

博士(医学) 小泉 圭

論文題目

Array-based identification of common DNA methylation alterations in ulcerative colitis
(潰瘍性大腸炎によく見られる DNA メチル化変化のアレイを用いた同定)

論文の内容の要旨

[はじめに]

潰瘍性大腸炎は原因不明の慢性炎症性腸疾患で、罹患年数と共に発癌率が上昇する。その発癌メカニズムは散発性大腸癌とは異なり、異形成より進展すると考えられ、炎症を伴う大腸粘膜からはその病変の同定は困難である。DNA メチル化異常は、癌抑制遺伝子の不活化により発癌に関わっているが、その変化は、癌組織のみならず、慢性胃炎や慢性肝炎等の慢性炎症性疾患の非癌部組織でも認められる。このうち発癌に関与する非癌部組織の DNA メチル化異常は、発癌の背景領域「field cancerization」と捉えられ、発癌の予測に有用と考えられる。これまで、潰瘍性大腸炎において複数の遺伝子の異常メチル化が報告されているが、ゲノム全域にわたる網羅的な検討はない。

MS-AFLP (methylation sensitive amplified length polymorphism) 法は、メチル化特異的制限酵素である NotI と PCR 法を用いて、ゲノム全域に分布する NotI 領域のメチル化を包括的に評価する方法で、網羅的メチル化異常の解析に有用であるが、検出 DNA 断片をゲル上で判定するため検出個数の制限や感度が問題であった。そこで、本研究では、MS-AFLP 法をマイクロアレイのプラットフォームとして再構築し、潰瘍性大腸炎の「field cancerization」に関わる遺伝子の同定を行った。

[材料ならびに方法]

マイクロアレイの精度の検証には大腸癌細胞株 CW-2 を使用した。遺伝子の同定には、非担癌潰瘍性大腸炎手術症例 14 症例から得られた DNA を対象材料として用い、健常者から得られた正常大腸粘膜 11 症例の混合 DNA を比較対照して使用した。MS-AFLP Array はヒト DNA に存在する全ての NotI 配列 (GCGGCCGC) 9654 か所の上流と下流それぞれに特異的な計 19306 のプローブにメチル化非特異的なプローブを 2200 か所 OligoArray2.0 で設計し、プローブを重複して計 43,012 スポットを約 2000 の品質管理用のプローブを同時に Agilent Technologies 社のアレイに配置した。DNA の調整は MS-AFLP 法に準じて行い、対象材料を Cy5、比較対照を Cy3 で蛍光標識した。アレイの実験手順と読み取りは Agilent 社のプロトコールに従った。結果は Cy5 と Cy3 の Log₂ 比を算出した。バイサルファイトシーケンス法は既報に従い行った。統計解析はフィッシャーの正確確立検定、スチューデント t 検定、マン・ホイットニー・ウィルコクソン検定等を行った。

[結果]

まず、同一 DNA を用いてセルフハイブリダイゼーションを行い、同一プローブ間の信号

強度の再現性を検討した。信号強度の弱いプローブには偽陽性が 0.12 %認められた。信号強度が全体 30 %以下のプローブを除外すると偽陽性率は 0.015 %以下となり、これらを除外値として扱う事とした。次に MS-AFLP アレイの精度を検証するため、CW-2 より得られたアレイの結果をもとに、6つのプローブを選択し、バイサルファイトシーケンス法の結果と比較した。Log₂ 比が -1 より小さいものを高メチル化、1 より大きいものを低メチル化と判定するといずれの部位でも結果が一致した。同一塩基の連続する配列をもつプローブを除外することで更に診断率を向上させることができた。14 の潰瘍性大腸炎症例ではメチル化の頻度は年齢・罹病期間・炎症の程度には関連がなかった。高頻度の高メチル化していたプローブが 133、低メチル化が 118 プローブ認められた。高メチル化は転写因子や転写調節物質などの転写過程に関する遺伝子群・RNA 結合蛋白遺伝子群・蛋白リン酸化酵素や SH2 ドメインを持つシグナル伝達関連遺伝子群に有意に見られた。一方低メチル化は特定の遺伝子との関連が少なく DNA 反復配列と強い相関を持っていた。次に、14 の症例中 2 症例以上で高または低メチル化しているプローブをクラスター解析した。5つのクラスターに分け、そのメチル化の違いから症例は 3つの集団に分けられたがそれぞれの集団の間には年齢・性別・炎症の程度・罹患年数のいずれも有意な差は認めなかった。潰瘍性大腸炎群と CW-2 を比較すると高メチル化、低メチル化ともに同一の変化を持つプローブを複数認めた。

[考察]

本研究では、ゲノム全域にわたる約 10000 箇所の NotI 領域の DNA メチル化異常を検出できる新しい MS-AFLP マイクロアレイのプラットフォームを構築した。この MS-AFLP マイクロアレイ特徴は以下の点にある。1) メチル化特異的制限酵素 NotI を利用することにより、バイサルファイト処理を省略できる。2) 全 NotI 領域をアレイに搭載することにより遺伝子の選択バイアスが抑えられる。3) NotI 領域のゲノム分布の特徴を利用する事により、遺伝子のプロモーター領域だけでなく、遺伝子内外の領域を網羅的に検索できることである。本研究では、CW-2 で MS-AFLP マイクロアレイの精度を検証し、潰瘍性大腸炎組織を用いてメチル化異常を検出した。潰瘍性大腸炎と CW-2 の間にはいくつかの一致するメチル化異常クラスターが存在する事が明らかとなり、潰瘍性大腸炎の「field cancerization」に関わるメチル化プロファイルとして、発癌の予測に有用であると考えられた。

[結論]

MS-AFLP マイクロアレイのプラットフォームを構築し、潰瘍性大腸炎のメチル化異常を検出した。潰瘍性大腸炎の「field cancerization」に関わるメチル化プロファイル同定することにより、発癌のリスク因子として臨床応用への可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

[申請者が取り組んだ研究の背景] 潰瘍性大腸炎は原因不明の慢性炎症性腸疾患で、罹患年数と共に発癌率が上昇する。その発癌メカニズムは散発性大腸癌とは異なり、異形成より進展すると考えられ、炎症を伴う大腸粘膜からはその病変の同定は困難である。DNAメチル化異常は、癌抑制遺伝子の不活化により発癌に関わっているが、その変化は、癌組織のみならず、慢性胃炎や慢性肝炎等周辺の非癌部組織でも認められる。本研究は潰瘍性大腸炎粘膜のメチル化をゲノムワイドに評価しようという試みである。

[実験方法・結果] MS-AFLP (methylation sensitive amplified length polymorphism) の原理をチップ上に再構築した Agilent Technologies 社製のカスタムアレイを用いて、非担癌潰瘍性大腸炎手術症例 14 症例の DNA、健常者から得られた正常大腸粘膜 11 症例の混合 DNA を比較対照して使用した。精度の検証に大腸がん細胞株 CW-2 を用いた。

[考察・結論] 計 19306 のメチル化特異的プローブをふくむ、43012 スポットを評価し、ゲノム全領域におよぶ 10000 箇所の NotI 領域の DNA メチル化異常についてのデータを解析することによって、高頻度高メチル化領域 133、低メチル化領域 118 を得た。前者には修復遺伝子 MPG、転写因子、SH2 ドメインをもった遺伝子など興味深いものが含まれ、この方法論が field cancerization の状況把握に極めて有用であることが示された。

以上により、本論文はユニークな網羅的メチル化検出方法を開発実践し、潰瘍性大腸炎からのがん発生など発がん過程の解明やリスク因子として応用などの可能性を示した点で、博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梶村 春彦
副査 青木 克憲 副査 渡邊 裕司