

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 相場 俊樹

本研究は、微弱なエピゲノム変化を検出できる精度と感度を有する新たな CpG メチル化頻度プロファイリング手法「MSD-AFLP 法」を開発し、その解析能力を組織間比較により評価するとともに環境毒性学および衛生学研究への適用を試みたものであり、下記結果を得ている。

1. 本新手法を用いて 3 種類の組織（海馬、腎臓、肝臓）を比較解析し、16 種の選択プライマーセットで検出された 2,449CpG サイトから、Tissue-specific differentially methylated region (tDMR) と考えられる多数の CpG を検出した。
2. ゲノム塩基配列情報の整備が良好なヒトおよびマウスを対象として、MSD-AFLP 法により検出されるメチル化 CpG のゲノム塩基配列上の位置を予測あるいは確認する研究支援情報処理システムを開発した。このシステムを用い、計 11 個のメチル化 CpG の位置を検索して、実際にゲル電気泳動で分離分取した当該 CpG 含有ゲノム DNA の塩基配列と照合したところ、11 のうち 8 は検索結果と一致した。また、MSD-AFLP 法は 1 回の解析で全 CpG（約 20,000,000）の約 0.3%（55,181-CpG）を測定できるため、次世代シーケンサーを利用する各種次世代メチル化解析に比べて費用対効果が優れると考えられる。
3. 組織間比較を行った 11CpG のメチル化頻度（MF）値を、現在最も高感度かつ定量的とされる MSRE-PCR 法でも測定し、MSD-AFLP 法との整合性を評価した。その結果組織間のメチル化頻度比は、11 部位全てにおいて MSD-AFLP 法で得た蛍光強度比と極めて近く、新手法と MSRE-PCR 法とが整合性のあるメチル化測定データを与えることが判った。さらに、両手法の測定のばらつきの程度もほぼ同等に小さく、この新手法は精度の高い網羅解析法であることが示された。
4. 組織間比較を行った 11CpG のうち 2 CpG を対象として選び、BSGS 法で 3 種類の組織の DNA の CpG メチル化状態を解析した。対象 CpG の MF 値は、技術基盤を異にする BSGS 法と MSRE-PCR 法そして MSD-AFLP 法の 3 手法間でほぼ一致し、測定結果を相互に補強する関係であった。
5. 検出感度と検出能力を評価するため、Tukey 検定により有意性が認められた 2 組織間で MF 値の差（difference of MF, DMF）と MF 値の比（ratio of MF, RMF）を用いて、DMF の絶対値と $\log_2\text{RMF}$ の絶対値を算出した。その結果、MF 値の比が 1.1 倍以内かつ MF 値の差が 5%以下を示す 24 個の有意な違いを検出でき、感度が高いことが示唆された。またこのうちの 1 つを MSRE-PCR 法で測定したところ、本手法で検出された微細

変化は MSRE-PCR 法結果と相関していた。

6. 低用量でメチル化 CpG を変化させることがすでに多く報告されている環境化学物質である BPA にこの手法を適用したところ、BPA 曝露マウスの海馬で有意な変動は確認できなかった。高精度かつ高感度な解析方法である新手法で解析を行ったにも関わらず低用量 BPA 胎生期曝露によるメチル化変化は認められなかったことから、BPA による海馬エピゲノム変化は今回の条件では極めて少ないか、ほとんどないものと考えられた。

以上、本論文は新たに開発したゲノムワイド解析法が高い精度と感度で CpG 部位の DNA メチル化頻度の差を捉えられことを明らかにした。本研究はこれまで困難であった環境毒性学や衛生学分野での環境因子による微細なエピジェネティック変化検出や、発がんのエピジェネティックマーカーを探索するための有用なツールとなることが期待され、学位の授与に値するものと考えられる。