

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 永 江 玄 太

本研究は、肝臓における転写制御異常の一因となっている DNA メチル化の異常を網羅的に解析するため、メチル化 DNA 免疫沈降法と高密度ゲノムタイリングアレイを組み合わせた網羅的メチル化解析法を開発し、これを肝臓細胞株や肝臓臨床組織に応用したものであり、下記の結果を得ている。

1. 抗メチルシトシン抗体を用いたメチル化 DNA 免疫沈降法 (MeDIP 法) によって、メチル化シトシンを含む DNA 断片を少なくとも 20 倍程度まで濃縮することが可能であった。この手法は、メチル化感受性制限酵素を用いた手法のようにメチル化シトシン周囲の配列に依存することなく濃縮することであった。また、従来の網羅的メチル化解析法では困難であった少量のゲノム DNA (1 μ g) からでも解析が可能であり、臨床組織検体でも応用が可能であることが示された。
2. IVT 増幅法を用いることによって、メチル化 DNA を濃縮したサンプルのような GC 密度が高いサンプルの場合でも数百倍以上に増幅させることができることが示された。また、この方法は PCR 法のように配列に依存して増幅効率が異なることがなく、免疫沈降法後の濃縮率を維持した状態で増幅できることが示された。
3. MeDIP 法によって濃縮したメチル化 DNA 断片を IVT 法で増幅し、高密度タイリングアレイで解析することによって、ヒトの 25,500 遺伝子のプロモーター領域を 10kb にわたって、高メチル化領域の網羅的に解析可能であることが示された。解析解像度は 1kb 以下であり、遺伝子構造を考慮に入れた詳細なメチル化部位の同定が可能であった。そして、このマイクロアレイ解析で示された結果は、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 法と、よく一致していることが示された。
4. この MeDIP-chip 法による網羅的メチル化解析を肝臓細胞株および正常肝臓、肝硬変組織、肝臓組織に応用することによって、それぞれのサンプルにおいて数千におよぶ異常メチル化候補遺伝子を新規に検出した。この異常メチル化候補遺伝子には、これまで報告されている異常メチル化遺伝子も多く含まれていた。また、発生時期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が多数含まれており、これらが終末分化した正常細胞や異常メチル化の増加した癌細胞において、DNA メチル化の標的になっていることが示された。

以上、本論文は、ヒト細胞の 25,500 遺伝子のプロモーター領域を 10kb にわたって解析しうる網羅性と 1kb 以下の解析解像度を両立させた新規手法を開発、検証した。このような網羅的メチル化解析法を肝癌組織における異常メチル化領域の網羅的解析に応用したのは本研究がはじめてであり、肝癌における転写制御異常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。