

志垣 博信 氏の在学期間短縮に関わる学位論文審査の要旨

論文題目

上部消化管癌における LINE-1 メチルレベルの網羅的検討
(Comprehensive analysis of LINE-1 methylation level in esophageal squamous cell carcinoma and gastric cancer)

DNA のメチル化は、遺伝子発現の制御やゲノムの安定性に関わる、エピジェネティックなメカニズムである。癌細胞における DNA メチル化の異常には、癌抑制遺伝子の不活性化およびゲノム全体の低メチル化が知られている。前者では、特定の遺伝子のプロモーターにある CpG アイランドが局所的に高メチル化になり、その発現が抑制される。後者は、ゲノム不安定性に関わると考えられ、レトロトランスポゾン long interspersed nucleotide element 1 (LINE-1) のメチル化のレベルがその指標になっている。ゲノム全体の低メチル化は、種々の癌において予後との関連性が報告されてきた。本論文では、①食道癌（扁平上皮癌）症例の癌部と非癌部における LINE-1 メチル化レベル、その臨床的なリスク因子との関係、また、②胃癌における LINE-1 メチル化レベルと生命予後との関係を明らかにすることを目的とした。

方法として、食道癌を有しない剖検症例の食道上皮の臨床検体（計 20 例）、術前化学療法施行例を除外した食道癌の臨床検体（計 109 例）、胃癌の臨床検体（計 203 例）を対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックからマクロダイセクションで小組織片を採取し、ゲノム DNA を抽出してバイサルファイト（重亜硫酸ナトリウム）処理を行った後に、選択的なプライマーを用いたパイロシーケンス法によって LINE-1 の 4 箇所の CpG 配列のメチル化解析を行い、臨床的な特徴やリスク因子との関連性を解析した。

結果として、解析した食道癌および胃癌の症例において、非癌部に比べて、癌部の LINE-1 のメチル化レベルは有意に低かった。食道癌症例の非癌部上皮での LINE-1 メチル化レベルは、食道癌を有しない剖検症例の食道上皮と比べて、有意に低値を示した ($P=0.017$)。しかも、食道癌症例の非癌部上皮の LINE-1 低メチル化と喫煙歴との間には、有意な相関を認めた（喫煙期間 $P=0.014$ ；一日喫煙本数 $P=0.0017$ ；年間喫煙箱数 $P=0.0002$ ）。LINE-1 メチル化レベルは、飲酒や診断時の年齢とは相関しなかった。また、胃癌症例の LINE-1 低メチル化群は、メチル化状態が保たれていた群と比べて、全生存期間が有意に短く、予後不良であった ($P=0.029$)。

審査において、(1) LINE-1 配列の特徴とメチル化解析部位；(2) バィサルファイト法の原理と効率評価；(3) パイロシーケンス法の特徴；(4) 癌部と非癌部における LINE-1 メチル化の状態；(5) 食道癌の発生における喫煙の影響；(6) 食道癌の前癌病変のメチル化異常；(7) LINE-1 低メチル化と遺伝子プロモーターの高メチル化との関係；(8) LINE-1 低メチル化のメカニズムの考察；(9) 食道癌の多段階発生モデル；(10) LINE-1 メチル化レベルの分類法；(11) LINE-1 メチル化とその発現の関係；(12) マクロダイセクション法の評価、などについて活発な質疑が行われ、申請者からは適切な回答が得られた。

本論文は、食道癌症例の非癌部上皮において、LINE-1 低メチル化が喫煙歴と関連することから、エピジェネティックな発癌過程の指標になる可能性を明らかにした。また、胃癌症例の LINE-1 低メチル化群では全生存期間が短いことから、LINE-1 メチル化レベルは予後の予測因子になることを示した点で、学位の授与に値すると高く評価された。

審査委員長 細胞医学担当教授

中尾 光善