



Title	Restriction Landmark Genomic Scanning を用いて決定したヒト肝細胞癌におけるDNAの高メチル化領域
Author(s)	玉井, 晋吾
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41613">https://hdl.handle.net/11094/41613</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	玉井晋吾
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14516号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	Restriction Landmark Genomic Scanning を用いて決定したヒト肝細胞癌におけるDNAの高メチル化領域
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次  (副査) 教授 門田 守人 教授 米田 悅啓

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

癌細胞ではしばしばgeneticあるいはepigeneticなDNAの変化が認められる。その解析法の一つとしてrestriction landmark genomic scanning (RLGS法)がある。これはゲノムDNAを、数種の制限酵素による切断と電気泳動の組み合わせにより一枚のゲル上に二次元に展開して、約3000個のスポットに分離し、その位置および強度の変化からDNAの変化を捕らえようとするものである。ヒト肝細胞癌(HCC)症例にRLGS法を適用し、同一症例の癌部のDNAとその対照部である非癌部のDNAの展開像を比較すると、複数症例の癌部DNAにおいて5個のスポットで強度が増強し、60個のスポットで強度の減弱ないし消失が見られる。本研究では、HCCで生じているDNAの変化を明らかにするため、これらのうち、消失が見られる頻度の高いスポットをクローニングし、スポットの消失の原因となっているDNAの変化を明らかにすることを目的とした。さらにそれらの変化が生じている領域と遺伝子との関係を明らかにするため、染色体上の局在およびその塩基配列の決定を行った。

#### 【方法ならびに成績】

- 1) RLGSゲル上のスポットからのDNAフラグメントのクローニング：本研究では、16例のHCC症例中高頻度に消失ないし強度の減弱がみられた5個のスポット(#7, #58, #25, #22, #10)について解析を行った。これらのスポットが非癌部肝組織と同様に存在するヒトリンパ芽球細胞株GM06061CのDNAを用いて、クローニングを行った。スポットをゲルから切り出しDNAに溶出した後、その末端にアダプターをライゲーションし、アダプターに特異的なプライマーを用いてPCRによる增幅を行った。增幅された目的とするDNAフラグメントはアガロースゲルにて分離、回収した後ベクターに組み込んだ。
- 2) ヒトHCC細胞株を用いたDNA変化の検討：クローニングしたDNAフラグメントをプローブとして、目的とするスポットが存在するGM06061Cと、消失しているHCC細胞株のDNAを用いてサザン解析を行った。Not IとHinf Iの組み合わせで、コントロールのGM06061Cで見られるバンドがHCC細胞株のDNAにおいて上方にシフトしていた。Hinf I単独での切断では両細胞株間で差は認められず、そのサイズはNot IとHinf Iで処理したHCC細胞株のDNAにおけるバンドのサイズと一致していた。この結果からHCC細胞株のDNAではNot Iサイトにおいて切断できなくなっていると考えられた。

- 3) ヒト切除 HCC 症例を用いた DNA 変化の検討：外科切除にて得られた11症例について同様のサザン解析を行った。複数症例の癌部 DNA で、HCC 細胞株と同様の変化が見られた。
- 4) *Not I* サイトにおける点突然変異の有無の検討：*Not I* サイトにおいて切断ができなくなっている原因を明らかにするため、PCR 産物を用い *Not I* の認識配列が保存されているかどうかを検討した。その結果、認識配列は保存されており、HCC で見られた変化は *Not I* サイトにおけるメチル化に由来すると考えられた。
- 5) 他の制限酵素認識部位におけるメチル化の状態：メチル化の状態によりその切断能が異なるイソ制限酵素である *Msp I* と *Hpa II* を用いて、*Not I* 認識配列以外でのメチル化の状態を調べた。その結果から、得られたフラグメントの近傍領域は *Not I* 認識配列以外の配列においても、HCC でより高度にメチル化されていた。
- 6) 得られたフラグメントの染色体上の局在の検討：HCC でメチル化が生じている領域の染色体上の位置を FISH により検討した。フラグメント #7, #58, #25, #22, #10 はそれぞれ 16P13.1, 4q21, 1q12, 17q25, 12q13 に存在することが決定された。4q21, 1q12, 17q25, 12q13 は、今回初めて癌でのメチル化が認められた領域であった。
- 7) 5 個のフラグメントの塩基配列の決定：塩基配列を決定し、データベースへの登録の有無を調べた。フラグメント #7 は STAT induced STAT inhibitor-1 (SSI-1) の遺伝子の読みとり枠の一部と一致していた。フラグメント #58 は既報の cytokine gene cluster の配列の一部と一致していた。またフラグメント #58 の一部はコンピュータ解析にてアミノ酸をコードしている可能性が示唆されたが、現時点では対応する遺伝子は報告が認められなかった。フラグメント #25, #22 および #10 の塩基配列はデータベースに一致するものが見られなかった。

### 【総括】

ヒト肝細胞癌 DNA に RLGS 法を適用することにより、ヒト肝細胞癌で高頻度にメチル化が生じている 5 つの新たな領域を明らかにし、さらにメチル化を受けている遺伝子として STAT induced STAT inhibitor-1 (SSI-1) の遺伝子を同定した。遺伝子周辺領域に regional に生じたメチル化によりその領域の遺伝子発現が抑制されると考えられており、SSI-1 を含め、これらの領域に存在する遺伝子がメチル化により発現抑制され、ヒト肝細胞癌の形質に関与している可能性が考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

近年癌における DNA の異常について、従来から行われている genetic な変化に加え、メチル化に代表される epigenetic な変化についての研究が進められている。本研究はヒト肝細胞癌に restriction landmark genomic scanning 法を適用し、ヒト肝細胞癌で高頻度に消失しているスポットから DNA のクローニングを行い、その解析を行ったものである。その結果スポットの消失が DNA のメチル化に由来するものであることを明らかにし、ヒト肝細胞癌における新たな高メチル化のホットスポットの局在およびメチル化を受けている遺伝子として STAT induced STAT inhibitor-1 遺伝子を同定したものである。肝細胞癌の遺伝子異常を明らかにするうえで新たな知見を提示したものであり、学位を授与するに値すると考える。