博士論文審査結果の要旨

学位申請者　山　田　展　久

主論文　　1編

Genome-wide DNA methylation analysis in hepatocellular carcinoma.
Oncology Reports 35; 2228-2236, 2016

審　査　結　果　の　要　旨

腫瘍発生の機序として，遺伝子変異だけでなく，DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな変化も知られている. DNA メチル化によってがん抑制遺伝子の発現が抑制されることは，その機序のひとつである．肝細胞癌で，DNA メチル化によって不活性化されるがん抑制遺伝子として *APC*，*CDKN2A*，*RASSF1A*，*GSTP1* などが報告されている。しかし，肝細胞癌における DNA メチル化遺伝子の全容は明らかになっていない.

申請者は，肝細胞癌において DNA メチル化により発現が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.

手術切除を行った 20 例の肝細胞癌患者の癌組織と非癌肝組織のペア検体を対象に，Illumina 社の HumanMethylation27 BeadChip アレイを用いて，14,475 遺伝子のプロモーター領域を含む 27,578 か所の CpG 配列のメチル化を網羅的に解析した。癌部と非癌部を比較して，各 CpG 配列におけるメチル化の程度（β 値）の差分平均が 0.15 以上で，かつ 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 か所の CpG 配列であった．そのうち 875 か所では癌部でメチル化の程度が高く，1,795 か所では癌部でメチル化の程度が低かった．癌部でメチル化の程度が高い上位 30 遺伝子には既知の *APC*，*CDKN2A*，*GSTP1* が含まれていたので，このアレイ解析の結果は妥当であると示唆された。

次に，癌部で高メチル化していた 875 か所の CpG 配列に対応する 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.

さらに，癌部でメチル化の程度が高い上位 30 遺伝子のうち，既知の *APC*，*CDKN2A*，*GSTP1* を除いた 27 遺伝子を新規メチル化候補遺伝子として検証実験をした。アレイ解析とは別の 27 症例の癌部と非癌部のペア検体を対象に，メチル化特異的 PCR (MSP)によるメチル化解析と定量的 RT-PCR による 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，肝細胞癌における新規メチル化遺伝子であると示唆された.

以上が本論文の要旨であるが，肝細胞癌における新規メチル化遺伝子として *AKR1B1*，*GRASP*，*MAP9*，*NXPE3*，*RSPH9*，*SPINT2*，*STEAP4*，*ZNF154* の 8 遺伝子を同定した点で，医学上価値ある研究と認める.

平成 30 年 2 月 15 日

審査委員　教授　　髙　山　浩　一　㊞

審査委員　教授　　黒　田　純　也　㊞

審査委員　教授　　福　井　道　明　㊞