

氏名	濱岡 和宏
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	乙第 1232 号
学位授与の日付	平成 25 年 5 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 1 項第 4 号に該当

学位申請論文タイトル及び掲載誌

SNPs in the Promoter Region of Osteopontin Gene as a Possible Host Factor for Sex Difference in Hepatocellular Carcinoma Development in Patients with HCV

C 型肝炎ウイルス感染者の肝発癌における性差を規定する宿主要因：オステオポンチン遺伝子プロモーターSNPs の意義

Hepatology International Online ISSN 1936-0541 2012 年 10 月 6 日 電子版掲載

学位審査委員（主査）教授 萩原 弘一

（副査）教授 宮澤 光男、教授 赤塚 俊隆、客員教授 井上 聡

論文内容の要旨

C 型肝炎ウイルス感染者の肝発癌における性差を規定する宿主要因：オステオポンチン遺伝子プロモーターSNPs の意義

C 型慢性肝炎では男性に比して女性は肝炎活動性が軽微な症例が多いなど肝病態に性差が認められる。肝炎は Th1 系の免疫応答により発症するが、オステオポンチンはその開始に必須のサイトカインであり、その発現は肝細胞および活性化した肝星細胞、Kupffer 細胞に見られる。そこで、学位申請者らはヒトのオステオポンチン遺伝子プロモーター領域の塩基配列を解析したところ、ほぼ 100% の連鎖不平衡を呈する nt -155, -616, -1,748 の 3SNPs と、これと独立した nt -443 の SNP を発見し、これらの組み合わせで肝炎活動性が規定されている可能性を見出した。一方、オステオポンチンは細胞外マトリックスとして肝癌の転移、浸潤にも関与することから、我々の見出した SNPs は肝発癌における個体差を規定している可能性がある。そこで、特に性差に注目して、肝発癌におけるこれら SNPs の意義と、その調節機構を解析した。

対象は C 型慢性肝疾患 296 例のうち、肝癌を併発した 120 例（男：女=78：42）。末梢血リンパ球から抽出した DNA を用いて、INVADER 法によって nt -155 と -443 の allele を同定したが、何れの頻度にも性差は認められなかった。一方、これら症例では肝癌発見時の末梢血血小板数は女性が男性に比して低値であり、女性では慢性肝疾患が進展してから肝発癌を生じる症例が多かった。しかし、女性でも nt -443 が C/C または C/T で nt -155 が deletion mutation の症例は、他の allele の組み合わせの症例に比して血小板数が高値で、慢性肝疾患の進展度が軽度でも肝癌を併発していた。

そこで、C 型慢性肝炎患者で各 SNPs の allele が判明している症例の DNA を用いて、転写開始

点から nt -658 までの promoter 領域を PCR 法で増幅した。得られた cDNA の haplotype は, nt-155, -443 の allele が夫々 deletion, C は I 型, deletion, T は II 型, G, T は III 型と分類し, これらを pGL3-basic vector に連結して HepG2 細胞に導入した。Dual-luciferase reporter assay によって転写活性を測定したところ, haplotype I, II, III 型の順に高値であり, オステオポンチンの転写活性が最も高度な遺伝子型の女性では, 慢性肝疾患の進展度が軽度でも肝発癌を生じると考えられた。

次いで, TF SEARCH による検討を実施したところ, nt -155 の近傍には deletion, G の何れ allele でも雄性細胞に特有な SRY が結合し, deletion の場合には FoxD3 が結合すると推定された。一方, nt -443 の近傍には, allele が T の場合にのみ CdxA が結合すると予測された。そこで, HepG2 細胞の核抽出蛋白を用いて, nt -155 ないし nt -443 を含むオリゴヌクレオチドとの gel-shift assay を実施したところ, 前者では 2 種類, 後者では 1 種類の結合シグナルが検出された。非標識オリゴヌクレオチドも添加した競合 assay の結果, nt -443 のシグナルは allele が T の場合が C に比して高度であり, nt -155 のシグナルのうち 1 種類は deletion が G に比して高度であった。また, nt -155 のもう 1 種類のシグナルは allele による結合の差異は認められなかったが, 抗 SRY 抗体を添加することによって消失した。また, HepG2 細胞における SRY の発現は Western blotting および RT-PCR によって確認された。

以上より, 肝発癌における性差にはオステオポンチンのプロモーター SNPs が関与していると考えられた。これら SNPs のうち, nt -155, nt -443 の allele と SRY および FoxD3 ないし CdxA と推定される転写因子との相互作用によって, 肝におけるオステオポンチンの発現が調節され, これが肝発癌を規定している可能性がある。