

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	山田 晴美
論文題目	ARID1A loss-of-function induces CpG island methylator phenotype (ARID1A 機能異常が CpG アイランドメチル化形質を誘発する)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>DNA メチル化などエピゲノムの異常は、ゲノムの突然変異とともに癌の発生や性質に深く関わる。CpG アイランドメチル化形質 (CpG island methylator phenotype : CIMP) は、癌細胞において CpG アイランドが多数メチル化されている現象を指し、胃癌・大腸癌・膠芽腫など様々な癌種で報告されている。CIMP は、予後や薬剤感受性など癌の臨床的特徴と相関し、癌治療戦略において重要な形質である。しかし、膠芽腫や大腸癌を除く癌では、その誘発機構は不明である。</p> <p>胃癌では、EBV 関連胃癌は高度な CIMP を示すことが多く、クロマチンリモデリング因子 SWI/SNF 複合体の構成因子のひとつである <i>ARID1A</i> の変異頻度が高い。しかし、SWI/SNF 複合体の機能異常が CIMP を誘発するのかについては明らかではない。そこで本研究では、SWI/SNF 複合体、なかでも <i>ARID1A</i> の機能異常が CIMP 誘発の原因になっているのかを明らかにすることを目的とした。</p> <p>まず、胃癌臨床検体 41 例について、71 個の癌関連遺伝子の変異解析とゲノム網羅的メチル化解析を行った。その結果、CIMP 陽性群では <i>ARID1A</i> の変異が多く、CIMP 陰性群では少ないことがわかった [CIMP 陽性群 (5/17) vs CIMP 陰性群 (0/24); <math>p = 0.0083</math>]。 <i>ARID1A</i> 変異のある 5 例のうち 4 例は EBV 陽性であった。そこで、EBV 感染の影響を受けない癌種で TCGA データを使用して同様の解析を行い、子宮内膜癌 [CIMP 陽性群 (36/49) vs CIMP 陰性群 (5/25); <math>p = 1.65 \times 10^{-5}</math>] や大腸癌 [CIMP 陽性群 (10/26) vs CIMP 陰性群 (8/51); <math>p = 0.044</math>] でも同様の相関を認めた。このことから、<i>ARID1A</i> の機能異常が CIMP の原因であることが示唆された。</p> <p>実験的に立証するために、正常細胞株 (293FT 細胞と GES1 細胞) を用いて CRISPR-Cas9 システムにより <i>ARID1A</i> ノックアウト細胞を樹立し、長期培養後にゲノム網羅的メチル化解析を行った。その結果、<i>ARID1A</i> ノックアウト細胞では、CpG アイランド内外で DNA メチル化異常が誘発され、培養期間依存的にその数が増加することが示された (293FT 細胞 : 0 週 2,116 領域、4 週 3,481 領域、20 週 5,816 領域)。</p> <p>更に、<i>ARID1A</i> 不活化による DNA メチル化誘発の分子メカニズムを解明するために、DNA メチル化関連酵素 (DNA メチル化酵素および DNA 脱メチル化酵素) の発現を解析したが、<i>ARID1A</i> ノックアウトによる発現変化は認めなかった。そこで、DNA メチル化のプレマークである H3K27me3 の変化をクロマチン免疫沈降により解析したところ、親細胞で元々 H3K27me3 が付いていた部位および <i>ARID1A</i> 不活化により H3K27me3 が増加した部位に DNA メチル化が誘発されることがわかった。</p> <p><i>ARID1A</i> を構成要素に含む SWI/SNF 複合体は H3K27me3 のメチル化酵素である <i>EZH2</i> と競合することが知られており、SWI/SNF 複合体の機能喪失が <i>EZH2</i> 活性を上昇させ、H3K27me3 の獲得によりその領域のメチル化感受性が上昇すると考えられた。</p> <p>以上、<i>ARID1A</i> の機能異常が CIMP を誘発することが明らかとなった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

胃癌や大腸癌など消化器癌では、CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) の存在・意義に関して国内外で多数の研究が報告されている。しかし、膠芽腫など一部を除き、ほとんどの癌種において CIMP 誘発機序は解明されていない。その誘発機序解明は、新たな消化器癌予防・治療標的の同定につながる可能性がある。本研究はその解明を目的とした癌予防・治療戦略上重要な研究である。

申請者は、*ARID1A* 不活化によるゲノムのメチル化感受性変化の視点から、*ARID1A* 変異陽性癌における CIMP 誘発機序を実験的に解明した。具体的には、まず臨床検体を用いてゲノム網羅的メチル化解析と癌関連遺伝子の変異解析を行い、胃癌・大腸癌・子宮内膜癌において、CIMP 陽性群には *ARID1A* 変異陽性癌が多いという関連性を明らかにした。次に、細胞株を用いて *ARID1A* ノックアウトにより DNA メチル化異常が誘発されることを証明した。さらに、クロマチン免疫沈降法および次世代シーケンスを用いて、*ARID1A* 不活化により DNA メチル化のプレマークである H3K27me3 の局在変化が起こり、H3K27me3 が多い領域に DNA メチル化が誘発されることを示した。

以上の研究は、*ARID1A* 不活化と CIMP 誘発の関係を明らかにし、癌予防開発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、令和 4 年 8 月 31 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。