

別紙様式第3号

論 文 要 旨

論文題目

Age Related Changes in 5-methylcytosine Content in Human Peripheral Leukocytes and Placentas: an HPLC-based Study.

(ヒト末梢血および胎盤における5-メチルシトシン含量の加齢変化について:高速液体クロマトグラフィー(HPLC法)を用いた研究)

氏 名 島袋盛洋 (印)

目的：本論文は、機能性精神疾患へのエピジェネティクスの関与の有無を検討する研究課題の第一段階を取り扱うものである。ここでは、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）がメチル化の集団解析に適用可能かどうか、マウスやラットで見られるDNAメチル化の加齢減少がヒト末梢白血球DNAでも見られるか、そしてどの程度の変化であるかなどの基礎データを得ることを目的とした。また、エピジェネティクスが重要な役割を果たす発現制御機構（例えば、インプリンティングやX染色体不活化等）で、しばしば他の組織とは異なるユニークな現象が見られる胎盤についてのメチル化情報を得ることもこの論文課題の目的の一つである。

方法：HPLCを用いてゲノムDNAのメチルシトシン含量を測定した。HPLC解析はTawaraらの方法に基づいたが、DNA処理及び分離条件に改良を加えて正確性を高めた。解析対象は、4歳から94歳に渡る76名（男性32

名、女性 44 名) の健常者末梢白血球 DNA 及び 7 週から 40 週までの 39 例の胎盤 DNA である。更に、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (MTHFR) の C677T 及び A1298C 多型とメチル化との関連性を調べるため、この 2 つの SNP について遺伝子型を決定した。遺伝子型は、PCR 増幅産物を制限酵素 *Hinf*I (C677T) 及び *Mbo*II (A1298C) で処理し、20% アクリルアミドゲルで電気泳動を行って判定した。HERV-K 及び HERV-E の発現量は、スロットプロットハイブリダイゼーションのシグナル強度を測定し、内部コントロールのベータアクチンで補正した。二群の差の検定は Mann-Whitney's U test で行った。

結果：末血 DNA のメチル化に関しては、加齢に伴う減少が見られた。高齢群 (65.9 ± 8.9 歳 ; n = 22) と青年群 (19.3 ± 1.4 歳 ; n = 21) で有意な差があった ($p = 0.0002$)。しかし、その差は僅か 2% だった。また、男女間で有意な差 ($p = 0.0067$) があり、女性で

低値だった。この男女差は、加齢変化を考慮して 11 歳から 41 歳に限定したときも検出された ($p = 0.0159$)。胎盤 DNA のメチル化は妊娠週数とともに増加した。しかし、満期胎盤でも末血 DNA のメチル化の 80% 程度にしかならなかった。HERV-K 及び HERV-E の発現量は胎盤 DNA のメチル化と逆比例的に減少傾向を示した。MTHFR の 2 つの SNP とメチル化レベルとの関連性では、特筆すべき結果は得られなかった。

考察：末血 DNA のメチルシトシン含量に男女差があることを見出した。これは、この論文が初めての報告である。加齢減少は認められたが、程度は極めて僅かであった。そして、この差の要因の 1 つに男女差が関与している可能性がある。HPLC によるメチル化解析は、他のメチル化解析法に比べ簡便で集団解析に適用可能である。この論文は、HPLC 改良法とともに、種々の疾患のメチル化解析の有益な基礎データを与える。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	島袋盛洋
論文審査委員	審査日	平成17年1月31日	
	主査教授	金澤浩二	(印)
	副査教授	金谷文則	(印)
	副査教授	石田 肇	(印)
(論文題目)			
Age Related Changes in 5-methylcytosine Content in Human Peripheral Leukocytes and Placentas: an HPLC-based Study			
(論文審査結果の要旨)			
上記論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義と学術的水準について検討し、以下のような審査結果を得た。			
1. 研究の背景と目的			
<p>過去の遺伝疫学研究から、統合失調症などの機能性精神疾患に遺伝要因が関与することは確かである。しかしながら、精力的な遺伝子解析研究にもかかわらず、未だに原因遺伝子として確立されたものはない。このような状況から、DNAのメチル化に注目した。しかし、DNAのメチル化解析は煩瑣で労力を要する。数百例規模の集団解析に耐えるメチル化解析法として、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を選んだ。マウスやラットでみられる加齢に伴うメチル化の減少を指標にして、統合失調症患者集団でのメチル化解析へのHPLCの適用性を吟味した。これが、本研究の大きな目的の1つである。また、エピジェネティクスの観点で興味深い胎盤のメチル化に関する詳細な情報を得ることも目的の一つになっている。</p>			

2. 研究内容

独自に改良した HPLC 法を用いて、4 歳から 94 歳にわたる 76 名（男性 32 名、女性 44 名）の健常者末梢白血球 DNA 及び 7 週から 40 週までの 39 例の胎盤 DNA について、メチルシトシン含量を測定した。胎盤については、RNA スロットブロット法を用いて HERV-K 及び HERV-E の発現量を測定してメチル化との関連性を調べた。

その結果、ヒト末梢血 DNA の加齢に伴うメチル化の減少を確認できた。16 歳から 24 歳の青年群 ($n = 21$) と 51 歳以上の高齢群 ($n = 22$) で有意な差が検出された ($p = 0.0002$)。また、男女間でも有意な差があり、女性で低値だった ($p = 0.0067$)。胎盤 DNA のメチル化は妊娠週数とともに増加した。しかし、満期胎盤でも末梢血 DNA のメチル化の約 80% にしか達しなかった。HERV-K 及び HERV-E の発現量は胎盤 DNA のメチル化と逆比例的に減少する傾向を示した。

なお、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (MTHFR) の C677T 及び A1298C 多型とメチル化との関連性を調べたが、特筆すべき結果は得られなかった。

3. 研究結果の意義と学術水準

HPLC によるメチル化解析法を改良して一層精度の高い測定を可能にした。これによって、ヒト末梢白血球 DNA メチルシトシン含量の加齢による減少があることを確認した。更に、男女間でメチル化レベルに有意な差が存在することを世界で初めて見出している。更に、メチル化に対する胎盤の特殊性を明瞭に示した。これらの成果は、国際的学術水準にあると評価される。

以上により、本論文は学位授与に十分に値すると判断した。

備考 1 用紙の規格は、A4 とし縦にして左横書きとすること。

2 要旨は 800 字～1200 字以内にまとめること。

3 *印は記入しないこと。