

審査の結果の要旨

氏名 遠山和博

近年、DNA 脱メチル化関連遺伝子の変異が骨髄系腫瘍で集積していることが報告されているが、その DNA 脱メチル化によるエピジェネティック制御機構と骨髄系腫瘍形成の関係の機序は明らかになっていない。

我々は、2012年に Cell 誌に報告された β -グリコシルトランスフェラーゼと合成 TET 蛋白の酵素反応に引き続きバイサルファイト反応をおこなうことで DNA 脱メチル化機構において産生される 5-ヒドロキシメチルシトシンの定量を可能にした Tet-assisted bisulfite sequencing (TAB-seq) の技術 (Yu M et al. Cell 2012) を、バイサルファイト法を用いたビーズアレイ解析である HumanMethylation450 BeadChip (Illumina 社、Infinium450K) に応用することで、多数検体において 5-ヒドロキシメチルシトシンを一塩基レベルで定量的に解析する系の確立を試みた。これまでこのような系は報告されておらず、我々はこの系を” Tet-assisted bisulfite epigenotyping with BeadChip (TAB-chip)” と名付けた。

その解析系を用いて、DNA 脱メチル化関連遺伝子である TET2、IDH1 および IDH2 遺伝子変異を有する白血病細胞の DNA ヒドロキシメチル化解析を行うことで、これまでに明らかになっていない DNA 脱メチル化によるエピジェネティック制御機構と骨髄系腫瘍形成の関係を解明することを目的に研究を行った。

1. ビーズアレイ法を用いた DNA ヒドロキシメチル化解析系の確立

1.1

初めに TAB-chip に使用する各種酵素による変換効率を、既存の TAB-seq の系を用いることで検証したところ、解析に十分と考えられる変換効率を得られていることが確認できた。

1.2

次に我々は H1 ヒト胚性幹細胞のゲノム DNA をサンプルとして、既存の TAB-seq や hMeDIP-seq で得られた 5hmC 解析データと TAB-chip で得られた 5hmC 解析データを比較した。TAB-chip による解析が既存の解析法と相関が得られていることが示され、TAB-chip が 5hmC 検出法として十分使用できることが確認できた。

2. 急性骨髄性白血病症例における脱メチル化解析

2.1

TAB-chip の系を用いて TET2 遺伝子変異のある AML 症例 10 例、IDH1/2 遺伝子変異のある AML 症例 8 例、およびそのどちらの変異もない AML 症例 9 例の DNA ヒドロキシメチル化をゲノムワイドに解析した。TET2 もしくは IDH1/2 の遺伝子変異のある症例群はそれらの遺伝子変異のない症例群と比べて DNA ヒドロキシメチル化の低下、DNA メチル化の増加している傾向が見られた。DNA ヒドロキシメチル化の低下および DNA メチル化の増加が起こっているシトシン-リン酸-グアニン（以下、CpG）ジヌクレオチドのゲノム上の部位を解析すると、CpG アイランドや転写開始点から比較的離れた部位でその存在割合が高いことが分かった。また、クロマチン修飾との関係を見ると、エンハンサー部位においてその存在割合が高く、TET2 変異や IDH1/2 変異による脱メチル化異常がエンハンサー部位でより顕著にみられることが確認できた。

2.2

TET2 もしくは IDH1/2 の遺伝子変異のある症例群で DNA ヒドロキシメチル化の低下および DNA メチル化の増加が起こっている CpG と関連付けられた遺伝子の総数は、TET2 変異群で 301 個、IDH1/2 変異群で 4177 個であった。興味深いことに、TET2 変異群で抽出された遺伝子のうち、そのほとんど（281 遺伝子/301 遺伝子、93.4%）が IDH1/2 変異群でも抽出されてきた遺伝子であった。この共通の遺伝子 281 個について遺伝子オントロジーで解析を行った結果、アポトーシス関連遺伝子、シグナル伝達経路関連遺伝子が濃縮していることがわかった。

以上、我々はこれまでに行われていなかった合成 TET タンパクによる酵素反応とビーズアレイ法を併用することで、一塩基レベルでの DNA ヒドロキシメチル化を効率よく検出できる系を確立した。

新しく確立した系を用いて脱メチル化関連遺伝子変異をもつ AML 症例群の DNA ヒドロキシメチル化をゲノムワイドに解析することにより、それらの遺伝子変異による脱メチル化異常がエンハンサー部位でより起こりやすいことを示した。また、脱メチル化異常の起こる標的遺伝子の解析により、脱メチル化異常が骨髄系腫瘍原性を持つ機序として、アポトーシス関連遺伝子、シグナル伝達経路関連遺伝子などの機能異常が深く関与している可能性が示唆された。

以上の知見はこれまで明らかにされていなかった、脱メチル化異常と骨髄系腫瘍原性の機序を解明するために重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。