

氏 名	市 田 晃 佑
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 537 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	DNA 低メチル化異常に誘導される Satellite alpha transcript 過剰発現が引き起こす染色体不安定性についての検討
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 萩 原 弘 一 (委 員) 教 授 武 藤 弘 行 教 授 福 嶋 敬 宜

論文内容の要旨

1 研究目的

染色体の安定性が損なわれると、異常な染色体分離が促進され、発がんリスクが高まる。染色体の安定性はセントロメア領域の適切なメチル化によって調節されており、DNA メチル化レベルの低下、つまり低メチル化異常は染色体不安定性をもたらすと言われてきた。Satellite alpha transcript (SAT) はセントロメア領域を構成する Satellite alpha と呼ばれる縦列型反復配列から転写される non-coding RNA である。SAT はセントロメア領域の低メチル化異常によって過剰発現されることが報告されている。さらに、SAT の過剰発現が染色体の分配異常を誘導するという報告もある。

したがって、以下のような発がん経路の存在についての仮説を設定した：DNA 低メチル化異常によって誘導された SAT の過剰発現が染色体不安定性をもたらし、結果として発癌にいたる。本研究ではこの仮説について、*in vitro* および臨床検体の両方を用いて検証を行う。

2 研究方法

臨床検体として、45 例の乳癌患者から採取した腫瘍部組織、および同一検体内の非腫瘍部の組織（45 例のうち検体採取可能であった 35 例分）を使用した。まず、これらの組織から DNA を抽出し、バイサルファイト処理を加えた後、MethyLight 法と呼ばれるメチル化特異的 PCR 法で Satellite alpha 配列のメチル化レベルの測定を行った。これを、同時に抽出した RNA を用いた reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) で測定した SAT 発現量との相関について検討した。続いて、腫瘍組織において SAT 発現レベルが高い症例と低い症例から 4 例ずつ抽出し、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (comparative genomic hybridization: CGH) 解析を用いて、DNA コピー数異常を両症例群で比較した。

in vitro では、SAT 過剰発現を誘導するためにレンチウイルスベクターを作成し、それを正常乳腺上皮細胞にトランスフェクションした。それらの細胞の染色体不安定性を評価するために、DNA コピー数の変化および染色体分配異常をそれぞれアレイ CGH および免疫細胞化学によって調べた。また、アレイ CGH 解析の結果に関しては臨床検体での結果とも比較検討した。続いて、SAT 過剰発現が DNA メチル化レベルに及ぼす変化を調べるために、MethyLight 法を用いてトランス

フェクション前後の **Satellite alpha** 配列のメチル化レベルを測定した。

3 研究成果

臨床検体において、**SAT** 発現レベルと **Satellite alpha** 配列の低メチル化レベルには乳癌腫瘍組織だけでなく、非腫瘍部組織でも有意な相関関係が認められた。また同一症例の腫瘍組織と非癌部乳腺組織における **SAT** 発現量にも相関が認められた。さらに、**Satellite alpha** 配列のメチル化レベル以外に、**SAT** 発現レベルに関与する臨床病理学的因子は認めなかった。アレイ CGH 解析では、**SAT** 高発現群、低発現群いずれにおいても様々な染色体領域で DNA コピー数の異常が認められたが、その頻度と範囲の大きさに関して両群で有意な差を認めなかった。

in vitro では、**SAT** 発現ベクターによりトランスフェクションされた細胞は、免疫細胞化学においてコントロール細胞よりも有意に高頻度に有糸分裂異常を示した。アレイ CGH 解析では、**SAT** 過剰発現細胞でのみ DNA コピー数変化を示し、それは染色体 8 番と 20 番の長腕 (q アーム) において高頻度に認められた。この染色体 8q と 20q の変化は、臨床検体のアレイ CGH において **SAT** 高発現群でのみ認められる異常であった。一方、**SAT** が過剰発現した細胞では **Satellite alpha** 配列の低メチル化異常は認められなかった。

4 考察

これまでに **SAT** の過剰発現がヒト正常上皮細胞においても染色体不安定性を高めるとの報告はなく、本研究が最初の報告となった。またアレイ CGH 解析において、**SAT** 過剰発現細胞で特定の染色体 8q および 20q にのみ DNA コピー数の異常が認められたのに対して、免疫細胞化学では染色体変化が広範囲かつ不特定の領域に生じているような有糸分裂異常像が得られた。この違いは、広範囲の染色体の分配異常が誘導された正常細胞は細胞死が誘導され、比較的小範囲 (染色体 8q、20q) のみの異常を持つ細胞が生き残ったことによると考えられた。したがって、**SAT** の過剰発現は結果的に特定の染色体 8q および 20q の安定性を損なうということが言える。

DNA 低メチル化異常と **SAT** 高発現の関連性については過去にいくつかの癌種について報告されているが、本研究において乳癌でも認められることが明らかになった。**Satellite alpha** 配列の低メチル化異常以外に **SAT** 発現レベルに影響を及ぼす臨床病理学的因子を認めず、乳癌において **SAT** 発現レベルを調節するのはセントロメア領域のメチル化レベルであることが示唆された。また *in vitro* において **SAT** 過剰発現が **Satellite alpha** 配列のメチル化レベルには影響しないことも示され、セントロメア領域の低メチル化異常は **SAT** 過剰発現の前段階として乳癌の発癌経路に関与することが示唆された。

臨床検体のアレイ CGH 解析において、**SAT** 高発現群と低発現群の間で異常をきたした染色体の領域の大きさと数に有意差はなかったが、*in vitro* の **SAT** 過剰発現細胞でコピー数異常を認めた染色体 8q と 20q に注目すると両群の間に明確な差が生じた。すなわち、これらの領域の異常は **SAT** 低発現群ではほとんど認められず、**SAT** 高発現群でのみ頻繁に認められた。また、同染色体領域の異常は、過去の文献におけるアレイ CGH 解析でも乳癌やその他の上皮性癌で報告されており、さらに癌病変だけでなく前癌病変においても観察されるとの報告もある。これらのことから、**SAT** 過剰発現で誘導された染色体 8q および 20q の変化は発癌のイニシエーションに関与している可能性が示唆された。

5 結論

SAT の過剰発現はヒト正常乳腺上皮細胞において染色体 8q および 20q の不安定性を誘導した。さらに同領域の染色体異常は、SAT 高発現の乳癌臨床検体においても認められた。SAT の過剰発現によって誘発される染色体不安定性は乳癌のイニシエーションに関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

市田晃佑氏の研究は、癌における genome 不安定性と、satellite RNA との関連を調べる意欲的な研究である。様々な技術を用いて研究を行っており、後進研究者の模範となる立派な研究である。

市田晃佑氏は、臨床検体で satellite alpha メチル化と satellite alpha 転写量を比較し、satellite alpha 転写物高発現および低発現の臨床検体の DNA コピー数異常を検討した。次いで、正常乳腺細胞を用いて satellite alpha 転写物過剰発現による有糸分裂異常を検討し、satellite alpha 転写物の強制発現による染色体変化、メチル化レベル変化を検討した。この結果、satellite alpha 転写物の過剰発現によって誘発される染色体不安定性が乳癌のイニシエーションに関与している可能性を示した。

市田晃佑氏の行なった実験は系統的であり、satellite alpha 発現の意義を詳細に検討した優れた研究である。また、論文の質も高く、国際的な雑誌に受理されている。

これらの点より、市田晃佑氏は十分に学位に値する知識、学力、経験、そして研究能力を有すると認められる。よって、審査員全員一致で、市田晃佑氏の論文は本学学位論文として適切であり、市田晃佑は本学学位に相当すると認定した。

最終試験の結果の要旨

最初に、申請者より研究のプレゼンテーション行われ、その後審査委員による質疑応答が行われた。研究内容について、なぜ乳癌組織での検討を行ったのか、という研究の最初の動機に関して、説明が不十分との意見が述べられた。しかしながら、研究内容、使用している手法の適格性、結果の解釈に関しては、良好であるとの意見であり、ほとんどの意見は論文記載の技術的な点に関するものであった。委員から述べられた修正点を審査委員会としてとりまとめ、申請者に修正を依頼した。後日、申請者から適切に修正された論文が提出された。審査委員会は修正論文を確認し、十分な修正が回答が得られたことを確認した。

審査委員会は、申請者が研究者として十分な識見を有し、また有望な人物であることを再確認し、審査員全員一致で合格と判定した。