

## 各種疾患におけるゲノムDNAのグローバルメチレーションの解析(2000年度) ゲノムDNA CpG islandのグローバルメチレーションの解析(2001年度)

●藤原 浩

新潟大学大学院医歯学総合研究科

### 〈研究の目的と進め方〉

エピジェネティクスが遺伝子発現制御において非常に重要な役割を担い、様々な疾患の発症に関与していることが近年はっきりしてきた。エピジェネティクスのうち、もっとも早くから解析が進んだのがDNAメチレーションによる遺伝子発現抑制である。

筆者は、以前よりDNAメチレーションの状態をゲノム全体として解析することを目的とし、新たな実験法を開発してきた。この手法、non-isotopic cytosine extension assay (NICEA)を用い、様々な疾患でのCpG island DNA methylationを解析した。

また、NICEA法の改良により微量サンプルの解析を可能にした。

### 〈研究開始時の研究計画〉

2000年

全身性エリテマトーデス(SLE)などの膠原病患者末梢血リンパ球DNAをNICEAにより解析し、リンパ球ゲノムのDNAメチレーションの異常を解析する。

また、NICEAの改良により、通常ゲノムDNA数マイクログラムの検出感度を数桁下げる。

2001年

NICEAにより解析する膠原病の疾患の種類を増やす。また、リンパ球を表面マーカーにより細分化し、異常を起こすリンパ球の種類を特定する。

表皮細胞、色素細胞、リンパ球でのDNAメチレーションの違い、色素細胞由来の良性、悪性腫瘍でのDNAメチレーションの違いを解析する。

さらに、DNA 2次元電気泳動により、DNAメチレーション異常を起こした遺伝子を特定する。

### 〈研究期間の成果〉

2000年

NICEAはスピンカラムまたはガラスパウダーによる濃縮操作を行うことにより、10ナノグラム以下の検体でも解析できるようになった。

全身性エリテマトーデスでは、正常コントロール、皮膚限局型エリテマトーデスに比べ、CpG island methylationが亢進していた。SLEのリンパ球機能異常の病態の解明にせまる可能性があると考えられた。

2001年

SLEでは、主にメチレーションに異常のあるのはCD19+のBリンパ球であることがわかった。

他の膠原病、強皮症、皮膚筋炎についても解析したが、末梢血リンパ球ゲノムDNAのCpG island methylationの異常は見られなかった。

正常人末梢血リンパ球と表皮細胞ではグローバルメチレーションに大きな差があることがわかった。表皮細胞とs色素細胞では差がなかった。

悪性黒色腫ではnon-CpG island hypomethylationがおき

ていることが示唆された。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

研究成果は論文、および2000年、2001年、2002年の国際学会で発表した。

論文リプリント請求および、e-mailによる研究法の詳細についての問い合わせあり。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

2001年度計画では、DNA 2次元電気泳動により、DNAメチレーション異常を起こした遺伝子を特定する予定だったが、スポットが多すぎ、有意な解析を行うことができなかった。

### 〈今後の課題〉

現在、科研費(基盤研究)により腫瘍性病変について、DNA arrayを用いてDNAメチレーションの網羅的研究を行っている。

### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング

Fujiwara H, Ito M. Global methylation analysis of genomic DNA of peripheral blood mononuclear cells in lupus erythematosus patients; development of non-isotopic cytosine extension assay. J Invest Dermatol, 114, 809 (2000).

Fujiwara H, Ito M CpG island-specific hypermethylation in peripheral blood lymphocytes of systemic lupus erythematosus. J Invest Dermatol. 117, 520 (2001).

Fujiwara H, Ito M. Genome-wide CpG island methylation and promoter methylation analyses in malignant tumors of the skin. J Invest Dermatol. 119, 750 (2002).

Fujiwara H, Ito M. Non-isotopic cytosine extension assay: A highly sensitive method to evaluate CpG island methylation in the whole genome. Analytical Biochem. 307, 386-389 (2002).

2) データベース/ソフトウェア

なし

3) 特許など

なし

4) その他顕著なもの

なし