

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 鄧 穎氷

本研究は肝炎ウイルス関連肝癌とプロモーター領域の異常メチル化の関係を理解する上で重要と考えられる。HBV・HCV関連肝癌の異常メチル化状態の違いを明らかにするため、両者におけるプロモーター領域の網羅的メチル化解析を行い、同定したHBV/HCV関連肝癌に特異的なメチル化遺伝子において肝癌発癌のメカニズムとの関係を考察しており、下記の結果を得ている。

1. MeDIP-Chip法を用いて遺伝子のプロモーター領域において、正常肝組織（3例）及びHBV・HCV関連肝癌6例と非癌部6例のDNAのメチル化状態を解析した。解析した結果からHCV関連肝癌の3例でプロモーター領域の異常メチル化が多い傾向を認められた。

2. HBV・HCV関連肝癌10例と非癌部10例を用いて18個のHCV特異的候補遺伝子のメチル化率の値をクラスタリングしたところ、5例HCV関連肝癌は高メチル化グループにクラスターした。発現マイクロアデータにより癌部と非癌部の発現量geneチップスコアを割算したところ、主にHCV関連肝癌で発現低下していることを確認した。HCV関連肝癌でメチル化遺伝子の発現制御の傾向が観察されたが、HBV関連肝癌でメチル化遺伝子の発現制御の傾向を観察されなかった。

3. 肝癌細胞株（Huh7、Huh6、HepG2、Alex、Hep3B）を用いてMassARRAYでメチル化率を測定した。メチル化率75%以上の細胞株で5-Aza/TSAを投与し、その投与前後の遺伝子の発現量をRT-PCR法により比較した。5-Aza/TSAを投与した後に、メチル化していた遺伝子の発現量回復が認められた。B/Cマーカーのサイレンシングの原因はメチル化発現制御機構によるものであることが確認された。

4. 125例の臨床検体を用いてHCV特異的なメチル化候補遺伝子18個とHBV特異的なメチル化候補遺伝子6個のメチル化率をMassARRAYで解析した。HCV特異的なメチル化遺伝子18個はすべてHCV関連肝癌でHBV関連肝癌と比べて有意に高率にメチル化されていた。51歳から69歳までの症例のみを解析に使用し、肝炎ウイルス関連肝癌とメチル化の関連性を比較した。HCV特異的なメチル化遺伝子18個のうち15遺伝子はHCV関連肝癌においてHBV関連肝癌と比べて有意に高率にメチル化されていた。15個の遺伝子は年齢に 상관なくHCV関連肝癌特異的にメチル化すると考えられた。59例の肝癌と非癌部のメチル化値の差を利用して、クラスタの解析を行った。年齢に依存しないCマーカー15個が高頻度にメチル化されているクラスタはHCV関連肝癌が有意に多いことを認めた。Bマーカー6個では確認されなかった。少なくとも15個はHCV関連肝癌特異的なメチル化遺伝子と考えられた。

5. Cマーカー15個のうち、NPR1、DUSP4、LOX、RRADの4遺伝子はRas/Raf/ERK シグナルの阻害遺伝子である。また、SFRP4、RUNX3の2遺伝子はWnt/ β -cateninシグナルの阻害遺伝子である。HCV関連肝癌においては異常プロモーターメチル化によって発癌シグナル経路Ras、Wntなどの阻害剤が不活性化する可能性が示唆された。

以上、本論文は MeDIP-Chip を用いてゲノムワイドに HBV・HCV 関連肝癌のメチル化状態を比較した。HCV 関連肝癌では、遺伝子のプロモーター領域における異常なメチル化が HBV 関連肝癌と比較し多い傾向が認められた。MassARRAY を使用し多数の臨床サンプルの定量的 DNA メチル化解析を行い、MeDIP-Chip 結果と同様にプロモーター領域において HBV 関連肝癌よりも HCV 関連肝癌でメチル化が異常に亢進していることが示された。プロモーター領域がメチル化され、その結果遺伝子発現が抑制されている、HCV 関連肝癌で特異的な遺伝子を同定した。これは、プロモーターメチル化は HCV 関連肝癌の発癌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。