

Title	Genome-wide loss-of-function genetic screen identifies INSIG2 as the vulnerability of hepatitis B virus-integrated hepatoma cells
Author(s)	福岡, 誠
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96289
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	福岡 誠
論文題名 Title	Genome-wide loss-of-function genetic screen identifies INSIG2 as the vulnerability of hepatitis B virus-integrated hepatoma cells (全ゲノムプール型CRISPR/Casライブラリーを用いた機能喪失遺伝子スクリーニングにより、INSIG2がHBV組み込み肝癌細胞株の脆弱因子であることが同定された)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>B型肝炎ウイルス (HBV) に慢性的に感染している人は世界中で約2億5000万人おり、現行のHBV治療ではcovalently closed circular DNA(cccDNA)に対する作用は少なく、HBV感染肝細胞を完全に排除することは困難である。HBVはしばしば宿主ゲノムに組み込まれ肝発癌を促進するが、これまでHBxやHBsなどのHBV関連蛋白による肝発癌促進機構が明らかにされている一方、HBVが組み込まれることで脆弱性を持つかどうかに関してはほとんど検討されていない。そこで全ゲノムプール型CRISPR/Casライブラリーを用いてHBV関連肝発癌の脆弱性に成り得る遺伝子の検索を目的とした。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>HepG2細胞株並びにそれにHBV ゲノムが組み込まれたHepG2.2.15細胞株にレンチウイルスを用いてSpCas9 cDNAを導入し、それぞれのCas9恒常発現株を作成した。これらの細胞株に、18731遺伝子を標的とした113526のgRNAを含むプール型ライブラリーをレンチウイルスにより導入し、ライブラリー導入直後と2週間培養後にそれぞれの細胞株から回収したgDNAを用いて、次世代シーケンサーにより各gRNAの存在頻度を解読し、同一細胞株の培養前後並びに2種類の細胞株間で比較検討した。同一遺伝子を標的とした複数のgRNAの発現量と発現変化を基に、MAGeCKアルゴリズムを用いて二群間で存在頻度が有意に変化した(FDR<0.05)遺伝子を抽出した。培養前後でHepG2.2.15細胞株のみで存在頻度が有意に低下していた遺伝子はHBV組み込み肝癌細胞株の脆弱因子と考え、4つの遺伝子(BCL2L1、VPS37A、INSIG2、CFLAR)を同定した。これらのうち、BCL2L1およびINSIG2ではsiRNAを介したmRNA阻害またはCRISPRを介した遺伝子欠失にてHepG2.2.15細胞株では細胞増殖を有意に阻害したが、HepG2細胞株では細胞増殖を阻害しなかった。またINSIG2の抑制で起こる細胞増殖阻害効果は、HBVのpolyA末端の転写を抑制し、抗HBV効果を発揮するsiRNAをHepG2.2.15細胞株に共導入することで軽減された。</p> <p>HepG2.2.15細胞株においてINSIG2の抑制により細胞増殖の阻害が起こる原因を探索するためにRNAシーケンスを行い、その結果からKEGGパスウェイ解析を行ったところ、細胞周期調節経路とDNA複製経路の低下が認められた。さらにFACSによる細胞周期解析の結果、HepG2.2.15細胞株においてINSIG2を抑制するとG1/S期移行の遅延が認められた。実際、INSIG2の抑制はHepG2.2.15細胞株においてG1/S期移行に関与するCDK2を蛋白レベルで抑制していた。CDK2阻害剤を用いると、HepG2.2.15細胞株においてG1/S期移行が抑制されるが、CDK2阻害剤の存在下でINSIG2を抑制してもこれまで示した細胞増殖の阻害は認められなかった。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>INSIG2の抑制はCDK2依存的にHBV組み込み肝癌細胞株の細胞周期停止を誘導し、INSIG2はHBV関連肝発癌の脆弱性因子である可能性が示唆された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 福岡 誠

	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授	竹岡 誠
	副 査	大阪大学教授	江口 英利
	副 査	大阪大学教授	上田 啓次

論文審査の結果の要旨

B型肝炎ウイルス(HBV)はヒト感染後にしばしば宿主ゲノムに組み込まれることで肝発癌を促進するが、HBV 関連肝癌が有する脆弱性についてはこれまで明らかにされていない。

本論文ではヒト全ゲノムを対象としたCRISPRライブラリースクリーニングを用いてHBV 関連肝癌の脆弱因子の探索を目的に研究を行った。その結果、HBV ゲノム組み込み肝癌細胞では Insulin induced gene 2 (INSIG2) の抑制により細胞増殖が妨げられることを見出した。また細胞増殖が抑制される機序として、HBV ゲノム組み込み肝癌細胞において INSIG2 の抑制が CDK2 の抑制をきたし G1/S 期移行が遅延することで細胞周期を抑制すること、また INSIG2 は HBV が産生するウイルス蛋白の一つである HBx を介して Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) と分子的に結合することを見出した。

以上の論文内容につき、学位の授与に値すると考えられる。