

氏名(本籍)	い せき ひろ よし 伊 関 大 敬 (千葉県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 3846 号		
学位授与年月日	平成 17 年 7 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Parvovirus NS induces an epigenetic modification through histone acetylation in host genes and tumor reversion (パルボウイルス NS による宿主細胞のエピジェネティックな遺伝子発現修飾及び腫瘍抑制)		
主査	筑波大学教授	薬学博士	永田 恭介
副査	筑波大学教授	医学博士	川上 康
副査	筑波大学教授	医学博士	加藤 光保
副査	筑波大学助教授	博士(医学)	澁谷 和子
副査	筑波大学助教授	医学博士	竹内 薫

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

パルボウイルスは腫瘍指向性や抗腫瘍活性を示すため、がん治療への応用の視点から注目されている。我々が分離したラットパルボウイルス (RPV/UT) は、ラット胸腺由来 T リンパ腫細胞 C58(NT)D に感染・増殖し、アポトーシスを誘導する。感染細胞の中にはアポトーシスを免れ生存し続ける細胞 (耐過細胞 C58(NT)D/R) が認められた。C58(NT)D/R は、細胞接着性の亢進、微絨毛の伸長、腫瘍形成能の低下などの点で親株細胞 C58(NT)D とは異なる形質を示した。H-1 パルボウイルス感染による耐過細胞の出現も報告されているが、いずれの場合も耐過細胞の出現及び形質変化のメカニズムは不明である。一方、DNA のメチル化やヒストンアセチル化などを介したエピジェネティックな遺伝子発現制御機構は、発生や腫瘍形成などに深く関連していることが知られている。がんウイルスによる腫瘍形成との関連も示唆されており、DNA メチル化及びヒストンアセチル化の視点からウイルス感染と宿主応答を理解することは重要と考えられる。そこで本研究では、パルボウイルス感染によって引き起こされる細胞の形質変化に関与する遺伝子を同定するとともに、それら遺伝子の発現制御へのエピジェネティック制御機構の関与を明らかにすることを目的とし、C58(NT)D と C58(NT)D/R 細胞の間で発現量の異なる遺伝子を representational difference analysis (RDA) 法により同定し、同定された遺伝子領域における DNA メチル化及びヒストンアセチル化の修飾について検討した。

(対象と方法)

- (1) RDA 法を用いて C58(NT)D と C58(NT)D/R 細胞で発現量の異なる遺伝子を同定した。
- (2) RDA 法により同定された *ciliary neurotrophic factor receptor alpha* (CNTFR α) に関して、C58(NT)D 細胞への RPV/UT 感染及び RPV/UT NS 遺伝子導入後の発現変化を、RT-PCR 法及び Western blotting 法

により検討した。*NS* 遺伝子の導入はウイルスベクターを用いた。

- (3) *NS* 遺伝子導入による C58(NT)D 細胞の形態の変化を光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡で観察した。
- (4) *CNTFR α* の発現制御に DNA メチル化あるいはヒストンアセチル化が関与しているかを検討するために、DNA メチル基転移酵素 (DNMT) 阻害剤及びヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤を C58(NT)D 細胞に添加し、*CNTFR α* の発現変化を RT-PCR 法及び Western blotting 法により検討した。
- (5) C58(NT)D 及び C58(NT)D/R 細胞、*NS* 遺伝子導入 C58(NT)D 細胞の *CNTFR α* 遺伝子 5' 上流域のヒストン H3 の 9 番目リシン残基 (K9) のアセチル化状態を chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay により検討した。
- (6) *NS* の抗腫瘍活性を検討するために、*NS* 遺伝子導入 C58(NT)D 細胞を 7 週齢ヌードマウス皮下に移植し、腫瘍形成頻度及び腫瘍サイズを計測した。

(結果)

- (1) RDA 法により 5 つの既知遺伝子と 2 つの新規遺伝子が検出された。既知遺伝子のうち *cathepsin E*, *TARPP*, *DHCR24* は C58(NT)D/R 細胞において発現が減少し、*CNTFR α* と *PASS-1* 亢進していた。
- (2) C58(NT)D 細胞への RPV/UT 感染及び *NS* 遺伝子導入により *CNTFR α* の発現誘導が観察された。
- (3) *NS* 遺伝子導入により、細胞接着性の亢進や微絨毛の伸長などの形質変化が観察された。
- (4) C58(NT)D 細胞への DNMT 及び HDAC 阻害剤の添加により、*CNTFR α* の発現誘導が認められた。
- (5) *CNTFR α* の 5' 上流域のヒストン H3-K9 は、C58(NT)D 細胞に比べ C58(NT)D/R 細胞においてアセチル化が亢進しており、さらに C58(NT)D 細胞への *NS* 遺伝子導入によっても亢進された。
- (6) *NS* 発現ウイルスベクター及び対照ウイルスベクターを C58(NT)D 細胞に感染させ、12 時間後にヌードマウス皮下に移植した結果、対照群では 10 検体中 7 検体で腫瘍形成が観察されたが、*NS* 導入細胞群では 10 検体中 4 検体のみだった。移植後 28 日目の平均腫瘍サイズは対照群で 1,909 mm³ であり、*NS* 導入細胞群では 335 mm³ で、*NS* により有意に腫瘍形成が抑制されていた。また、*NS* 発現ウイルスベクター感染後にクローニングした *NS* 遺伝子導入クローン及び対照クローンを同様に移植した結果、*NS* 遺伝子導入クローンにおいて有意に腫瘍形成が抑制されていた。

(結論と考察)

本研究により、RPV/UT 感染による宿主細胞の形質変化には *NS* 遺伝子が関わっており、その変化にエピジェネティックな修飾が関与している可能性が示された。

RDA 法で同定された *CNTFR α* は、C58(NT)D 細胞に比べ C58(NT)D/R 細胞で発現が高かった。*NS* の発現によって C58(NT)D 細胞において、*CNTFR α* の発現が誘導されることと、細胞接着の亢進や微絨毛の伸長など C58(NT)D/R 細胞が示す形質と類似の形質の変化が観察されることから、*NS* が RPV/UT による宿主細胞の形質変化の原因因子であることが示唆された。DNMT 阻害剤及び HDAC 阻害剤添加により、*CNTFR α* が誘導されることから、C58(NT)D 細胞においては、*CNTFR α* の発現は DNA メチル化及びヒストン脱アセチル化により抑制されている可能性が示唆された。また、ChIP assay により、C58(NT)D/R 細胞及び *NS* 遺伝子導入 C58(NT)D 細胞において、*CNTFR α* の 5' 上流域のヒストンアセチル化の亢進が示され、*NS* がヒストンアセチル化を介して宿主遺伝子発現を修飾する可能性が示唆された。さらに、*NS* は C58(NT)D 細胞の腫瘍形成を抑制した。以上の結果より、パルボウイルスによる腫瘍抑制などの形質変化に、*NS* によるヒストンアセチル化の修飾が関与していると考えられた。

審査の結果の要旨

本研究は、ラットパルボウイルス（RPV/UT）感染によって誘因される宿主細胞の形質変化の原因因子がNSである可能性を強く示唆し、NSによる腫瘍抑制などの宿主形質変化にはエピジェネティックな修飾が関与していることを示したものであり、RPV/UT感染による腫瘍抑制機構の理解に重要な手がかりを与えるとともにがん治療に対するパルボウイルスベクターの開発に対しても重要な知見を与えるものであり、価値ある研究と考えられる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。