

審査の結果の要旨

氏名 原田（辻） 小夜可

本研究は、リン脂質代謝酵素の一つである PNPLA7（リゾホスホリパーゼ）について、その機能と発現制御に関する基礎的な知見を構築するため、ヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2、Pnpla7 欠損マウス、およびヒト肝臓癌の検体を用いて検討を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. HepG2 細胞をコリン欠損培地、メチオニン欠損培地、コリン・メチオニン欠損培地で培養し、PNPLA ファミリーの発現をリアルタイム PCR によって確認した結果、メチオニン欠損培地による培養で PNPLA7 のみ有意な発現上昇が見られた。また、メチオニン欠損培地で培養した後にメチオニンを再添加すると PNPLA7 の発現が抑制された。このことから、PNPLA7 の発現にはメチオニンが関連していることが示された。
2. メチオニン欠損培地で培養したときの細胞内の代謝物変動をメタボローム解析によって検討した結果、メチオニン欠損ではメチオニン回路の代謝物量が全て減少しており、逆にホスファチジルコリン（PC）分解によるコリンの遊離およびその再利用による PC の再合成（コリン回路）に関わる代謝物量が上昇していた。メチオニンが欠損していると、メチオニン回路が動かなくなり、メチオニン回路から PC が作られなくなること、その状況下では、PNPLA7 の発現が誘導される結果コリン回路が活性化し、その結果 PC の量が保たれることが示唆された。
3. メタボローム解析の結果、メチオニン欠損はコリン・メチオニン回路以外に、ポリアミン経路、ピリミジン合成、解糖系、TCA 回路などにも影響を及ぼすことが示された。また、NADPH から NADP⁺への変換が止まっていたことから、脂肪酸合成が低下していることが推察された。
4. メチオニン欠損時では、PNPLA7 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化の減少が見られた。このことから、メチオニン欠損により PNPLA7 の発現が上昇する理由の一つは、PNPLA7 プロモーターの DNA メチル化減少によることが示唆された。
5. Pnpla7 欠損マウスの肝臓を用いて、ヒストン修飾のグローバルワイドな解析と DNA メチル化のゲノムワイドな解析を行った。ヒストン修飾を R の pheatmap でクラスタリングし、ヒートマップから野生型（WT）と欠損マウスの間で全体の傾向を比較すると、両者間でヒストンのメチル化状態が異なっており、特に H3K79 および H3.1K36 のメチル化低下ならびに脱メチル化増加の傾向が顕著であった。全ゲノム遺伝子の転写開始点から 2000bp 上流までを RRBS 法によってメチル化解析し、肝臓におけるメチル化が Pnpla7 の欠損により 15%以上減少していた 83 個の遺伝子を選択した後、マイクロア

レイ解析で発現が上昇している遺伝子と照合した結果、12 個の遺伝子を選択された。これらの結果から、*Pnpla7* 欠損によるメチオニン回路の低下（メチル基ドナーである SAM の低下）により当該 12 遺伝子のメチル化が抑えられ、その遺伝子発現が亢進した可能性が示された。

6. 肝臓癌の患者から摘出された臨床検体を用い、*PNPLA7* の発現をリアルタイム PCR で調べた結果、非癌部位と比べて癌部位で有意に減少していた。また、この減少は肝炎や線維化のグレードに関わらず、癌部位で減少している傾向が見られた。検体数の数が少ないため今後の追加解析が必要であるが、*PNPLA7* の発現は肝炎や線維化のグレードに関わらず肝臓癌で減少することが示唆された。

以上、本論文は細胞実験、マウス実験、臨床実験を用い、ゲノムワイドな幅広い検討を行うことにより、*PNPLA7* の発現制御に関わる栄養素がメチオニンであること、メチオニン回路の停滞に対する代償応答としてコリン回路が活性化し PC の量が一定に保たれること、*PNPLA7* によるリン脂質代謝はエピゲノムに影響を与えること、*PNPLA7* の発現は肝臓癌で減少することが示された。本研究は、*PNPLA7* がコリン・メチオニン回路の恒常性維持に働く酵素であることを証明するとともに、リン脂質代謝とエピゲノムをつなぐ分子機構を始めて解明したものであると考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。