

氏名	ファン 范	ジュン 瑤
学位(専攻分野)	博士(医学)	
学位記番号	医博第2929号	
学位授与の日付	平成18年3月23日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻	
学位論文題目	Halogenated Thymidine Analogues Restore the Expression of Silenced Genes without Demethylation (ハロゲン化チミジン化合物はDNAメチル化には影響を与えず遺伝子のサイレンシングを解除する)	
論文調査委員	(主査) 教授 武田俊一 教授 下遠野邦忠 教授 武藤 誠	

論文内容の要旨

がん細胞では癌抑制遺伝子の転写がDNAメチル化などの後成的変化により抑制(サイレンシング)されており、発がん過程で重要な働きをしていることが明らかになっている。DNAメチル化阻害剤は、抗腫瘍効果を有することが報告されている。しかし後成的な変化を標的とした薬剤の開発は十分とは言えない状況である。

この研究は新規抗サイレンシング剤の同定を目的とし、レトロウイルスベクターを利用したスクリーニングシステムを樹立した。ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとしてマウス白血病ウイルスベクターに挿入し組み換えウイルスを作製後、細胞株(K562, MCF7)に感染させた。薬剤選択後、クローニングを行い、ルシフェラーゼの発現が抑制されており脱メチル化剤である5-aza-deoxy-cytidine (5-aza-dC)で発現が回復するクローンを選別した。得られたクローンをを用い核酸系化合物をスクリーニングした結果、抗サイレンシング効果を有するハロゲン化チミジン化合物を同定した。それらの化合物は、サイレンシングされたレトロウイルスプロモーターだけではなく、MCF7細胞においてメチル化により発現抑制されているglutathione-S-transferase 1遺伝子の発現も回復させることが明らかとなった。これらのハロゲン化チミジン化合物は5-aza-dCとの併用により相乗作用を示した。次に、発現回復効果のメカニズムを検討するために、プロモーター領域のメチル化の状態について調べたところ、レトロウイルスプロモーター、内在性遺伝子プロモーター領域共にDNAメチル化の変化は認めなかった。このことからハロゲン化チミジン化合物の標的はDNAメチル化ではなく、他に存在することが示唆された。次にハロゲン化チミジン化合物がメチル化CpG結合タンパク質の結合に影響を与えているかを検討するためにチミジンにプロモ基を有するオリゴヌクレオチドを合成し、そのmethyl-CpG binding domainとの結合性を検討したが、影響はみられなかった。Chromatin immuno-precipitation assayを用いてヒストン修飾を解析した結果、ハロゲン化チミジン化合物により、レトロウイルスのプロモーター領域におけるアセチル化ヒストンH3が増加すると共にH3K9メチル化が減少することが明らかとなった。

以上の結果からハロゲン化チミジン化合物はDNAメチル化自体には影響を与えずヒストン修飾レベルで遺伝子のサイレンシングを解除することが明らかとなった。ハロゲン化チミジン化合物が新規機序による抗癌剤のリード化合物であることを示すだけでなく、DNAメチル化と転写抑制の分子機序を明らかにするツールとなるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

がん細胞では癌抑制遺伝子の転写がDNAメチル化などの後成的変化により抑制(サイレンシング)されており、発がん過程で重要な働きをしていることが明らかになっている。この研究では抗サイレンシングを有する新規化合物の同定を目的とし、レトロウイルスベクターを利用したスクリーニングシステムを樹立した。得られたクローンをを用い核酸系化合物をスクリーニングした結果、抗サイレンシング効果を有するハロゲン化チミジン化合物を同定した。これらのハロゲン化チミジン化合物は5-aza-dCとの併用により相乗作用を示した。発現回復した遺伝子のプロモーター領域にDNAメチル化の変

化は認めなかったことからハロゲン化チミジン化合物の標的は DNA メチル化ではなく他に存在することが示唆された。またハロゲン化チミジン化合物はメチル化 CpG 結合タンパク質の結合には影響を与えなかった。クロマチン免疫沈降法を用いてヒストン修飾を解析した結果、ハロゲン化チミジン化合物によりレトロウイルスベクターのプロモーター領域におけるアセチル化ヒストン H3 が増加すると共に H3K9 メチル化が減少していた。以上の結果からハロゲン化チミジン化合物は DNA メチル化自体には影響を与えずヒストン修飾レベルで遺伝子のサイレンシングを解除することが明らかとなった。

以上の研究は抗サイレンシング作用を有する新規抗癌剤の開発に貢献し転写抑制の分子機序解明に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年11月2日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。