

Title	Alteration in Gene Expression Profile by Full Length Hepatitis B Virus Genome
Author(s)	中西, 文彦
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46062
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	中 西 文 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 19109 号
学位授与年月日	平成 17 年 2 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Alteration in Gene Expression Profile by Full Length Hepatitis B Virus Genome (HBV 全長の導入に伴う宿主細胞の遺伝子発現プロファイルの変化—DNA array を用いた検討)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 松浦 善治 教授 門田 守人

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

B 型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の主たる原因の一つである。HBV ゲノムから少なくとも 7 種類のウイルス蛋白が生成されるが、最近これらの HBV 蛋白の持続的な発現が直接的に宿主細胞機能に修飾を与え、このことが B 型肝炎の病態形成に重要な役割を果たしていることが推察されている。HBV 蛋白の中でも HBx 蛋白は、培養肝細胞の悪性形質転換能を有すること、トランスジェニックマウスにおいて肝発癌が認められること、各種刺激下における細胞死の過程に変化を与えること、さらには細胞内の遺伝子転写活性や情報伝達経路に影響を及ぼすことなどが報告されている。しかしながら、このような HBV 蛋白の持続発現が宿主細胞機能に与える影響に関する知見はいまだ断片的に過ぎず、総括的な検討はなされていない。本研究においては、HBV 全長を恒常的に発現させた培養細胞を用いて、DNA array 法にて HBV 蛋白による宿主肝細胞の遺伝子発現プロファイルの変化を網羅的に検討することで、HBV 蛋白が宿主細胞に与える影響に関する総括的な検討を試みた。

〔 方 法 〕

本研究では肝腫瘍由来の細胞株 Huh-6 に、HBV 全長を発現するプラスミドを恒常的に導入した HB611 細胞と、陰性 control として Huh-6 に neomycin 耐性遺伝子のみを導入した Huh-6 neo 細胞を用いた。各々より mRNA を抽出した後、1176 種類の遺伝子発現の変化が一度に検討できる DNA array システム (Atlas Human Array 1.2、Clontech 社) を用いて、遺伝子発現プロファイルの比較を行った。HB611 細胞における発現レベルが Huh-6 neo 細胞の 3 倍以上増強、もしくは 1/3 以下に低下している遺伝子を陽性 (HBV 反応性) 遺伝子と判断した。これらの陽性遺伝子に関しては、さらに RT-PCR 法もしくは Western blot 法を施行し、発現レベルの検証を行った。

〔 成 績 〕

DNA array 法においては、HB611 細胞では Huh-6 neo 細胞に比して、10 種類の遺伝子の発現増強と 10 種類の遺伝子の発現減弱が認められた。これら計 20 種類の遺伝子に関して RT-PCR 法もしくは Western 法にて発現レベルの検証を行ったところ、最終的には HBV 全長の導入に伴う発現増強は 8 遺伝子 (CD44、high mobility group protein-I [HMG-I]、thymosin beta-10 [TB-10]、heat shock protein [HSP]-27、alpha-1-antitrypsin [α_1 -AT]、alpha-1-acid glycoprotein 1 [α_1 -AG]、insulin-like growth factor-binding protein 1 [IGFBP-1]、basic transcription

element-binding protein 2 [BTEB2]) において、一方発現低下は 6 遺伝子において (NM23-H1、caspase-3、BAX、DNA topoisomerase II alpha [TOPO-II α]、hypoxia-inducible factor 1 alpha [HIF-1 α]、protein-tyrosine kinase transmembrane receptor ROR1) 確認された。以上の如く HBV 全長の導入に伴って 1176 遺伝子中 14 遺伝子 (1.2%) において発現レベルの変化が認められた。残りの DNA array にて陽性であった 6 種類の遺伝子に関しては検証実験においては発現差は認められず、偽陽性と結論づけられた。これらの遺伝子の中で CD44、HMG-I、TB-10、HSP-27 の発現レベルの増強や NM23-H1 の発現レベルの低下は、肝細胞癌もしくは他の固形癌における発生や進展過程に密接に関与することが報告されているものである。さらにアポトーシス誘導分子である caspase-3 や BAX の発現レベルの低下は、細胞のアポトーシス抵抗性を介して発癌に促進的な影響を及ぼすことが推測される。以上のことより、HBV 全長の発現によって、宿主肝細胞の遺伝子発現に複数の発癌に関連する変化が生じ、ひいては HBV 関連肝発癌に繋っていくことが考えられた。

[総 括]

本研究において、網羅的な実験手法である DNA array を用いることにより、HBV 全長の発現による宿主細胞の遺伝子発現プロファイルの変化の一端が明らかにされた。HBV 全長の発現は、宿主肝細胞の遺伝子発現に複数の発癌に関連する変化を与え、そのことが HBV 関連肝発癌の病態形成に重要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

B 型肝炎の病態形成の一因として B 型肝炎ウイルス (HBV) 蛋白の持続発現による宿主細胞機能の修飾があげられ、多くの報告がなされている。しかし、いずれも単一の事象の検討であり網羅的な検討はなされていない。本論文では、HBV の宿主細胞への影響を DNA array という網羅的な手法を用い検討している。すなわち、ヒト肝腫瘍由来の細胞株 Huh-6 に HBV 発現プラスミドを導入した HB611 を HBV 発現細胞として用い、コントロール細胞と比較検討した。DNA assay および検証実験 (Western blot もしくは RT-PCR) にて最終的には 14 種類 (1.2%) の遺伝子で発現変化が認められ、それらの多くが癌の発生、進展に寄与する遺伝子であることがすでに明らかにされているものであった。このことより、HBV により複数の遺伝子発現が同時に変化し、細胞癌化をきたす可能性が考えられた。ウイルス発癌機構を網羅的に解析した研究であり、学位の授与に値するものと考えられる。