

氏 名（本籍）	うえ の しん じ 上 野 眞 二
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 2 5 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 外 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Alteration of DNA Methylation in Human Gliomas. （ ヒ ト 神 經 膠 腫 に お け る DNA メ チ ル 化 の 変 化 ）

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員	教 授 吉 本 高 志	教 授 金 丸 龍 之 介
	教 授 安 井 明	

論文内容要旨

【目 的】

ヒト神経膠腫は中枢神経系に原発する極めて悪性度の高い腫瘍であり、その遺伝子レベルからの解析が重要であると考えられる。DNA メチル化は DNA 構成塩基の一つである cytosine のピリミジン環の第 5 位の -H が -CH₃ (メチル基) に置換され 5-methyl cytosine となったものでヒトを含む高等真核生物の遺伝子 DNA を構成する唯一の修飾された塩基である。この DNA メチル化の持つ機能の一つとして遺伝子の発現を転写の段階で制御している可能性が示唆されている。本研究では DNA メチル化に注目し、ヒト神経膠腫における全ゲノム中のメチル化した cytosine の含量、特定の遺伝子として代表的な癌原遺伝子および癌抑制遺伝子での DNA メチル化の変化を検討する。また、この DNA メチル化を変化させることにより神経膠腫細胞の増殖抑制の可能性を *in vitro*, *in vivo* で検討する。

【方法および結果】

ヒト神経膠腫の DNA メチル化の変化 : (i) 全ゲノムにおける DNA 構成塩基に占めるメチル化した cytosine を HPLC で解析した。正常脳組織と腫瘍組織の間に有意差は認められなかった。(ii) *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, *L-myc*, *EGFR*, *RB*, *p53* 遺伝子の DNA メチル化の変化を Southern blot 法により検索した結果、*c-fos*, *c-myc*, *p53* に DNA メチル化の変化が認められ、*c-myc* および *p53* では 1/3 の例に、*c-fos* 遺伝子では全例に変化が認められた。この *c-fos* 遺伝子については DNA メチル化の状態を、5' 上流領域、エクソン 1 周辺領域、エクソン 2~3' 下流領域に分けて検討した。結果として以下のことが明らかとなった。(i) 5' 上流領域とエクソン 1 周辺領域では本研究で検討し得た範囲では脱メチル化しており正常脳組織と腫瘍組織に違いは観察されなかった。(ii) エクソン 2~3' 下流領域では正常脳組織と腫瘍組織の間に DNA メチル化の変化が認められた。正常脳組織では個体によらず DNA メチル化は一様であった。神経膠腫では全例で、この領域の DNA メチル化に変化を認めた。変化はメチル化の上昇・低下の両方向への変化を認めたが、各 grade の平均では悪性度を増すに従い DNA メチル化は低下する傾向を示した。

DNA メチル化を変化させることによる神経膠腫細胞の増殖抑制の可能性を探るため、5'-aza-2'-deoxycytidine (5azaCdR : DNA メチル化阻害剤) の影響を、代表的なヒト神経膠腫細胞株 U-87MG, T98G で検討した。その結果、*in vitro* における増殖抑制効果が以下の通り示された。(i) MTT 法および細胞増殖曲線による評価では 5azaCdR は濃度依存性に U-87MG と T98G の増殖を抑制した。また、5azaCdR 処理によりゲノムの DNA メチル化の低下を認めた。

(ii)U-87MG のヌードマウス皮下移植モデルに対し、2.0mg/kgの 5azaCdR を 3 日連続腹腔内投与 14 日休薬を 1クールとして 3クール治療を行った。投与群の腫瘍体積を対照群と比較すると Mann-Whitney U テストの両側検定で $P < 0.01$ と有意差が認められ、また相対腫瘍増殖抑制率も 50%以上を示した。ヒト神経膠腫細胞のヌードマウス皮下移植モデルにおいても 5azaCdR の抗腫瘍効果が有効であることが示された。

【考 察】

ヒト神経膠腫に高頻度に認める遺伝子上の変化として *c-fos* 遺伝子の DNA メチル化の変化を見出し、その内容について明らかにした。現在までにヒト神経膠腫の多段階発癌説にかかわる遺伝子上の変異としては第 17 番、第 10 番染色体の欠失、p53 癌抑制遺伝子の点突然変異等が報告されている。*c-fos* 遺伝子の DNA メチル化の変化が low grade astrocytoma, anaplastic astrocytoma, glioblastoma multiforme を問わず全ての grade の神経膠腫に認められた事実より *c-fos* 遺伝子の DNA メチル化の変化はヒト神経膠腫の発生の過程の比較的初期の遺伝子上の変化の一つではないかと考えられた。さらに DNA メチル化阻害による抗腫瘍効果を *in vitro*, *in vivo* で示した。悪性脳腫瘍であるヒト神経膠腫の治療法として DNA メチル化を介する新しいアプローチを示唆するものと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

近年、癌の治療成績は、診断および治療法の改善に伴い飛躍的に向上している。しかし、他臓器の癌の予後が改善されている中において、中枢神経系に原発する癌であるヒト神経膠腫では、特に悪性度の高い anaplastic astrocytoma, glioblastoma multiforme では現在の集学的治療をもってしても5年生存率はそれぞれ20%、7%であり、最終的に腫瘍死を免れえないのが現状である。この予後が非常に不良なヒト神経膠腫について、その遺伝子上の病態を分子生物学的に把握することは、今後新たな治療を模索する上で大いに有意義である。

本研究ではヒト神経膠腫についてDNAメチル化に注目し、遺伝子上の病態の解明を試みている。DNAメチル化とはDNA構成塩基の一つであるcytosineのピリミジン環の第5位の-Hが-CH₃（メチル基）に置換され5-methylcytosineとなったものでヒトを含む高等真核生物の遺伝子DNAを構成する、唯一の修飾された塩基である。DNAメチル化の持つ機能は未だ明らかではないが、遺伝子の発現を転写の段階で制御している可能性が示唆されている。

このDNAメチル化の変化を、分子生物学的手法も用いて、ヒト神経膠腫のゲノム全体のレベルおよび特定の遺伝子として代表的な癌原遺伝子および癌抑制遺伝子について検討を加えている。その結果、遺伝子産物がDNA結合蛋白であり、他の遺伝子の転写調節因子にもなっているc-fos遺伝子において、正常脳組織では全てが一様なDNAメチル化を正確に保持しているのに対し、low grade astrocytoma, anaplastic astrocytoma, glioblastoma multiformeの神経膠腫では全例にDNAメチル化の変化を見出し、詳細に検討している。

現在までに、ヒト神経膠腫の多段階発癌説にかかわる遺伝子上の変化として、第17番、第10番染色体の欠失、p53癌抑制遺伝子の突然変化等が報告されている。本研究に示した、c-fos遺伝子のDNAメチル化の変化は、臨床分類上比較的良性であるlow grade astrocytomaの段階で、既に全例に認められており、ヒト神経膠腫の多段階発癌過程において、正常神経膠細胞から癌化へ至る段階で観察される遺伝子上の、初期の変化であることを示唆するものである。

また、DNAメチル化を介する神経膠腫細胞の増殖抑制効果の基礎的検討を加え有効性を提示した。今後、DNAメチル化を制御することによるヒト神経膠腫の治療の可能性を示唆するものである。

以上より本研究は学位論文に値するものとする。