗する働きをもち、新規の癌抑制遺伝子として認識された *SFRP1* 遺伝子の、ヒト卵巣癌におけるプロモーター領域のメチル化と発現抑制について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 卵巣癌細胞株 13 株とヒト卵巣表面上皮細胞(HOSE 細胞)における、*SFRP1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の状態を、Methylation-specific PCR(MSP)で解析した。MCAS (粘液性)、RMUG-L (粘液性)、RTSG (低分化)、TYK-nu (未分化) の 4 つの細胞株では、メチル化 DNA のみ検出された。OV-90 (漿液性) と RMG-I (明細胞) の 2 種類の細胞株では、メチル化 DNA と非メチル化 DNA の両方が検出された。残りの細胞株と HOSE 細胞では、非メチル化 DNA のみ検出された。卵巣癌細胞株においても、*SFRP1* 遺伝子のメチル化を認めることが示された。
2. 定量的 RT-PCR 法を用いて、卵巣癌細胞株 13 株における *SFRP1* の発現量を調べた。メチル化 DNA のみ検出された細胞株 4 株(MCAS, RMUG-L, RTSG, TYK-nu)では、全く発現は認められなかった。メチル化 DNA と非メチル化

DNA の両方が検出された細胞株 2 株のうち、RMG-I ではまったく発現していなかったが、OV-90 ではわずかな発現が検出された。非メチル化 DNA のみが検出された 7 細胞株のうち、TOV-112D、RMUG-S、KURAMOCHI の 3 細胞株ではわずかな発現を、HTOA では HOSE と同レベルの発現を、ES-2、TOV-21G、JHOS-2 では過剰発現を認めた。卵巣癌細胞株では、プロモーター領域のメチル化が *SFRP1* の発現抑制と強く関連していることが示された。

3. *SFRP1* の発現抑制における、プロモーター領域のメチル化の役割を検討するために、メチル化 DNA のみ検出された細胞株 4 株、MCAS、RMUG-L、RTSG、TYK-nu について、5-aza-dC により脱メチル化を誘導、発現の変化を解析した。いずれの細胞株でも、濃度依存性に *SFRP1* の発現の回復が認められた。特に MCAS では、5-aza-dC を 0.1 μ M 以上の濃度で添加したところ、濃度依存性に *SFRP1* の発現が回復し、その傾向が強いことが示された。MCAS 細胞での、*SFRP1* 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を、MSP を用いて確認した。5-aza-dC を 0.1 μ M 以上の濃度で添加したところ、プロモーター領域が脱メチル化され、非メチル化 DNA が検出された。2 の結果と合わせ、プロモーター領域のメチル化が原因で、*SFRP1* の発現抑制が起こっていることが卵巣癌において確認された。

4. 卵巣癌臨床検体 17 検体を使って、*SFRP1* のプロモーター領域のメチル化を、MSP を用いて解析した。17 検体中 2 検体（粘液性腺癌 1 検体、漿液性腺癌 1 検体）で、メチル化 DNA が検出された。一方、子宮内膜症性嚢胞 7 検体ではメチル化 DNA は検出されなかった。PCR のサイクル数をさらに 4 サイクル追加したところ（計 36 サイクル）、卵巣癌臨床検体 4 検体(case 8

(漿液性) , case 14 (扁平上皮) , case 15 (漿液性) , case 17 (明細胞) と子宮内膜症性嚢胞 1 検体において、メチル化 DNA が認められた。これらの検体では、*SFRP1* がメチル化された DNA が少数存在すると考えられた。

以上、本論文はプロモーター領域のメチル化による *SFRP1* の発現抑制を、卵巣癌において初めて証明した。粘液性腺癌、低、未分化型腺癌において、*SFRP1* のメチル化が高頻度に認められる傾向があった。粘液性腺癌、低、未分化型腺癌は化学療法に抵抗性があることが知られており、*SFRP1* のメチル化を解析することにより、症例の化学療法抵抗性の有無を検索できる可能性も考えられた。本研究は *SFRP1* 遺伝子が、卵巣癌の診断や治療上、新しい標的となることを期待させるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。