

## 論文の内容の要旨

論文題目 高密度タイリングアレイを用いた肝癌の網羅的メチル化解析

指導教員 小俣政男 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 永江 玄太

### 1. 序論

DNA メチル化は、細胞分裂の際にも安定的に伝えられるエピゲノム情報であり、ヒストン修飾とともに遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている。適切なエピゲノム情報に基づく転写制御は、個体発生・細胞分化という生理的現象に必須のシステムであり、また、このような制御機構の破綻は、癌をはじめとするさまざまな病態に関わっている。癌細胞では、ゲノム全体の低メチル化、遺伝子プロモーター領域の高メチル化、インプリンティング状態の異常など、さまざまなメチル化の異常がみられるが、プロモーター領域の高メチル化は、癌抑制遺伝子などの不適切なサイレンシングを来たす一因となっている。

そこで、癌化という病態を転写制御の異常という側面から総体的に捉えることを目的として、DNA メチル化の網羅的解析を行った。近年のマイクロアレイ技術の進歩によって、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピゲノム情報の網羅的解析がヒトゲノムでも応用可能となってきた。本研究では、メチル化 DNA 免疫沈降法 (MeDIP 法) とタイリング

マイクロアレイ解析を組み合わせた MeDIP-chip 法を、癌細胞株のみならず臨床組織検体にも応用し、正常肝組織や肝硬変組織、肝癌組織の遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化状態の詳細なマッピングを行った。

## 2. 実験方法

癌細胞株のゲノムを用いて MeDIP-chip 法による DNA メチル化の網羅的解析の条件検討を行った。ゲノム DNA 1 $\mu$ g を超音波処理によって 500bp 程度に断片化した後に、MeDIP 法によってメチル化 DNA 断片の濃縮を行った。免疫沈降産物 (IP DNA) と対照コントロール (input DNA) の定量的 PCR から算出した濃縮率により免疫沈降の効率を評価し、条件の最適化を行った。得られた IP DNA と input DNA を用いて IVT 法による線形増幅を行った。再度 50~100bp 程度まで断片化し、ラベリングを行い、プロモーター領域を中心に 35bp 間隔でプローブが設計された高密度タイリングマイクロアレイにハイブリダイゼーションさせた。IP と input のそれぞれのアレイのプローブシグナル強度を Wilcoxon 順位和検定で解析し、高メチル化領域を表示させた。解析結果の信頼性は、バイサルファイトシーケンス法および質量分析器を用いた MassARRAY 法の 2 種類の方法で行った。以上の方法を用いて、肝癌細胞株および肝癌臨床組織における DNA メチル化の網羅的解析を行い、正常肝組織、肝硬変組織および肝癌臨床組織、肝癌細胞株においてプロモーター領域が高メチル化状態にある遺伝子を検出した。さらに、正常組織では低メチル化を呈し、肝癌組織で高メチル化を呈する遺伝子を、肝癌特異的異常メチル化の候補遺伝子として抽出した。

## 3. 結果

MeDIP 法の条件検討は 2 種類の抗体や免疫沈降時間について行い、最適の条件では 20 倍相当の濃縮率が得られた。この条件で MeDIP を行った数 ng の IP DNA を用いて 2 段階の IVT 法を行い、数十  $\mu$ g まで線形増

幅させた。Input DNA についても同様の増幅を行い、これらのサンプルを用いてタイリングアレイ解析を行った。*HOXA* クラスター領域における 9 ヶ所の遺伝子プロモーター領域について、バイサルファイトシーケンス法によるメチル化状態の確認を行った。アレイ解析にて高メチル化と判定した 5 領域中 4 領域は 90%以上のメチル化率を示し、残り 1 ヶ所は 30%のメチル化率を認めた。一方、低メチル化領域と判定した 4 領域は、ほとんどメチル化を認めない領域であった。さらに、MassARRAY 法を用いて 101 ヶ所のメチル化状態の確認を行った。高メチル化と判定した 30 領域中、70%以上のメチル化率は 18 ヶ所、30~70%のメチル化率は 10 ヶ所認め、30%未満の低メチル化領域はわずか 2 ヶ所であった。また、低メチル化領域と判定した 71 領域では、30%未満の低メチル化領域は 59 ヶ所であり、30~70%のメチル化率を 9 ヶ所認め、70%以上の高メチル領域はわずか 3 ヶ所であった。以上の結果より、本解析法の高い特異度と感度が確認された。

この MeDIP-chip 法を用いて、肝癌細胞株および臨床組織における網羅的メチル化解析を行い、転写開始点の上流下流それぞれ 1kb 以内に高メチル化領域を有する遺伝子を高メチル化遺伝子として定義した。その結果、正常肝組織および肝硬変組織で 2000 前後、肝癌組織および肝癌細胞株では 1700~6300 におよぶ高メチル化遺伝子を検出した。*HOXA* クラスター領域をはじめとするさまざまな領域に、肝癌組織および肝癌細胞株で新規に異常メチル化を生じていることが明らかとなり、このような異常メチル化遺伝子には、すでに肝癌でも異常メチル化の報告がある、SFRP ファミリー遺伝子や RASSF ファミリー遺伝子、*CDKN2A/p16<sup>INK4A</sup>* が含まれていた。正常肝組織では高メチル化がみられず、肝癌組織 4 サンプル中 3 サンプル以上で高メチル化を認めた遺伝子を、癌特異的異常メチル化の候補遺伝子と定義し、609 遺伝子を抽出した。この 609 遺伝子について遺伝子機能アノテーション解析を行った結果、DNA 結合、転写因子、ホメオボックスなどのキーワードが上位に挙げられた。発生初期での細

胞分化に重要な役割を果たすポリコーン標的遺伝子群についてマイクロアレイデータの比較検討を行った結果、これらの遺伝子群は肝癌組織や肝癌細胞株で高率に高メチル化を呈していることが確認された。

#### 4. 考察

本研究では、近年、有効な網羅的メチル化解析法として発展してきた MeDIP-chip 法を、高密度タイリングアレイに応用することによって、全染色体にわたる遺伝子プロモーター領域に対して、1 遺伝子レベルまでの高解像度な解析を可能とした。条件を最適化することによって臨床検体での応用を実現し、数  $\mu\text{g}$  という現実的なサンプル量での解析も可能となった。また、1kb 以下の高解像度であることから、それぞれの遺伝子に対応させた解析が可能であり、さまざまな臨床サンプルでの高メチル化遺伝子の抽出を直接行うことが可能であった。これらの遺伝子群には、すでに肝癌でのメチル化の報告のある遺伝子も含まれていた。さらに、正常肝組織、肝硬変組織、肝癌組織、肝癌細胞株での高メチル化遺伝子を比較することによって、肝癌発癌過程で生じるゲノムワイドなメチル化状態の変化を明らかにし、癌化に伴って新規にメチル化を来たす遺伝子群を抽出することが可能となった。本手法によって得られた DNA メチル化状態の詳細なマッピングは、発癌過程でゲノムワイドに変化するエピゲノム状態を理解する上での重要な基礎情報となり、今後、ヒストン修飾などのエピゲノム情報とともに転写制御に関する包括的な理解を進めていくものと考えられる。また、癌特異的なメチル化遺伝子のスクリーニングに非常に有用であることから、臨床マーカーの探索などのトランスレーショナル領域へも広く活用されていくことが大いに期待される。