

審査の結果の要旨

氏名 渡邊 広祐

本研究はヒト非小細胞肺癌において異常な DNA メチル化により発現抑制を受けるマイクロ RNA (miRNA)を探索し、同定された miRNA の機能を解析することを目的としている。ゲノム構造の解析、肺癌細胞株・臨床例の解析を組み合わせることにより、下記の結果を得ている。

1. ゲノム構造の解析により 55 種の候補 miRNA を選択し、6 種の肺癌細胞株の脱メチル化処理前後における発現量を定量した。14 種の miRNA が高頻度に発現低下しており、かつ脱メチル化処理により発現が誘導された。次に肺癌手術検体を用いて 14 種の miRNA の発現量を定量したところ、7 種の miRNA が高頻度に発現低下していた。この 7 種の miRNA について DNA メチル化を詳細に検討した結果、mir-34b と mir-126 が DNA メチル化による発現制御を受けることを見出した。
2. 肺癌細胞株における mir-34b のメチル化の状態を *HpaII*-PCR 法、bisulfite sequence 法を用いて検討したところ、最も発現が低下している 2 種の細胞株 (H2347、LC1sq) において完全な DNA メチル化を認めた。一方、正常気道上皮細胞 (NHBE) では DNA メチル化を認めなかった。
3. mir-126 は EGFL7 遺伝子のイントロン内に位置し、mir-126 と EGFL7 の発現量は肺癌細胞株において強い相関を示した。mir-126 は CpG アイランド内に位置し、EGFL7 の 5'側にも別の CpG アイランドが存在する。肺癌細胞株および NHBE における、これら 2 つの CpG アイランドの DNA メチル化を Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)法および bisulfite sequence 法を用いて検討した。EGFL7 の 5'側に位置する CpG アイランドのメチル化がある細胞株で mir-126 の発現量が低下しており、この CpG アイランドのメチル化が mir-126 の発現制御に重要な役割を果たしていることが示された。
4. 肺癌細胞株における mir-34b と mir-126 のヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法により解析した。mir-34b では H3K9 のジメチル化・トリメチル化が、mir-126 では H3K9 のメチル化と H3K27 のトリメチル化が発現制御に関与していることが示された。

5. プラスミドベクターを用いて、**mir-34b** と **mir-126** を強制発現すると、標的癌遺伝子である **c-Met** と **Crk** の発現がそれぞれ抑制されることが **Western blot** により示された。また、**mir-34b** が完全にメチル化されている肺癌細胞株(H2347)を脱メチル化剤処理すると、**c-Met** の発現が低下することが **Western blot** により確認された。

6. 非小細胞肺癌手術症例 99 例を用いて **mir-34b** と **mir-126** の DNA メチル化を **Methylation Specific PCR (MSP)**法と **COBRA** 法とをそれぞれ用いて解析した。96 例の評価が可能な症例のうち、**mir-34b** は 40 例(41%)、**mir-126** は 7 例(7%)でそれぞれメチル化が認められた。**mir-34b** の標的遺伝子である **c-Met** の免疫染色を行ったところ、**c-Met** の発現量と **mir-34b** のメチル化は独立しているものの、**mir-34b** メチル化陽性と **c-Met** 高発現は共に病理組織学的なリンパ管浸潤陽性と有意に相関していた。したがって、**mir-34b** のメチル化は癌浸潤能のマーカーとなることが示された。

以上、本論文はヒト非小細胞肺癌において、異常な DNA メチル化による発現制御を受ける miRNA として **mir-34b** と **mir-126** を同定し、特に **mir-34b** のメチル化は、癌浸潤能のバイオマーカーとなりうることを明らかとしている。本研究は肺癌における miRNA の発現制御機構の解明に重要な貢献をなすものであり、学位の授与に値するものと考えられる。