



Title	Studies on DNA methylation changes in canine malignant melanoma [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	石崎, 禎太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第15113号
Issue Date	2022-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86733
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	ISHIZAKI_Teita_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：石崎 禎太

審査委員	主査	教授	滝	口	満	喜
	副査	教授	木	村	享	史
	副査	特任准教授	山	崎	淳	平
	副査	助教	青	島	圭	佑

学位論文題名

Studies on DNA methylation changes in canine malignant melanoma

（犬の悪性黒色腫における DNA メチル化の変化に関する研究）

犬の悪性黒色腫は口腔内に好発し、臨床的あるいは病理学的な観点から、治療法や予後因子について多くの研究がなされている。しかし、早期診断の難しさや臨床的挙動の悪さから、治療効果は低く、致死率が非常に高い疾患である。近年、医学領域においては、遺伝子配列の変化を伴わずに表現型の変化をもたらすエピジェネティクスが注目され、悪性黒色腫を含めた腫瘍性疾患においてもエピジェネティックなメカニズムについての研究が行われている。エピジェネティック修飾の1つである DNA メチル化は、ゲノム DNA の CpG ジヌクレオチドにおけるシトシンのメチル基付加修飾で、遺伝子のプロモーター領域で起こると遺伝子発現が抑制されることが知られている。通常 CpG サイトはゲノム上に散在しているが、CpG アイランド (CGI) と呼ばれる CpG サイトが密集する領域が多く遺伝子のプロモーター領域に存在している。腫瘍組織では CGI の一部でメチル化が増加し、non-CGI (NCGI) の一部でメチル化が減少することが知られている。犬の悪性黒色腫の DNA メチル化に関する報告は少なく、その異常については不明な点が多い。そこで本研究では、犬の悪性黒色腫における DNA メチル化の変化を明らかにすることを目的とした。

第1章では、犬の悪性黒色腫の細胞株と臨床サンプルを用い、ゲノム上の認識部位 (CCCGGG) は同じであるが、DNA メチル化の状態によって切断形式が異なる2種類の制限酵素と次世代シーケンサーを利用して (DREAM 法)、DNA メチル化のゲノムワイド解析を行った。その結果、CGI に存在する CpG サイトの多くにメチル化の増加がみられ、また NCGI に存在する CpG サイトの多くにはメチル化の減少が認められた。更に、これら高メチル化 CpG サイトの近傍には多くの遺伝子

が確認された。以上の結果から、人の腫瘍での報告と同様に、犬の悪性黒色腫においても広範囲で DNA メチル化の変化が起こっていることがわかった。

第 2 章では、DNA メチル化の局所解析では再現性・定量性が高いパイロシーケンス法を用い、犬の口腔内の悪性黒色腫における LINE-1 のメチル化の定量を行った。LINE-1 とはタンパク質非コード反復配列で、人のゲノムの約 17%を占めている。そのため、LINE-1 のメチル化の状態はゲノム全体のメチル化の状態を反映するとされている。LINE-1 は正常組織ではメチル化しているが、腫瘍組織では脱メチル化がおこり、活性化することでゲノムの不安定性を引き起こすとされ、LINE-1 の脱メチル化と生存期間の短さの関係性が報告されている。今回の研究では、悪性黒色腫の LINE-1 のメチル化レベルは正常組織と比較して低値であった。また、LINE-1 のメチル化が低い症例に、生存期間が短い症例が多いことが明らかとなった。以上の結果より、犬の口腔内悪性黒色腫における LINE-1 のメチル化の状態ならびに LINE-1 のメチル化の状態と予後との相関性は、人の腫瘍での報告と一致していることがわかった。

第 3 章では、多くの腫瘍で報告されている可逆性プロセスである上皮間葉転換 (EMT) と DNA メチル化の関連について着目した。上皮系マーカーの指標とされている E-カドヘリンの発現によって犬の悪性黒色腫を上皮系フェノタイプと間葉系フェノタイプに分類し、第 1 章と同じ DREAM 法を利用して得られた DNA メチル化のデータを用いて、上皮系フェノタイプと間葉系フェノタイプのメチル化状態の違いを解析した。上皮系フェノタイプでより多くの高メチル化部位が確認され、新規の高メチル化を示す 2 つの遺伝子が細胞間接着性因子に関連していることが明らかとなった。この結果は、犬の悪性黒色腫における EMT に DNA メチル化が関連していることを示唆するものであった。

本研究の知見は、犬の悪性黒色腫における DNA メチル化の変化の解明に貢献するものであり、今後腫瘍発生における機能的関連性の解明や予後予測、治療法の確立などに資することが期待される。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者石崎禎太氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学院規程第 10 条の規定による本学院の行う学位論文の審査等に合格と認めた。