

論文内容要旨

論文題目

Multiple Tumor Suppressor Genes Are Increasingly Methylated with Age in Non-neoplastic Gastric Epithelia

(非腫瘍胃粘膜において多くの癌抑制遺伝子のメチル化は加齢とともに亢進する)

器官病態統御学講座

責任講座: 消化器病態制御内科学分野

氏名: 宗 幹之

【内容要旨】

癌細胞では、癌抑制遺伝子のプロモーター領域メチル化によって遺伝子発現がしばしば抑制されている。また、メチル化は癌細胞のみならず、非腫瘍組織にも検出されている。癌抑制遺伝子のメチル化を定量的に測定するため、我々はメチル化検出に特化した DNA マイクロアレイを開発した。本研究では、非腫瘍胃粘膜における癌抑制遺伝子 (*LOX*, *p16*, *RUNX3*, *TIG1*) プロモーター領域メチル化を、DNA マイクロアレイを用いて定量的に解析し、加齢に伴うメチル化率の変化を明らかにすることを目的とした。

24 剖検例の前庭部非腫瘍胃粘膜を対象とした。胃癌およびその既往のある症例は除外した。性別は男性 15 例、女性 9 例。年齢は死産児 1 例を含む 0 歳から 87 歳 (平均 52.5 歳) であった。

凍結検体より DNA を抽出しバイサルファイト処理を行った。遺伝子発現に関連するプロモーター CpG 領域を、メチル化の有無にかかわらずに増幅するプライマーを用いて増幅した。Multiplex PCR の際にフォワードプライマーは Cy5 で、リバースプライマーはリン酸で標識した。増幅後、アンチセンス鎖はハイブリダイゼーションを阻害する可能性があるため、ストランダーゼで消化した。産物を精製し、メチル化特異的プローブ、非メチル化特異的プローブが搭載されたマイクロアレイ上でハイブリダイゼーション反応を行った。マイクロアレイを洗浄後、専用の CCD カメラでスキャン、キャプチャーし、プローブの蛍光強度をコンピュータで数値化した。メチル化特異的プローブの蛍光強度を、メチル化、非メチル化特異的プローブの蛍光強度の和で除した数値から、メチル化率を算出した。

非腫瘍胃粘膜におけるメチル化率は、*LOX* では 0.0% から 77.2% (平均 15.8%)、*p16* では 0.0% から 45.8% (平均 10.0%)、*RUNX3* では 0.0% から 83.8% (平均 9.0%)、*TIG1* では 0.0% から 46.1% (平均 6.6%) であった。解析したすべての遺伝子で、年齢とメチル化率に正の相関がみられた ($P < 0.01$)。

今回解析した遺伝子では、概ね 40 代頃からメチル化が始まり、その後加齢とともにメチル化率は急峻に上昇した。これは胃癌の年齢階級別死亡率と非常によく類似しており、加齢による癌抑制遺伝子のメチル化が発癌に深く関わっている可能性が示唆された。微量の検体から多数の遺伝子のメチル化の状態を定量的に解析することによって、発癌リスク評価等に応用できる可能性がある。

平成 19 年 1 月 30 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 宗 幹之

論文題目： Multiple Tumor Suppressor Genes are Increasingly Methylated with Age in Non-Neoplastic Gastric Epithelia
(非腫瘍性胃粘膜において多くの癌抑制遺伝子のメチル化は加齢とともに亢進する)

審査委員：主審査委員

比 中 千 史



副審査委員

川 前 金 幸



副審査委員

松 本 建 二



審査終了日：平成 19 年 1 月 30 日

【 論文審査結果要旨 】

がん細胞では、プロモーター領域のメチル化を介してがん抑制遺伝子の発現がしばしば抑制されている。また、メチル化はがん細胞のみならず非腫瘍組織にも検出されており、胃がんでは非腫瘍性胃粘膜におけるがん抑制遺伝子のメチル化の程度がその発生リスクと相関している可能性が指摘されている。しかしながら従来のメチル化検出法は定量的に欠けることや検出に比較的多量の組織検体を要する等、臨床応用を考えるうえで問題点を抱えている。従って、がん抑制遺伝子メチル化を指標とした胃がん発生リスクのスクリーニングを行うためには、これらの従来法の欠点克服が必要である。このような観点から宗氏はマイクロアレイを利用することにより、がん抑制遺伝子メチル化をより定量的かつ少量の検体で検出することを試みた。

メチル化の定量的検出は以下のように行った。すなわち、バイサルファイト処理を行った DNA を鋳型として蛍光標識したプライマーを用いて PCR 増幅し、この PCR 産物をメチル化状態特異的プローブ、非メチル化状態特異的プローブとハイブリダイズさせた。メチル化率はそれぞれのプローブにハイブリダイズした PCR 産物が発する蛍光強度をもとに算出した。宗氏はこのような定量的メチル化測定を種々のがん抑制遺伝子プロモーター領域についてメチル化率が既知の DNA 標品を用いて行った。各遺伝子に対してプライマー／プローブの条件検討を行うことにより、最終的に LOX, p16, RUNX3, TIG1 の4種類について定量的メチル化測定可能なプライマー／プローブのセットを確立し、これらのプローブを搭載したマイクロアレイの開発に成功した。

宗氏はさらにこのメチル化測定マイクロアレイの妥当性を検討するため、胃前庭部非腫瘍性胃粘膜のメチル化率と加齢の関係について調査を行った。胃がん以外の死因による24剖検例を対象に検討を行った結果、LOX, p16, RUNX3, TIG1 のいずれのがん抑制遺伝子についても加齢とともにメチル化率が上昇することが確認された。この結果は従来の定性的メチル化検出法による調査結果と一致するものであり、臨床検体を用いた解析での本マイクロアレイの妥当性が実証された。

宗氏が開発したマイクロアレイは従来法に比べてサンプル所要量が6-8分の1程度で解析が可能となるためサンプル採取における生体への侵襲を著しく軽減できる。従って今後胃がん発生リスクの予想をはじめとして将来的にはメチル化の網羅的スクリーニングに応用可能な臨床的価値の高い技術と考えられる。

このように本研究において宗氏は臨床的有用性の高いメチル化マイクロアレイを独自に開発した。またこの研究成果は国際的な peer-reviewed journal に掲載されている。以上の審査結果に基づき、本審査委員会は本研究が学位(医学)の授与に値するものと判定する。

(1, 200字以内)