

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	井 口 恵 里 子
論文題目	DNA methyltransferase 3B plays a protective role against hepatocarcinogenesis caused by chronic inflammation via maintaining mitochondrial homeostasis (DNA メチル化酵素 DNMT3B は ミトコンドリアの恒常性維持を介し 炎症性肝発癌に対して防衛的に機能する)		
(論文内容の要旨) <p>肝細胞癌の多くはウイルス感染やNASHなどの慢性肝炎を背景に発生することが知られている。肝細胞癌のみならず、その前癌病変でもすでに DNA のメチル化異常が生じていることが報告されているが、発癌との関連については不明な点が多い。新規 DNA メチル化酵素の中でも、<i>Dnmt3b</i> は活発に転写される遺伝子の gene body に特異的に作用することが近年報告され、その異常が発癌に関与する可能性を示唆している。本研究では、<i>Dnmt3b</i> の異常が肝発癌過程において果たす役割を明らかにすることを目的とする。</p> <p>まず臨床検体を用いた RNA シーケンスの結果より、肝組織における DNMT3B の発現レベル及び発現アイソフォームの検討を行った。正常肝・慢性肝炎・肝硬変・肝癌と段階的に <i>Dnmt3b</i> の発現上昇が認められたが、肝硬変や癌部で発現する <i>Dnmt3b</i> のうち大部分が酵素活性ドメインを欠いたアイソフォームであり、正常な <i>Dnmt3b</i> の発現は慢性炎症の経過及び発癌とともに低下することが分かった。</p> <p>次に肝細胞特異的 <i>Dnmt3b</i> 欠損マウスを作成し、チオアセトアミド (TAA) 投与により慢性肝炎を惹起してその表現型を解析したところ、<i>Dnmt3b</i> 欠損マウスには、TAA4 週投与により強い肝炎が認められ、TAA30 週投与後には進行した線維化を背景に多くの肝癌が発生した。</p> <p>TAA 非投与下でのコントロールマウス及び <i>Dnmt3b</i> 欠損マウスの非腫瘍肝組織より抽出した DNA を用いて全ゲノムバイサルファイトシーケンスを行い、<i>Dnmt3b</i> 欠損により生じる DNA メチル化の変動を網羅的に解析したところ、<i>Dnmt3b</i> 欠損によりゲノム全体にわたって主に gene body に多くのメチル化低下部位が生じていることが確認された。</p> <p>また、TAA 投与前または TAA4 週投与後のコントロールマウス及び <i>Dnmt3b</i> 欠損マウスの非腫瘍肝組織より抽出した RNA を用いてトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子発現プロファイルを比較すると、TAA 非投与・4 週投与のいずれの条件下でも、<i>Dnmt3b</i> 欠損マウス肝において酸化関連遺伝子群の発現低下を認めた。</p> <p>この結果を踏まえ、<i>Dnmt3b</i> がミトコンドリア機能に及ぼす影響について検討した。初代肝細胞を用いたミトコンドリア呼吸の評価においては、予備呼吸能が <i>Dnmt3b</i> 欠損マウスで有意に低下している一方で活性酸素の生成が増強していることが確認された。また <i>Dnmt3b</i> 欠損マウスにおいては、非癌部肝組織で酸化ストレスマーカーである 8-OHdG が高発現していることが確認された。</p> <p>臨床検体における DNMT3B の発現解析からは、肝臓の炎症性発癌過程で正常な DNMT3B の発現が低下していくことが分かり、肝発癌に関与している可能性を示唆された。<i>Dnmt3b</i> 欠損マウスを用いた解析においては、<i>Dnmt3b</i> が欠損するとミトコンドリアの機能低下から酸化ストレスの蓄積をきたし、炎症の増悪及び発癌の促進が生じる可能性が示された。以上より、DNMT3B は酸化関連遺伝子群の恒常性維持を介し、炎症性肝発癌において防衛的に機能している可能性が考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

肝細胞癌や前癌病変には DNA メチル化異常が生じているが、発癌との関連については不明な点が多い。新規 DNA メチル化酵素のうち DNMT3B のみが転写中の遺伝子の **gene body** に作用することが近年報告され、その異常が発癌に関わる可能性が示唆されている。申請者らは肝発癌過程における DNMT3B の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

臨床検体の解析から、肝硬変や肝癌ではインタクトな DNMT3B 発現は低下し、酵素活性ドメインを欠損した isoform の発現が上昇することが分かった。肝細胞特異的 *Dnmt3b* 欠損マウスにチオアセトアミドを投与し慢性肝炎を惹起すると、欠損マウスに強い肝炎・線維化と多くの発癌が認められた。全ゲノムバイサルファイトシーケンスによる DNA メチル化網羅的解析では、*Dnmt3b* 欠損により転写制御関連遺伝子などにメチル化低下部位が生じており、RNA シーケンスでは、*Dnmt3b* 欠損マウス肝で酸化関連遺伝子群の発現低下が見られた。*Dnmt3b* 欠損マウスの初代培養肝細胞では、ミトコンドリア呼吸予備能低下と活性酸素種の増加が認められ、*Dnmt3b* 欠損下ではミトコンドリア機能低下から酸化ストレスが蓄積し、炎症・発癌が増悪する可能性が示された。

以上の研究は DNMT3B の炎症性肝発癌における防衛的機能の解明に貢献し、炎症性肝発癌の予防方策の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和3年2月3日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降