

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 小田 知友美
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1106 号
学位授与の日付 令和5年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 HBx and YAP expression could promote tumor development and progression in HBV-related hepatocellular carcinoma.
(HBx と YAP の発現は HBV 関連肝細胞癌の発生と進行を促進する)

論文審査委員 主査 教授 藤井 雅寛
副査 教授 西條 康夫
副査 准教授 今井 千速

博士論文の要旨

【背景と目的】全世界での肝細胞癌の罹患者数は約 78 万人で、全癌種中第 6 位であり、また死亡者数も全癌種中第 3 位であり、予後不良の疾患である。肝発癌の最大要因である C 型肝炎ウイルスに対する根本療法が進歩したことから、本邦での肝細胞癌の病因別年次推移で C 型肝炎ウイルス (HCV) 関連肝細胞癌が減少し、非ウイルス性の肝癌が増加傾向である。一方で、B 型慢性肝炎ウイルス (HBV) は体内からの完全排除法は確立されておらず、その関連肝細胞癌の発症は全肝細胞癌患者のうち 10~20% を占め大きな変化はない。さらに HBV 関連肝細胞癌は、若年発症、巨大腫瘍形成、予後不良などの特徴を有することが多いが、その分子生物学的な発症機序の解明はされていない。そこで、本研究では、HBV 関連肝細胞癌の発癌機序でウイルス側因子として報告されている Hepatitis B virus X (HBx) 蛋白と、細胞増殖や臓器サイズなどに関与する Hippo 経路を制御する Yes-Associated Protein (YAP) の関連を *in vitro* での分子生物学的解析と *in vivo* のヒト肝細胞癌の検体・臨床的特徴より解析すること目的とした。

【方法】*in vivo* の解析では、2012~2019 年に新潟大学医歯学総合病院でヒト肝癌に対する肝切除をおこなった 55 症例について、癌部、非癌部の HBx, YAP 発現や局在を解析し臨床データと比較し検証した。また、*in vitro* ではヒト肝癌由来細胞株である HuH7, HLE と HBx 蛋白を発現している Hep3B を対象として HBx, YAP を発現するプラスミドを導入し、細胞増殖及び細胞死に関連する遺伝子の発現解析についてマイクロアレイを用いて検証した。

【結果】ヒト肝癌の検証では、55 症例中 HBV 関連肝細胞癌が 19 例、HCV 関連肝細胞癌が 17 例、非ウイルス性 (アルコール性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎等) 肝細胞癌が 19 例であった。3 群間の患者背景は年齢、性別、肝硬変の有無、Child-Pugh 分類、組織学的分類のいずれも統計学的有意差は認めなかった。HBV 関連肝細胞癌群は HCV 関連肝細胞癌群より腫瘍径が大きい傾向にあった (中央値 35.0 mm vs 21 mm, $p = 0.06$)。免疫染色では、HBV 関連肝細胞癌で、癌部及び非癌部の両方で HBx 発現を認め、有意差を認めなかった。また、腫瘍部での HBx 発現は腫瘍径及び腫瘍マーカーの血清 AFP 値と相関関係を示した。YAP 発現は HBV, HCV 関連肝細胞癌の両方で非腫瘍部より腫瘍部で高く、癌部での発現は、腫瘍径、血清 AFP 濃度と相関傾向を示

した。HBx 及び YAP 蛋白発現は腫瘍部で有意に相関し、両蛋白の発現が 5%以下の症例では、分化度が高く、予後も良好だが、両蛋白陽性症例では、分化度の低い症例が増え、予後が不良であった。HBx 陽性症例で、YAP の発現が上昇すると、悪性度が上昇していることが推測された。in vitro の検証では、HBx もしくは YAP を発現させた群とコントロール群での 3 群で mRNA 発現解析の比較検証を行った。YAP・HBx 両発現細胞株では発癌に関わるシグナル伝達経路の活性化を認め、YAP 発現細胞株では、HBx 発現細胞株より MAPK, NF- κ B, RAS, TNF シグナル伝達経路に関連する遺伝子が強く活性化していた。肝細胞内での HBx と YAP の発現は細胞増殖を活性化させ、HBx は YAP を活性化させ、YAP によりさらなる変化を活性化させている可能性が示唆された。

【考察】HBV を肝細胞内から駆逐するための薬剤はいまだ研究途上であり、B 型慢性肝炎患者の肝発癌の病因を解明することも不可欠である。これまでの分子生物学的研究により、肝細胞癌は Wnt- β -カテニン、JAK/STAT、RAS、TGF- β といった細胞周期調節に関わる発癌経路を含めた様々な遺伝子的発癌形式が解明されてきた。申請者らの研究では、HBx 蛋白の発現がヒト肝組織における YAP 発現と腫瘍増生に関連していることを新たに示した。HBx と YAP の発現は有意な関連性を示し、さらに腫瘍内で両蛋白が発現すると予後が著しく不良であることが示された。これらは、HBx 発現肝臓における YAP 発現が、HBV 関連の肝細胞癌発生や、腫瘍径、腫瘍マーカー上昇、予後不良に関連する一つの要因である可能性が示唆された。申請者らの結果は、既報における HBx トランスジェニックマウスでの肝細胞癌発生へ誘導する Hippo 経路の活性化や肝細胞内の DNA 損傷蓄積がみられたという研究結果や、申請者らの研究室における HCC 予防に対する YAP を標的とした遺伝子治療の有効性を示したという研究結果により裏付けられるものと考えられる。HBV 感染患者の肝臓における YAP 発現は HBV 関連の肝細胞癌発生に関わり、ヒト肝細胞癌治療の標的として重要な因子となりうると思われる。

審査結果の要旨

B 型肝炎ウイルス (HBV) 関連肝細胞癌は、全肝細胞癌の 10-20%を占めると言われています。その臨床的特徴は、若年層に発生し、腫瘍が大きく、予後が悪いことである。B 型肝炎ウイルス X (HBx) タンパク質が肝細胞癌の発症に寄与していることが報告されている。申請者は、肝組織における HBx および Yes-associated protein (YAP) の発現と HBV 関連 HCC の臨床的特徴との関連を分析した。

癌組織と非癌組織における HBx と YAP の発現を免疫組織化学で評価した (n = 55)。プラスミドを用いて肝細胞癌由来の細胞株で HBx と YAP を過剰発現させ、その遺伝子発現の変化を解析した。

HBV 関連肝細胞癌 19 例、C 型肝炎ウイルス (HCV) 関連肝細胞癌 17 例、非ウイルス性肝細胞癌 19 例の中で、HBV 関連肝細胞癌は最も大きな腫瘍サイズを有していた。腫瘍および腫瘍周囲組織の HBx 染色は、腫瘍サイズおよび血清 α -フェトプロテイン値と有意な相関を示した。YAP 発現は、HBV 関連腫瘍組織で腫瘍周囲組織や HCV 関連腫瘍よりも高かった。さらに、HBx と YAP の発現は相関しており、腫瘍における両者の発現は予後不良と関連していた。肝細胞株における HBx と YAP の過剰発現は、様々な発がん性シグナル伝達経路を活性化することが示された。

HBV 感染者の肝臓における YAP 発現が、HBV 関連 HCC の発症や腫瘍の特徴に関与している可能性を示した点に、本論文の博士論文としての価値を認めた。