

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	類家 慶直
論文題目	トランスクリプトーム・メチローム解析に基づく網羅的遺伝子機能探索に関する研究		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>マイクロアレイを用いた遺伝子発現(トランスクリプトーム)解析や高速シーケンサー等の網羅的遺伝子解析技術を用いることで遺伝子の機能を探索し、有用な創薬標的を同定するゲノム創薬アプローチが注目されている。本研究では miRNAとエピジェネティクスについて、マイクロアレイおよび高速シーケンサーを用いてゲノムワイドな解析手法の開発を行った。</p> <p>本研究ではまず、近年新たな細胞機能制御機構として注目されているmiRNA遺伝子群について、様々なヒト培養細胞株におけるトランスクリプトーム解析を用いる機能探索手法を開発した。本研究では16種のヒト株化細胞に於いて148種類のmiRNA発現をRT-PCRにより取得し、同時にそれら細胞群の網羅的なmRNA発現解析をGeneChipにより実施し、これらの相関を検討した。既に多数の標的遺伝子が同定されているmiR-124aについて、miR-124aと既知標的遺伝子との発現の相関を評価した結果、既知標的遺伝子群は有意に逆相関関係を示し、miRNA-mRNA間の相関解析は、miRNAの標的探索に有用であることが示された。さらに、各miRNAと逆相関性を示す標的遺伝子候補群の機能をGene Ontologyにより解析した。このアプローチは広くmiRNAの標的遺伝子探索、更には機能探索に有用であると考えられた。以上の方法論は、新規創薬標的として注目されるmiRNAについて、その候補遺伝子や機能を効率良く探索を行うアプローチと考えられる。</p> <p>次に、エピジェネティクスにおいて重要なゲノムメチル化について、網羅的なメチル化領域(メチローム)解析法を開発し、更にはがんにおけるメチロームを理解する目的でその解析法を用いて乳癌細胞株を解析した。本研究では抗メチル化DNA抗体を用いたバイアスのないメチル化DNA断片の特異的選択と高速シーケンサーによる網羅的な配列決定法を組み合わせることによって、メチル化領域を網羅的に同定するアプローチを開発した。数種の乳癌細胞株のメチロームを解析したところ、全ての乳癌細胞株においてはゲノム全体の広範な脱メチル化が顕著であった。また、CpG配列の密度や遺伝子の密集した領域においては乳癌細胞株に特異的なメチル化の変異が検出された。さらにMCF7に対しTGFβ/TNFαを処理することにより誘導されるEpithelial-to-Mesenchymal転位(EMT)において、変化したDNAメチル化パターンを解析し、EMTではMCF7のCpG密度の高い領域では脱メチル化が亢進するなどの特徴的な変化を示し、遺伝子コード領域で細胞型特異的なメチル化パターンの変化を示した。</p> <p>以上、本研究ではトランスクリプトーム解析によるmiRNAの機能解析手法と、高速シーケンサーを用いた多検体メチローム解析手法を開発した。本研究の成果は新規創薬標的としてのmiRNAの機能探索、およびメチロームによる遺伝子発現制御機構の解析に応用されることが期待される。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、複数種のヒト培養細胞株における網羅的な遺伝子発現と、ゲノム全体のDNAメチレーションを網羅的に解析する手法の開発に関する論文である。いずれの研究も、生物学的に未開拓とされる非翻訳RNAやエピジェネティクスという研究領域に対し、ゲノム網羅的な解析手法を適用することによって、有用な研究の基礎を築いた点が評価できる。また、これまでの研究手法では解析困難であった未知の遺伝子の機能や、乳がんにおけるゲノムワイドなメチレーションの変化について、新たな知己をもたらしたものである。

申請者はマイクロアレイ技術による網羅的な遺伝子発現解析情報を用いて、マイクロRNAという創薬標的としても有望視される遺伝子群について、その機能解析を目的として解析を行っている。マイクロRNAがその標的遺伝子の発現を抑制する性質から、両者の発現量の逆相関性を示しやすいことを明らかにしており、これを利用して、あらゆるマイクロRNAについて、標的遺伝子を絞り込む独自の手法を考案している。これにより全く機能未知のマイクロRNAについても標的遺伝子とその機能を推定している。また、この論文で解析された各細胞株における網羅的なマイクロRNA発現データは、マイクロRNA機能解析実験において有益な情報を提供するものであり、先の機能予測結果と併せて、今後のマイクロRNA機能解析研究を大いに推進することが期待できる。

次に申請者は、近年技術進歩の著しい高速シーケンサーを利用することで、ゲノム全体のDNAメチレーションを網羅的に評価する実験系を構築し、乳がんゲノムに適用した。従来のエピジェネティクス解析では、一部の遺伝子プロモーターのみが解析の対象となっていたが、本研究によりはじめて、真にゲノムワイドなDNAメチレーションの変化を、高い感度と分解能で解析することに成功している。さらに、詳細な解析から、乳がん細胞株では、遺伝子プロモーターだけではなく、エキソンやイントロンといった領域に広いメチレーションの変化があることを初めて明らかとし、これらの領域のメチレーションが実際に遺伝子の発現と相関していることも明らかにした。また、申請者は上皮様の乳がんが悪性化の進行に伴って広く見られる間葉様の形態への変化に着目し、この前後のDNAメチレーションの変化について解析している。その結果、特に遺伝子の周辺で細胞株の形態と関連したDNAメチレーションの変化が起きていることを明らかにした。これらの研究は乳がんにおけるDNAメチレーションの包括的な理解に寄与するとともに、乳がんリスクの評価などに応用されることが期待できる。

以上、本研究により開発された新規な実験手法および情報解析手法の開発はポストゲノミクス研究を大いに推進し、医薬の創成に寄与する重要な基礎を築くものといえる。

よって本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成22年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結

果、合格と認めた。