

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岩谷 美沙

1950年代に睡眠薬として用いられていたサリドマイドは、その催奇形性により世界的な薬害をもたらした。一方、現在では様々なガンや自己免疫性疾患など慢性疾患の治療に有効であり、使用される疾患の数は100を超える。サリドマイドの作用機序は主にTNF- α が関連する分子伝達系の関与が示唆されている。また、DMSOは水に難溶性物質の溶媒として多くの実験系に利用されて、また、様々な細胞の凍結保存時の保護剤としても汎用されている。さらに、DMSOは血球系細胞など一部の特殊な細胞の分化誘導剤としても使用されてきている。エピジェネティック機構はDNAメチル化とヒストン修飾によって維持され、細胞世代を超えても継承される遺伝子発現記憶装置である。ゲノムには組織特異的にメチル化される領域(T-DMR)が多数存在し、細胞の種類固有のDNAメチル化プロファイルを形成している。DNAメチル化プロファイルの形成は、胚発生や個体のホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしているのである。DNAメチル化プロファイルの変化は、細胞の不可逆的な遺伝子発現の変化を意味する。これらを考えると、エピジェネティクス情報は、サリドマイドを含む様々な慢性疾患治療薬の主作用あるいは副作用を評価する上で重要な情報となることは論を待たない。本論文は、マウスのES細胞の未分化状態と胚様体形成におけるDNAプロファイル形成に及ぼす影響を中心に、サリドマイドとその溶媒として使用したジメチルサルフォキシド(DMSO)の薬理作用にエピジェネティクス変化が含まれている可能性について研究したもので、二章から成る。

第一章では、DMSOのエピジェネティクス作用について検討した。胚性幹細胞(ES細胞)はin vitro、in vivoにおける細胞分化誘導の系が確立しており、三胚葉に分化することができる。ES細胞から胚様体、胚様体からテラトーマ形成過程においては、それぞれ固有の遺伝子座セットでDNAメチル化変化が起こり、胚様体、テラトーマ固有のDNAメチル化プロファイルを形成する。まず、0.1%(v/v)DMSO存在下で形成された胚様体のDNAメチル化状態を調べたところ、DMSOを含まない培養で形成された胚様体に比べ、内在性レトロウイルス由来繰り返し配列やマイナーサテライト繰り返し配列のDNAメチル化が亢進された。そこで、さらにRestriction Landmark Genomic Scanning (RLGS)により、遺伝子領域約2000領域に焦点を当てDNAメチル化プロファイルへの影響を解析したところ、DMSO処理によって11の遺伝子領域で脱メチル化、4領域でメチル化が誘導されることが明らかになった。さらに遺伝子上流域に焦点をあてたDNAマイクロアレイによる解析の結果、2箇所のメチル化領域、3箇所の脱メチル化領域が発見された。DMSOはDNAメチル化プロファイルに影響をあたえるのである。興味深いことに、DMSO濃度[0.02-1%(v/v)]に伴ってDnmt3a mRNAと同酵素タンパク質の発現の上昇が見られた。

第二章ではサリドマイドが胚様体形成時のDNAメチル化プロファイルにおよぼす影響が解析された。興味深いことに、光学異性体である(-)-サリドマイド(100 μ g/ml)存在下において胚様体同士の細胞接着が誘導された。また、(±)-サリドマイド(100 mg/kg BW)及び(-)-サリドマイド

(100 mg/kg BW) 処理胚様体由来のテラトーマ形成実験で軟骨形成の促進が観察された。サリドマイドが、形質の発現に不可逆的な影響をあたえることは間違いない。そこで、RLGS により DNA メチル化プロファイルを解析すると、(±)-サリドマイド(100 µg/ml)により、約 2000 領域の遺伝子座のうち 7 領域で脱メチル化、2 領域でメチル化が誘導されることが明らかになった。さらに、DNA マイクロアレイ解析により、サリドマイドによってメチル化される 8 領域、および脱メチル化される 4 領域が発見され同定された。興味深いことに、これらの中には、TNF- α の制御下の転写因子 Pou2f1 遺伝子のメチル化亢進と、抑制型のエピジェネティクス制御に関与すると注目されるコアヒストン・サブタイプ H3.2 遺伝子の脱メチル化などが含まれる。サリドマイドで DNA メチル化状態が変化する 12 の遺伝子領域のうち、7 領域はヒト-マウス間で共通であった。

サリドマイドの主・副作用、あるいは、DMSO の分化誘導作用は、ともに不可逆的な変化を説明できるものでなければならないが、これまでのサリドマイドの薬効の分子機構解析は、形態観察や細胞質内生化学、あるいは、DNA の損傷といった枠内での研究にとどまっていた。本研究ではサリドマイドおよび DMSO が、DNA メチル化プロファイルに影響を与えることを明らかにした。これらの研究成果は、細胞の分化に関する基礎科学としての価値がある。また、薬物・化合物の評価および創薬標的探索からも新たな方法論を提供し、サリドマイドの作用を新しい観点から解釈することを可能にする、応用科学としても評価できる。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。