

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	竹内 泰江
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項 該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	大段 秀樹	印
審査委員	教授	浅野 知一郎	
審査委員	准教授	菅野 啓司	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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 蛋白は悪性化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、クロマチン構造を変化させ、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。</p> <p>各マウスに 10⁶ copy の HBV(genotype C)を含むヒト血清をマウス尾静脈経路で接種後、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。</p> <p>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。</p>			

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。

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。

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 の共存在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。

以上の結果から、本論文は 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を示唆し、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あることを明らかにした点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が竹内泰江に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。