

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 山田 展久

### 論文題目

Genome-wide DNA methylation analysis in hepatocellular carcinoma.

### 論文内容の要旨

DNA メチル化は主要なエピジェネティックな変化の 1 つであり、DNA メチル化によるがん抑制遺伝子の発現抑制は、遺伝子変異と同様に腫瘍発生の機序の 1 つとして知られている。著者は肝細胞癌において DNA メチル化により発現抑制される新規遺伝子を同定することを目的として、ゲノム網羅的メチル化解析を行った。

まず臨床検体を用いて実験を行った。臨床検体は東京医科歯科大学で手術切除を行った肝細胞癌患者の、肝細胞癌組織と非癌肝組織の 47 ペア検体(discovery set 20 ペア検体、validation set 27 ペア検体)を用いた。

Illumina 社の HumanMethylation27 BeadChip アレイを用いて、discovery set の 20 ペア検体を解析した。HumanMethylation27 BeadChip アレイは、14,475 genes のプロモーター領域を含む 27,578 CpG sites の解析が可能であり、Illumina 社の GenomeStudio software による解析で、各 CpG site 毎のメチル化の程度を 0(非メチル化)から 1(メチル化)までの  $\beta$ -value とし、比率尺度で数値化できる。この解析の結果、癌部と非癌部を比較し、 $\beta$ -value の差分平均が 0.15 以上で、Benjamini-Hochberg 法で false discovery rate を補正した p 値が 0.01 未満であれば、メチル化レベルに有意な差があると判定した。この基準で判定したところ、癌部と非癌部でメチル化レベルに有意な差があったのは 2,670 CpG sites であった。そのうち 875 CpG sites では非癌部より癌部で有意にメチル化の程度が高く、1,795 CpG sites では非癌部より癌部で有意にメチル化の程度が低かった。メチル化の程度に有意差があった 2,670 CpG sites で heatmap を作成すると、癌部と非癌部ではっきりと分かれ、癌部では症例によってメチル化のパターンは多様であったが、非癌部では類似したパターンであった。

癌部で高メチル化していた 875 CpG sites の 695 遺伝子に対して KEGG パスウェイ解析を行うと、neuroactive ligand-receptor interaction、focal adhesion、vascular smooth muscle contraction、systemic lupus erythematosus の 4 つのパスウェイが抽出された。

さらなる解析を行うために、 $\beta$ -value の差分平均を基準として癌部でメチル化の程度が高かった上位 30 遺伝子をメチル化候補遺伝子として選出した。この 30 遺伝子には、肝細胞癌で DNA

メチル化により発現抑制されるがん抑制遺伝子として既に報告されている *APC*、*CDKN2A*、*GSTP1* を含んでおり、今回の検討の妥当性を示唆すると考えた。

これら既知の 3 遺伝子を除いた 27 遺伝子について、validation set 27 ペア検体を用いて MSP(メチル化特異的 PCR)による定性的なメチル化解析と qRT-PCR による定量的な mRNA 発現解析を行った。その結果、8 遺伝子(*AKR1B1*、*GRASP*、*MAP9*、*NXPE3*、*RSPH9*、*SPINT2*、*STEAP4*、*ZNF154*)がメチル化によって発現が抑制されていることが判明した。

その一例として、代謝の恒常性維持に必須の metalloreductase である *STEAP4* についてさらに詳細に検証した。COBRA 法(Combined bisulfite and restriction analysis)にて *STEAP4* のメチル化の定量的解析を行い、27 ペア検体中の 25 検体(93%)で非癌部より癌部でメチル化の程度が高いことを確認した。また、肝細胞癌の tissue microarray を用いて免疫染色を行い、非癌肝組織と比べて肝細胞癌で *STEAP4* がタンパク質レベルでも有意に低いことを確認した。さらに *STEAP4* の発現が欠損している 3 つの肝細胞癌細胞株(SNU449、Li7、HLF)に対して、5-aza-dC による脱メチル化処理を行ったところ、濃度依存性に *STEAP4* の発現が回復することを確認した。

以上、DNA メチル化の網羅的解析から、肝細胞癌における新規メチル化遺伝子(*AKR1B1*、*GRASP*、*MAP9*、*NXPE3*、*RSPH9*、*SPINT2*、*STEAP4*、*ZNF154*)を同定した。