

審査の結果の要旨

氏名 荻原 英樹

本研究は神経膠腫における腫瘍の進展機構を解明するため、50K SNP genotyping array を用いて、32 例の神経膠腫（稀突起神経膠腫 12 例、退形成性稀突起神経膠腫 4 例、星状細胞腫 4 例、退形成性星状細胞腫 4 例、神経膠芽腫 8 例）の染色体変異を解析し、新規癌抑制遺伝子を同定することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. SNP genotyping array によるコピー数解析の結果、従来の CGH などのコピー数解析法では検出されない UPD が 13 症例 21 箇所、神経膠腫において検出された。神経膠腫のグレードが増加するにつれ、染色体変異が増加する傾向を認めた。
2. SNP genotyping array によるコピー数解析の結果、7 箇所、6 検体でホモ欠失領域を認めた。ホモ欠失 7 箇所のうち、4 箇所は過去にホモ欠失の報告がある 9p21.3 の領域であり、1 箇所は 10q23.31 の領域であった。12q21, 13q21 の 2 箇所は神経膠芽腫における新規のホモ欠失領域であった。
3. 新規ホモ欠失領域に関して、ダイレクトシーケンシングを用いた SNP 解析により、12q21 のホモ欠失領域は 4.17Mbp、13q21 では 388Kbp に渡ることを検証した。また、28 例の神経膠芽腫をに対して、質量分析による LOH 解析を行い、染色体欠失の頻度を調べたところ、12q21 の領域では、28 例中 4 例 (14.3%) に LOH、2 例 (7.1%) にホモ欠失を認めた。13q21 の領域では 28 例中 8 例 (28.5%) に LOH、3 例 (10.7%) にホモ欠失を認めた。
4. 12q21 ホモ欠失領域には、4 つの遺伝子が含まれていたが、定量 PCR による mRNA の発現解析により、正常脳の発現に比し、神経膠芽腫で発現が低下している *NAV3* が候補癌抑制遺伝子として選出された。13q21 ホモ欠失領域には、*DACHI* 遺伝子が存在していた。定量 PCR による mRNA の発現解析により、正常脳での発現部位のひとつと考えられる尾

状核での発現量に比し、神経膠芽腫の臨床検体、細胞株において、発現が低下していることを確認した。

5. DACH1 の発現を認めていない神経膠芽腫由来の細胞株である U87 を用いて、テトラサイクリン誘導型の DACH1 の安定発現株の作製し、2 種類のクローンで DACH1 の発現による増殖に対する効果を WST-8 アッセイにて検討した。ドキシサイクリン 1 μ g/ml の投与から 96 時間後に、コントロール(ドキシサイクリンなし)と比較して、クローン 1 では 15.8%、クローン 2 では 25.7%と有意な低下を認めた。ドキシサイクリン 1 μ g/ml の投与から 144 時間後では、クローン 1 では 29.0%、クローン 2 では 32.7%と有意な低下を認めた ($p<0.005$)。また、ソフトアガーアッセイにて足場非依存性増殖に対する効果をみたところ、ドキシサイクリン 1 μ g/ml の投与をしたものは、コントロール(ドキシサイクリンなし)と比較して、クローン 1 では 62.7%、クローン 2 では 69.6%と有意な低下を認めた($p<0.005$)。

6. DACH1 を発現している神経膠芽腫由来の細胞株である U251 において、siRNA による DACH1 の発現抑制が腫瘍細胞に与える影響について検討したところ、DACH1 の発現抑制により、WST-8 アッセイにて、96 時間後に siRNA-1 で 35.6%、siRNA-2 で 17.9%、siRNA-3 で 14.6%と、細胞増殖が有意に亢進した。

以上、本論文は、SNP typing array により神経膠芽腫における新規のホモ欠失を同定し、新規ホモ欠失 13q21 に存在した DACH1 の発現により神経膠芽腫細胞の増殖、足場非依存性増殖が抑制される、また DACH1 の発現抑制により増殖が亢進することを示した。本研究は予後不良な神経膠芽腫の発生、進展機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。