

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

| | |
|---------|--|
| 氏名 | 福原 康夫 |
| 学位 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 新大博 (医) 第 1788 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 29 年 9 月 20 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 |
| 博士論文名 | Identification of cellular genes showing differential expression associated with hepatitis B virus infection. (HBV 感染に伴い特異的に発現変動する宿主遺伝子の同定) |
| 論文審査委員 | 主査 教授 若井 俊文 副査 教授 小松 雅明 副査 教授 寺井 崇二 |

博士論文の要旨

目的：

B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染による宿主遺伝子発現への影響を解明する。

方法：

配列特異的に mRNA が分解される RNA 干渉 (RNA interference : RNAi) によって HBV 関連タンパクの発現を抑制するために、HBV の 4 つの転写産物全てに共通する HBx 領域を標的とする 2 本鎖 RNA を形成する short hairpin RNA (shRNA) の持続発現ベクター (pSUPER. HB4) を構築し、HBs タンパク発現細胞系列であるヒト肝癌細胞株 huH-1 に導入して持続安定発現細胞系列 (huHB4) を樹立した。

次に、HBV 関連タンパク発現抑制による宿主細胞内メッセージの発現プロファイルの変化を検討するため、コントロール群との 2 群間で約 30,000 遺伝子を網羅する cDNA マイクロアレイ解析を行った。cDNA マイクロアレイは日立ソフト社の DNA チップ「AceGene」を用い、解析は DNA チップ研究所に委託した。色素交換実験を行って得られた重複資料のデータで 2 倍以上の発現量の変化を示した遺伝子を候補として抽出し、リアルタイム定量 PCR で発現変化を確認した。

更に細胞系列で発現量の変化を確認した候補遺伝子について、HBV 関連および非関連の臨床検体 18 例を用いて肝細胞癌組織と非腫瘍部組織における遺伝子発現量をリアルタイム定量 PCR で検討した。

結果：

HBx トランスジェニックマウスの肝臓にハイドロダイナミック遺伝子導入法により持続発現ベクターを導入し HBx タンパクに対する免疫染色を実施した結果、コントロールベクターが導入された肝臓に比較して pSUPER. HB4 が導入された肝臓において HBx タンパクの発現が著明に抑制されることが確認された。また huH1 培養上清中の HBs 抗原を ELISA により定量した結果、コントロールベクターが導入された huH1 細胞株に比して huHB4 において培養上清中の HBs 抗原量が著明に低下することが確認され、標的配列による RNAi で複数の HBV 関連タンパクが効果的に発現抑制されていることが確認された。

cDNA マイクロアレイ解析にて、RNAi による HBV mRNA ノックダウン肝細胞系列ではコントロール群に比し

て135個の遺伝子の発現が低下しており103個の遺伝子の発現が亢進していた。これらの候補遺伝子の機能的情報について機能注釈ソフトウェアである DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) を用いて検索したところ、発現が亢進していた遺伝子のうち85個の遺伝子は脂質合成、糖蛋白、生体高分子代謝、加水分解活性の4つの機能カテゴリーに分類され、発現が低下していた62個の遺伝子はシグナルペプチド、プロテアーゼ阻害物質、サイトカイン、知覚認知と伝達の5つのカテゴリーに分類された。

色素交換実験で発現の増減が合致している遺伝子群から無作為に選択した13遺伝子に関して細胞系列を検体とした定量的RT-PCRを実施し、マイクロアレイと同様に2倍以上の発現変動が確認された8遺伝子に関して肝細胞癌症例の腫瘍部と周辺非腫瘍における発現量を比較した結果、唯一 APM2 (adipose most abundant 2) 遺伝子のみが腫瘍部、非腫瘍部に関わらず HBV 非関連組織中で恒常的に抑制されていた。

考察と結論：

HBx を標的とした shRNA の持続発現ベクターにより複数の HBV 関連タンパクの発現が効率的に抑制された。cDNA マイクロアレイ解析により有意な発現変化を認めた遺伝子には、機能的に細胞の増殖や代謝に関連するものが多く含まれていた。

HBV の有無により発現が変化する宿主遺伝子を in vitro と in vivo で同定し、HBV 感染に伴い特異的に発現増強する遺伝子として APM2 が抽出された。APM2 の発現増加は、臍上皮内新生物、予後不良の乳癌、シスプラチン抵抗性胃癌において報告されており、その強発現は種々の癌腫においてシスプラチン耐性を誘導することが知られているが、その詳細な機能は解明されていない。

HBV 感染に伴う宿主遺伝子の発現変動に関する知見は、B 型慢性肝炎と肝細胞癌発癌の機序解明に新たな情報を与えてくれるものと期待される。

審査結果の要旨

HBV 関連タンパク発現抑制による宿主細胞内メッセージの発現プロファイルの変化を検討するため、約 30,000 遺伝子を網羅する cDNA マイクロアレイ解析を行った。2 倍以上の発現量の変化を示した遺伝子を候補として抽出し、リアルタイム定量 PCR で発現変化を確認した。持続発現ベクター (pSUPER. HB4) を構築し、持続安定発現細胞系列 (huHB4) を樹立し、細胞系列で発現量の変化を確認した候補遺伝子について、HBV 関連および非関連の臨床検体 18 例を用いて肝細胞癌組織と非腫瘍部組織における遺伝子発現量をリアルタイム定量 PCR で検討した。

pSUPER. HB4 が導入された肝臓において HBx タンパクの発現が著明に抑制された。huHB4 において培養上清中の HBsAg 量が著明に低下することが確認された。cDNA マイクロアレイ解析にて、135 個の遺伝子の発現が低下しており 103 個の遺伝子の発現が亢進していた。色素交換実験で発現の増減が合致している遺伝子群から無作為に選択した 13 遺伝子に関して細胞系列を検体とした定量的 RT-PCR を実施し、マイクロアレイと同様に 2 倍以上の発現変動が確認された 8 遺伝子に関して肝細胞癌症例の腫瘍部と周辺非腫瘍における発現量を比較した結果、唯一 APM2 (adipose most abundant 2) 遺伝子のみが腫瘍部、非腫瘍部に関わらず HBV 非関連組織中で恒常的に抑制されていた。

HBV 感染に伴う宿主遺伝子の発現変動に関する知見は、B 型慢性肝炎と肝細胞癌発癌の機序解明に新たな情報を与える可能性が示唆され、本研究結果を World J Hepatol に誌上発表しており、学位論文として価値のある研究成果であると判断した。