

| | |
|---------|--|
| 氏名 | 濱元 宏喜 |
| (ふりがな) | (はまもと ひろき) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位授与番号 | 甲 第 号 |
| 学位審査年月日 | 平成30年7月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位論文題名 | Delta-like 3 is silenced by HBx via histone acetylation in HBV-associated HCCs (B型肝炎ウイルス関連肝細胞癌において、DLL3遺伝子はHBxによりヒストンアセチル化を介してサイレンシングされる) |
| 論文審査委員 | (主) 教授 樋口 和秀 教授 田中 慶太朗 教授 高井 真司 |

学位論文内容の要旨

《研究目的》

近年、がんとエピジェネティクス異常との関係が注目されている。発生、分化に関与する抑制型 Notch 受容体リガンドの1つである Delta-like 3 (DLL3) は、肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma (HCC)) においてメチル化されていることが報告されている。これまでに、HCC 細胞株において抑制型 Notch 受容体リガンドの1つである DLL3 が異常メチル化によりサイレンシングされ、過剰発現によりアポトーシスが誘導されることを我々は報告しているが、HCC 発癌過程における DLL3 の役割は明らかではない。今回、我々は HCC における DLL3 発現調整について検討した。

《対象と方法》

- ①正常肝組織における DLL3 の発現の検討のため、肝障害のない肝転移に対する肝切除標本 10 症例（大腸癌：9 例、カルチノイド：1 例）を用いて、Real Time Polymerase Chain Reaction（RT-PCR）、Western Blot 法、免疫染色にて DLL3 発現を評価した。
- ②HCC に対する外科切除標本 46 症例を用いて、DLL3 発現に関する臨床病理学的特徴を検討し、腫瘍部と非腫瘍部の DLL3 発現を免疫染色で比較することで DLL3 サイレンシング症例を分別した。また、さらに別の外科切除 10 症例を用いて、B 型肝炎ウイルス（HBV）関連 HCC（5 例）と C 型肝炎ウイルス（HCV）関連 HCC（5 例）での DLL3 サイレンシングについて、Western Blot 法にて検討した。
- ③HBV が産生する HBx タンパクの DLL3 発現調整に関して、HBV genome が導入された細胞株（HepG2.2.15）とその親株（HepG2）を用いて検討した。
- ④HBx タンパクのエピジェネティック修飾に関して、2 種の細胞株（HepG2.2.15、Hep3B）を用いて、DNA メチル化阻害剤（5-Aza-dC）とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（トリコスタチン A：TSA）を投与し、DLL3 発現状態を検討した。

《結果》

- ①正常肝組織において、DLL3 は 10 症例中 9 症例（90%）に発現を認めた。
- ②腫瘍径 5 cm 未満の症例は、5 cm 以上と比較して DLL3 弱発現症例が有意に多く、肝硬変症例では DLL3 強発現症例が有意に多かった。Ishak score を用いて、肝線維化と DLL3 発現の相関性を検討したが、有意な相関は認められなかった。また、HBV 関連 HCC において、DLL3 サイレンシング症例が有意に多かった。HBV 関連 HCC では 5 例中 3 例（60%）、HCV 関連 HCC では 5 例中 1 例（20%）に DLL3 サイレンシングを認めた。
- ③親株（HepG2）と HBV genome が導入された HepG2.2.15 を比較すると、HepG2.2.15 においての DLL3 発現が有意に低下していた。また、HepG2.2.15 において、SiRNA にて HBx を Knockdown すると、DLL3 発現の有意な上昇を認めた。HepG2 に HBx plasmid を導入し HBx 過剰発現による DLL3 発現の変化をみたが、DLL3 の有意な変化は認めな

かった。

④HBx 陽性の細胞株 (HepG2.2.15、Hep3B) において、5-Aza-dC 投与ではどちらの細胞株も DLL3 発現に変化を認めなかったが、TSA 投与にてどちらの細胞株も DLL3 発現の有意な上昇を認めた。

《考察》

これまで正常な肝臓における DLL3 発現は mRNA レベルで多くないと報告されていた。今回、我々は Western Blot 法と免疫染色において、DLL3 タンパクが正常肝組織に高頻度 (90%) で発現していることを見出した。また、RT-PCR にて DLL3 mRNA の発現も解析したが、タンパク発現との乖離がみられた。このことより、DLL3 が翻訳段階で何らかの発現調整を受けている可能性が示唆された。

臨床検体を用いた研究結果で、HBV 関連 HCC において DLL3 サイレンシング症例が有意に多いことが示された。HBV が産生する機能タンパクである HBx は様々な癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子の発現調整に関与していることが知られており、本研究でも HBx 陽性細胞株で DLL3 発現が抑制されていることが示された。しかし、plasmid 導入により HBx を過剰発現させても DLL3 の有意な低下は認めなかったことから、HBx 単独では DLL3 発現を制御できない可能性が示唆された。また、HBx 陽性細胞株において、TSA 投与により DLL3 発現が有意に増加した。HBx 陽性細胞株では DNA メチル化ではなく、ヒストンのアセチル化を介して DLL3 発現制御していると考えられた。

《結論》

今回、我々は、1) 正常肝細胞で DLL3 が高頻度に発現していること 2) HBV 関連 HCC において DLL3 サイレンシングがみられること 3) HBx 陽性細胞株で DLL3 発現が抑制されていること 4) HBx 陽性細胞株でヒストンアセチル化を介して DLL3 が制御されていることを示した。DLL3 の過剰発現がアポトーシスを誘導することをこれまでに示しており、本研究結果と合わせて、DLL3 サイレンシングが HBV 関連 HCC の発癌過程に関与

する可能性が示唆された。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

肝細胞癌の多くは慢性肝炎、肝硬変を経て発症し、その原因としては肝炎ウイルス感染によることが多い。C 型肝炎ウイルスに対する画期的な治療薬が登場し、C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌は今後減少が予想されるが、B 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌においては、慢性肝炎を経ずに発癌することも多く、その発癌メカニズムは明らかになっていない。また、Notch 抑制型リガンドである DLL3 は肝細胞癌においてサイレンシングされていることが報告されているが、その機能など不明な点が多い。

今回、申請者は肝切除症例の臨床検体を用いて、正常肝組織において DLL3 が高頻度に発現していること、B 型肝炎関連肝細胞癌において DLL3 サイレncing 症例が有意に多いことを見出した。これらの結果は DLL3 に関する新しい知見である。その結果を基に、*in vitro* で B 型肝炎ウイルスが産生する機能タンパクである HBx が DLL3 サイレncing に関与していることを証明した。肝細胞癌において DLL3 はメチル化によりサイレンシングされていると報告されているが、申請者は今回、B 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌においてはヒストンのアセチル化を介して DLL3 サイレncing が引き起こされていることを証明した。DLL3 は肝癌細胞株においてアポトーシスを起こすことがすでに報告されており、エピジェネティック制御を介した DLL3 サイレncing が B 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌の発癌・生育に関与していることを示唆する結果であり、今後の病態解明、治療につながる可能性がある。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Scientific Reports

8(1): 4842, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-23318-1 〈オンライン掲載〉