

論文内容の要旨

論文提出者氏名 小西 知佳

論文題目

EVI1, a target gene for amplification at 3q26, antagonizes transforming growth factor- β -mediated growth inhibition in hepatocellular carcinoma.

論文内容の要旨

肝細胞癌（以下、HCC）は世界で癌死の原因の第3位を占める。しかしその分子病理学的な成因は十分には明らかにされていない。HCCの発生と進展に関連する遺伝子を同定するために、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いてHCCに発生したDNAコピー数の異常を検索した。

まず、GeneChip mapping 100K/250K アレイ（Affymetrix社）を用いてHCC細胞株におけるDNAコピー数の異常を網羅的に探索した。20のHCC細胞株のうち、11株で染色体3q26領域にDNAコピー数の増加がみられ、とくにJHH-1細胞株において著しかった。3q26の共通遺伝子増幅領域には*MDS1*遺伝子と*EVI1*遺伝子から構成される*MECOM*遺伝子のみが座位した。FISH法でも*MDS1*と*EVI1*の増幅を確認した。

定量的PCR法でも*EVI1*のDNAコピー数の増加を確認した。すなわち、20のHCC細胞株のうち、7株において*EVI1*のコピー数増加を認め、JHH-1細胞において最も著しいコピー数増加を認めた。

*MECOM*から転写される*EVI1*、*MDS-EVI1*および*MDS1*の3つの転写産物のうち、どれが3q26増幅に伴って発現が亢進しているかを、それぞれの転写産物を特異的に検出する定量的TaqMan PCR法を開発して調べた。その結果、*MDS1*を除く*EVI1*と*MDS1-EVI1*は、JHH-1細胞で遺伝子増幅に伴って発現が亢進していた。また、タンパクレベルでもJHH-1細胞において*EVI1*の発現が亢進していた。

HCC臨床検体における*EVI1*コピー数をPCR法で定量したところ、*EVI1*のコピー数増加が66例中24例に見られた。

EVI1、*MDS-EVI1*および*MDS1*のmRNAレベルを36例のHCC患者の癌部・非癌部組織のペア検体でTaqMan法を用いて測定したところ、*EVI1*だけが非癌部と比較して癌部において有意に発現が亢進していた。以上の結果から、HCCにおいて*EVI1*が3q26増幅の標的遺伝子であることが示唆された。

次に、HCC臨床検体における*EVI1*発現レベルと臨床病理学的因子との関連を調べた。*EVI1*mRNAレベルの中央値で高発現群と低発現群の2群に分けたとこ

ろ、高*EVI1*発現群は有意に腫瘍径が大きく、またHCCの腫瘍マーカーであるPIVKAIIが高値であった。一方、年齢、性別、HBV/HCV感染など、他の因子との相関は明らかではなかった。また全生存率や無病生存率との相関も見られなかった。

最後に、*EVI1*のHCC発癌における機能を調べた。JHH-1細胞において2種類のsiRNAを用いて*EVI1*の発現をノックダウンした。*EVI1* siRNAまたはコントロールsiRNAをトランスフェクションしたJHH-1細胞をTGF- β で24時間処理し、TGF- β の古典的な標的遺伝子である*PAI-1*の発現をRT-PCR法で定量した。その結果、TGF- β により誘導される*PAI-1*の発現は、*EVI1* siRNAトランスフェクション細胞においてより高かったため、*EVI1*がTGF- β の下流遺伝子の発現を減弱させることが示唆された。

JHH-1細胞をTGF- β で刺激すると、細胞増殖を正に制御するp15^{ink4B}の発現が誘導され、逆に細胞増殖を正に制御するc-MycやサイクリンD1の発現は抑制された。JHH-1細胞に*EVI1* siRNAまたはコントロールsiRNAをトランスフェクション後にTGF- β で刺激すると、*EVI1* siRNAトランスフェクションした細胞では、コントロールsiRNAをトランスフェクション細胞に比べて、TGF- β によってp15^{ink4B}の発現がより強く誘導され、逆にTGF- β によってc-MycやサイクリンD1、さらにリン酸化Rbの発現はより強く抑制された。さらに、DNA合成の指標であるBrdUの取り込みも、*EVI1* siRNAトランスフェクション細胞の方が、TGF- β によってより強く抑制された。

一方、元々*EVI1*の発現が低いSNU398細胞に*EVI1*を強制発現すると、TGF- β によるBrdUの取り込み抑制効果が減弱した。

JHH-1細胞をTGF- β で刺激すると細胞の生存率は経時的に低下した。*EVI1* siRNAまたはコントロールsiRNAをトランスフェクション後にTGF- β で刺激すると、*EVI1* siRNAトランスフェクション細胞の方が、コントロールsiRNAトランスフェクション細胞に比べて、TGF- β による細胞の生存率の低下はより増強された。

以上から、*EVI1*は、TGF- β による細胞増殖抑制に拮抗することが示唆された。

本研究により、*EVI1*は、HCCで高頻度に認められる3q26遺伝子増幅により活性化される遺伝子であり、TGF- β 誘導性の増殖抑制に拮抗することでHCC細胞の増殖を促進する可能性が示唆された。それゆえ、HCCに対する新たな治療の分子標的候補となり得ると考えられた。