

氏 名	まえがわ しんじ 前 川 真 治
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	乙第12号
学位授与年月日	平成16年 8月 3日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 題 目	Coordinate downregulation of a novel imprinted transcript ITUP1 with PEG3 in glioma cell lines (グリオーマ細胞株におけるPEG3遺伝子と新規刷り込み転写物 ITUP1 の協調的発現抑制)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤 建 三 (副査) 西蓮寺 剛 難波 栄 二

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

ヒト脳腫瘍の中核をなす神経膠腫（グリオーマ）の発生、進展には複数のがん遺伝子の活性化とがん抑制遺伝子の不活性化が多段階的に関与しているモデル機序が考えられている。染色体17p、9p、10などの欠失が段階的に関わっているとされているが、19q領域のヘテロ接合性の消失（LOH: loss of heterozygosity）も多く観察され、本領域にはグリオーマの発生に関わるがん抑制遺伝子の存在が示唆されている。また近年父方染色体特異的な19q領域の欠失が認められるとの報告もありゲノム刷り込み遺伝子の関与も疑われる。これまでに我々はヒト染色体19q13.4領域に位置し父方特異的発現を呈するゲノム刷り込み遺伝子である paternally expressed gene 3 (PEG3) 遺伝子のエクソン1内に存在する CpG アイランドの DNA メチル化がヒトグリオーマ細胞株における PEG3 の発現消失に関与することを明らかにした。そこで本研究では染色体19q13.4 領域にはさらにグリオーマの発生に関与する未知の刷り込み遺伝子が存在するものと考え、遺伝子の検索を行った。

方 法

染色体移入法により作製した正常ヒト19番染色体を保持するマウスA9細胞株を用い、PEG3近辺に存在する9つの expressed sequence tags (ESTs) について RT-PCR 法による発現解析と7つの CpG アイランドのメチル化状態をメチル化感受性制限酵素またはバイサルファイト処理法を用いた PCR 法により検索した。ヒト正常組織での刷り込み状態はグリオーマ非がん部脳組織とヒト正常リンパ芽球細胞を用い遺伝子発現解析を行った。また RACE 法により PEG3 上流に逆向

きに存在する転写物の完全長の同定を試みた。さらに同定した転写物のグリオーマ細胞株における RT-PCR 法による発現解析とバイサルファイトシーケンス法による DNA メチル化状態の解析を行った。グリオーマ細胞株を DNA 脱メチル化剤である 5-aza-デオキシシチジン(5-aza-dC) とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A で処理し、同定した転写物の発現制御機構を検討した。

結 果

PEG3 近位の 3 つの EST、H80201、H78825 および AW197312 が親由来明らかなヒト正常 19 番染色体を保持する A9 雑種細胞において PEG3 遺伝子と同様に父方染色体保持株特異的な発現を呈した。また、PEG3 インترونに存在する CpG アイランドはエクソン 1 内の CpG アイランドと同様に母方染色体特異的なメチル化状態にあった。EST H80201 に同定した一塩基多型を用い、非がん部脳組織において片アレル性発現を示し、さらにヒト正常リンパ芽球様細胞株において父方特異的な発現を呈することを見出した。我々は PEG3 と head-to-head で位置するこれらの転写物を ITUP1 と命名した。RT-PCR 解析より、ITUP1 はグリオーマ細胞株において PEG3 と同様の発現パターンを示した。バイサルファイトシーケンス法解析により、各細胞株の PEG3 エクソン内 CpG アイランドのメチル化状態を詳細に検討した結果、ITUP1 と PEG3 遺伝子の発現が同時に消失していた細胞株において高度なメチル化状態にあった。また、5-aza-dC 処理により ITUP1 の活性化と CpG アイランドの脱メチル化を認めた。

考察・結論

既知の刷り込みドメインに位置し、父方発現を呈する新規の刷り込み転写物 ITUP1 を同定した。ITUP1 はグリオーマ細胞株において PEG3 と協調的に発現の低下を認めた。さらにグリオーマ細胞株において CpG アイランドの DNA メチル化状態と ITUP1 および PEG3 の発現状態とに相関が認められた。5-aza-dC 処理により ITUP1 発現の活性化を認めたがトリコスタチン A 処理では発現状態に変化をきたさなかったため本領域はヒストンのアセチル化より DNA のメチル化により発現の制御がなされている事が考えられる。よってこれらのことから刷り込みを受ける ITUP1 と PEG3 遺伝子が DNA のメチル化を介した共通の機構により制御され、グリオーマの形成に重要な役割を担っていることが示唆される。グリオーマ患者検体を用いた解析が今後重要ではあるが、細胞株においてこのような知見を見出したことは意義深い。さらにゲノム刷り込みが関連するグリオーマの病態解明のみならず、ゲノム刷り込みの発現調節機構を理解する上でも極めて重要な知見である。

論文審査の結果の要旨

本研究は神経膠腫（グリオーマ）に関連する新規刷り込み転写物の同定を目的とし、父方および母方のヒト 19 番染色体を保持したマウス A9 細胞を用い、既知の刷り込み領域に位置する EST の発現解析および CpG アイランドのメチル化状態の解析を行った。その結果、3 つの EST が父方特異的な発現パターンを示し、その上流に位置する CpG アイランドが母方特異的メチル化状態であった。既知の刷り込み遺伝子である PEG3 と逆向きに位置するこれら 3 つの EST を ITUP1 と命名した。ITUP1 は正常リンパ芽球細胞においても父方発現を呈した。グリオーマ細胞株において ITUP1 の発現解析を行い、PEG3 遺伝子と挙動をともにした遺伝子発現の消去を認めた。さらにそれらの細胞株では CpG アイランドが高度にメチル化状態にあることを明らかにした。本論文の内容は、ゲノム刷り込みの異常が関連するがんの病態解明のみならず、ゲノム刷り込みの発現調節機構を理解する上でも極めて重要な知見であり、明らかに学術水準を高めたものと認められる。