

## 学位論文の要旨

保健学専攻	医療生命科学 分野 医療生命科学 領域	氏 名	竹澤 由夏
<b>題 目</b> siRNA down-regulation of <i>FGA</i> mRNA in HepG2 cells demonstrated that heterozygous abnormality of the A $\alpha$ -chain gene does not affect the plasma fibrinogen level (siRNA を用いた HepG2細胞の <i>FGA</i> mRNA 発現抑制実験は、フィブリノゲン A $\alpha$ 鎖遺伝子のヘテロ型異常では血漿フィブリノゲン濃度を低下させないことを明らかにした)			
<b>要 旨</b> <p>【背景と目的】フィブリノゲン (Fbg) は血液凝固カスケードの最終段階に働く分子量 340 kDa の糖蛋白であり、肝細胞で合成され血漿中に 180-350 mg/dl 程度存在する。血漿中の Fbg は A<math>\alpha</math>、B<math>\beta</math>、<math>\gamma</math>鎖の3種のポリペプチドがN末端でS-S結合した2量体を形成している。私は、A<math>\alpha</math>鎖遺伝子 (<i>FGA</i>) のホモ型遺伝子異常を示す2例の無 Fbg 血症患者、Kurashiki II と Yokkaichi を経験した。ところが予測に反して2例の患者の両親は、ヘテロ型遺伝子異常を有するにも関わらず Fbg 蛋白量は正常であった。同じ異常を持つ家系が国内で3例、中国で1例報告されており、何れの両親の Fbg 値も正常範囲内であった。そこで、<i>FGA</i> ヘテロ型遺伝子異常では Fbg 蛋白量を低下させないのではないかと考え、Fbg 産生 HepG2 細胞の Fbg 遺伝子 (<i>FGA</i>、<i>FGB</i>、<i>FGG</i>) mRNA を定量するとともに、siRNA を導入して各遺伝子の mRNA 量を一過性に抑制し、mRNA と蛋白量を比較検討した。</p> <p>【方法】始めに、ヒト正常肝細胞由来 RNA とヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞における各 Fbg 遺伝子発現量を TaqMan プローブを用いた real-time RT-PCR を行い定量した。次に <i>FGA</i>、<i>FGB</i>、<i>FGG</i> に対する各 siRNA を 1.0-30 nM の範囲で濃度を変えて HepG2 細胞に導入し、Negative Control siRNA を導入した Negative Control、siRNA (-) の Normal Control (NC) を比較対象として一過性に mRNA 発現量を抑制した。培養後、上清中の Fbg 蛋白量を ELISA 法にて測定するとともに、培養細胞から RNA を抽出し real-time RT-PCR を行い各遺伝子の mRNA 発現量を比較 Ct 法にて定量した。また、ヘテロ型遺伝子異常を再現するために、mRNA 発現量が 50 %程度となる siRNA 濃度における <i>FGA</i>、<i>FGB</i>、<i>FGG</i> mRNA 定量と Fbg 蛋白量定量の実験を3回繰り返して行った。</p> <p>【結果】ヒト正常肝細胞由来 RNA の mRNA 量を測定した結果、<i>FGA</i>、<i>FGB</i> の発現量はほぼ等しく、<i>FGG</i> より2倍程度多く発現していた。HepG2細胞においては、<i>FGA</i> は <i>FGG</i> の2倍、<i>FGB</i> の4倍程度発現量が多かった。siRNA を導入して一過性に mRNA の発現量を抑制した結果、siRNA の濃度依存的に mRNA の発現量は低下した。ヘテロ型遺伝子異常を HepG2細胞で再現するために mRNA 発現量を 50 %程度に抑制した結果、NC に比べ <i>FGA</i> では mRNA 量 46.3<math>\pm</math>4.4 % の時、蛋白量 77.7<math>\pm</math>7.1 %、<i>FGB</i> では mRNA 量 53.8<math>\pm</math>1.6 %、蛋白量 48.7<math>\pm</math>3.8 %、<i>FGG</i> では mRNA 量 45.2<math>\pm</math>1.3 %、蛋白量 56.7<math>\pm</math>3.0 % であり、<i>FGA</i> において有意に蛋白量が多かった (<math>p &lt; 0.05</math>)。 <i>FGB</i>、<i>FGG</i> では mRNA 量が 50 %程度になれば蛋白量も 50 %程度になるが、<i>FGA</i> では mRNA 量が 50 %程度でも蛋白量は 80 %程度存在することが明らかになった。</p> <p>【考察】<i>FGA</i> mRNA 量は <i>FGB</i>、<i>FGG</i> mRNA 量より2倍程度多いため、その発現量を 50 %に抑制しても <i>FGB</i>、<i>FGG</i> と同程度発現しており、Fbg 合成に十分な量の A<math>\alpha</math>鎖ポリペプチドが産生されるために、Fbg 蛋白量が減少しないと考えられた。したがって、ヒト肝細胞における Fbg 蛋白産生量は <i>FGA</i> mRNA 量ではなく、<i>FGB</i> または <i>FGG</i> mRNA 量が律速していると考えられた。近年、HepG2細胞を用いた研究で B<math>\beta</math>鎖ポリペプチド産生量が Fbg 産生を律速していると報告されており、私の結果と一致するものであった。また、ナンセンス変異、フレームシフト、スプライシング異常により正常な mRNA が産生されない無 Fbg 血症患者とヘテロ型遺伝子異常を示す両親の Fbg 測定値を文献検索したところ、150 mg/dl 以下症例は <i>FGA</i> 異常で 1/16 人 (6.3%)、<i>FGB</i> 異常では 4/8 人 (50%)、<i>FGG</i> 異常では 11/12 人 (91.7%) であり、私の研究結果を裏付けるものであった。</p> <p>【結語】<i>FGA</i> のヘテロ型遺伝子異常では Fbg 蛋白量が低下しないことが明らかになった。このため Fbg 測定値が正常であるために気づかれない <i>FGA</i> 遺伝子異常のヘテロ接合体がかなりの頻度で存在する可能性が示唆された。</p>			
研究指導教員 信州大学医学部 奥村 伸生			