

学位論文題名

Cloning and Characterization
of a Novel Gene, *DRH1*, Down-regulated
in Advanced Human Hepatocellular Carcinoma

(進行肝細胞癌で発現が低下する新規遺伝子 *DRH1* の単離, 及びその特徴)

学位論文内容の要旨

肝細胞癌(肝癌)は、アジア、アフリカにおいて最も主要な悪性腫瘍の一つである。近年のめざましい診断技術及び治療方法の進歩はあるものの、肝癌の発生率は、依然上昇している。肝癌は、我が国の場合、肝炎ウイルスによる慢性障害肝に生ずることが多いが、ウイルスの発癌への関与は不明な点も多い。また、障害肝からの肝癌の高頻度の再発性と、門脈浸潤、肝内転移を生じやすいという特徴も肝癌をなかなか減少できないでいる大きな理由の一つである。

近年、癌の発生、進行に関して、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化といった遺伝子変異の蓄積が重要であることが、様々な癌において確立されてきている。発現の差に着目した subtractive hybridization や mRNA differential display of polymerase chain reaction (mRNA DD-PCR) といった方法は、癌での遺伝子変異を見つける上で有効な方法の一つである。肝癌においてもこのような方法を用いて、発癌、進展に関わる遺伝子の同定が試みられてきたが、鍵を握るとされる遺伝子の単離は依然なされていない。

今回、mRNA DD-PCR にて単離された肝癌細胞株間で発現の異なる遺伝子断片の中で、外科切除された肝癌症例を用いた検討で、非癌部に比べ癌部、特に進行癌で有意に発現が低下する *DRH1* のクローニングに成功したので報告する。

<方法と結果>

肝癌細胞株を用い mRNA DD-PCR を施行し、発現の差が認められた遺伝子断片を多数単離精製した。それらの中で、*DRH1* は KYN2 で発現の高い遺伝子として単離された。mRNA DD-PCR で単離された遺伝子断片の塩基配列からは、特に情報が得られなかったため、引き続き、KYN2 から作成した cDNA library によるスクリーニング、更に 5' RACE を施行し、最終的に、419 アミノ酸から成る 4084-bp の全長と思われるクローンを得た。データベース上、これまで報告のない新規の分子であったが、アミノ酸配列上、VDUP1 (accession No. NM_006472) と 41% の相同性を示した。剖検で得られた多臓器の正常組織での検討から、*DRH1* は、全身臓器に広く発現していることが判明した。また、National Institute of General Medical Sciences human × rodent somatic cell hybrid mapping panel 2 を用い、*DRH1* が、15 番染色体上に位置していることが判明した。データベースでも *DRH1* を含む DNA 領域が、15 番染色体長腕上に位置していることが、最近報告されている(accession

No. AC024651). GFP-*DRH1* fusion protein による検討から、*DRH1* は、主に細胞質に局在していると予想された。1998年7月から1999年6月までの間、国立がんセンター中央病院にて外科切除施行された肝癌 35 症例について、癌部、非癌部組織から RNA を抽出し、oligo-dT をプライマーとして、cDNA を作成した。SYBR Green PCR kit (ABI)を用いた real-time quantitative RT-PCR で、肝癌症例における *DRH1* の発現パターンを 7700 Sequence Detector (ABI) で評価した。その結果、35 症例中 29 症例 (83%) で非癌部と比べて、癌部で発現が低下していた。*GAPDH* の発現量で各々補正した発現値の平均は、非癌部で 9.02 ± 0.71 、癌部で 4.98 ± 0.73 であった ($p = 0.0001$)。症例毎に求めた非癌部の発現量に対する癌部の発現量 (T/N ratio) と臨床病理学的因子について、更に詳細に検討したところ、分化度の低い肝癌、血管侵襲を伴う肝癌、血清 AFP 値 (cut off 100 ng/ml) が高い肝癌症例で、有意に T/N ratio は、低値を示した。その他、腫瘍径、ウイルス感染の因子においても有意差を認めた。

<考察>

今回クローニングに成功した新規遺伝子 *DRH1* については、肝癌 35 症例での real-time quantitative RT-PCR での解析の結果、癌部での発現低下が、分化度の低い肝癌、血管侵襲のある肝癌、また AFP の高い肝癌症例で顕著であった。一般的に、肝癌は、多段階的に進行していく過程で脱分化を示し、そのなかで転移性が増し、血管侵襲を引き起こすようになってくる。この概念からすると、*DRH1* は、高分化肝癌で明白な発現低下を示さなかったことから、その発現低下は、肝癌の進展のなかで比較的 late event として位置付けられるのかもしれない。また、血管侵襲は肝癌の重要な予後因子の一つであると報告されており、*DRH1* も予後マーカーとして有益な可能性はある。

DRH1 と高いホモロジーを示す *VDUP1* は、分化誘導剤の一つである活性型ビタミン D3 で発現亢進する遺伝子として同定されたものである。*DRH1* は、低分化な肝癌ほど発現が著明に低下し、これは、*VDUP1* の発現パターンと矛盾しないものである。*DRH1* が、細胞の分化にとって必須の分子か、もしくは、分化の結果として発現が変化する分子なのかは、今後の検討が必要である。*DRH1* のアミノ酸配列上、核外移行シグナル配列を認めたが、GFP-*DRH1* fusion protein が主として細胞質に存在していたという結果は、*DRH1* の核外移行シグナル配列が、実際に機能していた可能性を示唆する。*DRH1* は、これまで肝癌では染色体異常の報告の少ない 15 番染色体上に位置していた。しかし、乳癌などで、15 番染色体の LOH (loss of heterozygosity) が特に進行癌で多く認められたという報告もあり、この領域に癌の進展を妨げる重要な遺伝子が存在している可能性もある。これは、*DRH1* が、肝癌の進行度を反映して発現が低下していくという結果とも矛盾しないものである。*DRH1* の癌での発現低下のメカニズムは、LOH やプロモーター領域のメチル化なども含めて、今後も検討すべき問題であろう。以上、*DRH1* の機能は、まだ多くは不明であるが、その発現低下の程度が、肝癌の病勢を非常に的確に反映しており、生物学的悪性度の指標として非常に有益と思われる。

<結論>

今回、肝癌の発育、進展に影響を与える遺伝子のスクリーニングを試み、進行した肝癌で発現の低下する *DRH1* の同定に成功した。今後、機能解析を進めることによって、肝癌の生物学的な理解がより深まり、更に、肝癌の診断、治療に有益な情報をもたらすものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Cloning and Characterization of a Novel Gene, *DRH1*, Down-regulated in Advanced Human Hepatocellular Carcinoma

(進行肝細胞癌で発現が低下する新規遺伝子 *DRH1* の単離, 及びその特徴)

近年、癌の発生、進行に関して、遺伝子変異の蓄積の重要性が、様々な癌で確立されてきている。今回、申請者は、肝癌の発生、進展に関わる遺伝子の同定を試みた。

具体的には、肝癌細胞株(PRF/PLC/5, KYN-2)を用い differential display を施行した。DRH1 は、KYN-2 で発現の高い遺伝子として単離され、419 アミノ酸から成る 4084-bp の新規遺伝子である。前骨髄性白血病細胞株 HL60 でビタミン D3 で発現亢進する遺伝子 VDUP1 とアミノ酸で 41% の相同性を示した。また、核外移行シグナルを有していた。DRH1 は、全身臓器に発現しており、15 番染色体上に位置していた。GFP-DRH1 融合蛋白をミドリサル線維芽細胞由来の COS7 に強制発現させたところ、細胞質に局在を示し、核外移行シグナルの存在に一致した所見であった。1998 年 7 月から一年間で、国立がんセンター中央病院にて手術施行された肝癌 35 症例の癌部、非癌部組織を用いて、real-time quantitative RT-PCR で、DRH1 の発現様式を評価した。35 症例中 29 症例 (83%) で非癌部と比べて、癌部で発現が低下していた。症例毎に求めた非癌部に対する癌部の発現量 (T/N 比) を臨床病理学的に検討したところ、分化度の低い肝癌、血管侵襲を伴う肝癌、血清 AFP 値が高い肝癌で、顕著に T/N 比は、低値を示した。その他、腫瘍径、ウイルス感染の因子においても有意差を認めた。

一般に、肝癌は、多段階的な進行の過程で脱分化を示し、血管侵襲を引き起こすようになる。DRH1 は、分化度の低い血管侵襲を伴う進行した肝癌で低下しており、この概念と合致している。また、血管侵襲は肝癌の重要な予後因子であり、DRH1 も予後因子として有益な可能性はある。DRH1 の位置する 15 番染色体は、肝癌では異常の報告は少ないが、乳癌で、15 番染色体の LOH が特に進行癌で多く認められたという報告もあり、DRH1 が進行した肝癌で発現が低下していた事は興味深い。その他、HBV 陽性の HCC は、HCV 陽性の HCC と比べて、DRH1 の発現はより低値を示した。未解明である肝発癌への肝炎ウイル

スの影響の機構の解析に、DRH1 の機能解析が役立つかもしれない。

今回、申請者は、肝癌の発育、進展に影響を与える遺伝子の同定を試み、進行した肝癌で発現の低下する細胞質蛋白の DRH1 をクローニングした。その機能は不明であるが、発現低下が、肝癌の生物学的悪性度をよく反映していると思われた。今後の機能解析により、肝癌の診断、治療に有益な情報をもたらすものと期待される。

公開発表に際し、副査の藤堂教授より、肝癌の特徴である不均一性から生ずる検体採取部位や時期の問題点に関して質問があった。申請者は、採取時に一部は病理標本として組織像を確認していると答えた。続いて、副査の浅香教授より、スクリーニングに用いた肝癌細胞株に関して、また、クローニングした DRH1 の全身臓器での発現に関してなどの質問があった。申請者は、前者の質問に対して、両細胞株間では運動能に著明な差が認められた以外、HBV の関与や AFP 産生能においても違いが認められ、DRH1 が運動能に関与している所見は得られていないが、HBV 陽性の HCC や AFP 高値の HCC で発現低下していた事実は、細胞株の特徴と合致すると答えた。後者の質問に対しては、DRH1 の多臓器での発現から house keeping gene 的なものである可能性を考え、他臓器の癌での更なる検討も必要であると答えた。続いて、主査の西教授より、数症例では、逆に腫瘍部で DRH1 の発現が亢進していたことに関して、またホモロジーの高かった VDUP1 の特徴に関してなど質問があった。申請者は、前者の質問に対して、この分子の機能が不明である以上、サンプリング時の問題以外にも発現亢進自体に意味がある可能性も考慮すべきであると答えた。後者の質問に対しては、VDUP1 も現時点で機能不明であるが、分化誘導剤での発現亢進していたことと、DRH1 が低分化癌で発現低下していたことは現象として類似すると答えた。細川眞澄男教授より、DRH1 の COS7 での細胞質内局在の意義と形態変化の有無に関して、また、小林正伸助教授より DRH1 の mRNA レベルでの発現低下の機序に関して質問があったが、各質問に対して、概ね適切な回答を行った。

本研究では、肝癌細胞株から単離された DRH1 が進行した肝癌で発現低下し、肝癌の悪性度を非常によく反映していたことが示されたことより、今後の肝癌の発生、進展の分子機構の解明に役立つ事が期待される。以上より、審査員一同はこの研究を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。