

論文内容要旨

Signal Activation of Hepatitis B Virus–Related
Hepatocarcinogenesis by Up-regulation of
SUV39h1

(SUV39h1 発現亢進による B 型肝炎ウイルス関連
肝発癌の信号活性化)

The Journal of Infectious Diseases, 222(12):
2061–2070, 2020.

主指導教員：田中 信治教授

(広島大学病院 内視鏡医学)

副指導教員：伊藤 公訓教授

(広島大学病院 総合診療医学)

副指導教員：相方 浩准教授

(医系科学研究科 消化器・代謝内科学)

竹内 泰江

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

要旨

1) 背景. 目的

B型肝炎ウイルス(HBV)感染患者においては、抗ウイルス療法によるHBV増殖の制御は可能であるが、肝発癌が問題である。HBV関連蛋白の1つであるHBx蛋白は悪性の誘導やミトコンドリア機能不全などを介し、肝発癌に関与していると考えられている。一方、SUV39h1がヒストンのメチル化酵素として発見されて以降、様々なヒストンメチル化酵素が同定され、各酵素が特定のヒストンにあるリジン残基をメチル化し、クロマチン構造が変化させ、遺伝子の転写を制御していることが明らかとなっているが、HBxとSUV39h1の相互作用に関しては不明な点が多い。本研究では、ヒト肝細胞移植不全マウス(uPA-SCIDマウス)を用いてHBV持続感染に伴い、肝組織の網羅的な遺伝子発現解析から抽出されたSUV39h1遺伝子に着目し、HBV感染とSUV39h1との相互作用を解析し、肝発癌メカニズムへの影響やHBV増殖への影響について検討した。

2) 方法および結果

各マウスに 10^6 copyのHBV(genotype C)を含むヒト血清をマウス尾静脈経由で接種後、経時的にHBV DNAをreal time PCRで測定したところ感染早期(感染3日目)を除きすべての群で定量可能であった。これまで行ったcDNAマイクロアレイや次世代シーケンスによる検討では、HBVの短期感染では肝細胞内におけるSUV39h1の発現上昇は認められなかった。本研究ではさらに長期の観察のため感染238日までのマウス肝細胞内のSUV39h1発現をreal time PCRと次世代シーケンスを用いて定量した。ヒト肝細胞におけるSUV39h1発現はHBV感染56日後まで変化しなかったが、感染238日後のマウスではHBV非感染または短期感染マウスと比較してSUV39h1の有意な発現上昇を認めた。

- ① 肝癌患者では、癌組織のSUV39h1発現が高く、ヒストンH3-K9トリメチル化が亢進した症例では無再発生存率が有意に低いと報告されている。そこで5例の肝癌手術症例の肝組織を用いてSUV39h1の遺伝子発現を定量したところ、癌部での発現量は非癌部と比較して約2.1倍亢進しており、SUV39h1の細胞内発現の亢進が癌化と関連していることが示唆された。
- ② SUV39h1の癌部における発現亢進が確認されたことから、HBV関連肝癌におけるSUV39h1の影響について検討した。HBV関連肝癌ではHBVゲノムより産生されるHBx蛋白が肝発癌に関与することが報告されており、HBxとSUV39h1の相互作用を解析した。HBxおよびSUV39h1発現プラスミドを作製し、HepG2細胞にtransfectionした後、細胞内における両蛋白のinteractionを解析した。免疫沈降の結果、両蛋白がinteractionすることが確認された。更に、両蛋白間がinteractionする領域の同定のため、HBxおよびSUV39h1の全長もしくは部分長を組み込んだプラスミドを作製し、同様の検討を行ったところ、HBxはSUV39h1の89~233番目の領域(SET domain領域)、SUV39h1は、HBxの52~102番目の領域(co-activator domain領域)とinteractionすることが明らかとな

った。

- ③ 続いて、HBx と SUV39h1 共発現による発癌メカニズムへの影響について検討した。これまでに HBx により発現が亢進し肝発癌に寄与することが報告されている ATF6, AFP, GADD45a, DUSP1 の 4 遺伝子に着目し解析を行った。SUV39h1 および HBV を HepG2 細胞に transfection 後、細胞内の mRNA 発現変化を確認したところ、HBV と SUV39h1 の両蛋白の存在下で、これら 4 遺伝子の有意な発現亢進を認めた。更に、HBV 関連蛋白発現プラスミドを用いて同様の検討を行ったところ、4 遺伝子は HBx 発現時のみ発現亢進を認め、さらに SUV39h1 を共発現することによりその発現量の増強を認めた。
- ④ 一方、HBx が SUV39h1 のメチルトランスフェラーゼ活性を増強する可能性を考慮し、HBx および SUV39h1 の recombinant protein を作製後、HBx の有無による Histone H3 メチル化の程度の変化を in vitro methyltransferase assay にて検討した。SUV39h1 存在下で Histone H3 のメチル化が観察され、SUV39h1 と HBx の共存下でそのメチル化が増強されることが確認された。以上から、HBx の SUV39h1 による Histone H3 のメチル化を促進する可能性が示唆された。

3) 考察

SUV39h1 と HBx の相互作用が互いに活性を高め、HBx を介した肝発癌を誘導していることが示唆された。SUV39h1 の HBx 機能活性化のメカニズムを解析することにより、HBV 関連発癌メカニズムの解明ならびに新たな肝癌治療標的となる可能性が示唆された。