



Title	新規 iPS 細胞由来肝芽腫モデルにおいて高発現する PAGE4 は肝芽腫の進展を促進する
Author(s)	河北, 一誠
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第17028号
Issue Date	2026-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k17028
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/100081
Type	doctoral thesis
File Information	KAWAKITA_Issei_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 河北 一誠

学 位 論 文 題 名

新規 iPS 細胞由来肝芽腫モデルにおいて高発現する PAGE4 は肝芽腫の進展を促進する
(PAGE4, upregulated in a novel iPSC-derived hepatoblastoma model,
promotes hepatoblastoma progression)

【背景と目的】

肝芽腫は胎児期の肝発生異常により発症する小児悪性肝腫瘍であり、症例の約 90%に β -catenin をコードする *CTNNB1* 遺伝子の変異を認める。一方で、その他の遺伝子変異は稀であり、全体の変異負荷は低いことから、エピゲノム異常や転写制御異常が肝芽腫の発生および進展に重要な役割を果たすと考えられている。近年の集学的治療の進歩により、症例全体の 5 年生存率は 80%以上と比較的良好な成績が報告されている一方で、遠隔転移例やシスプラチン抵抗性を示す症例では依然として予後不良であり、新規治療戦略の開発が強く求められている。しかし、これら治療抵抗性や腫瘍進展に関与する分子機構の詳細は、未だ十分に解明されていない。既報では、成熟マウス肝細胞に β -catenin の活性型変異および Hippo 経路の転写共役因子 YAP の活性型変異を導入することで肝芽腫様腫瘍が誘導されることが報告されているが、成熟肝細胞が本来有する分化状態や遺伝子発現プログラムを保持したままで腫瘍化が進行している可能性があり、実際の肝芽腫の発生過程を完全には反映していない可能性がある。加えて、ヒト由来細胞ではない点も、肝芽腫の発生機序を解釈する上での制約となっている。そこで、本研究では、肝芽腫の発生過程をより忠実に模倣することを目的として、ヒト iPS 細胞由来肝芽細胞に遺伝子変異を導入することで新規肝芽腫発生モデルを創出し、肝芽腫の形質獲得に関与する分子の同定および機能解析を通じて、将来的な治療標的となり得る分子を同定することを目的とした。

【材料と方法】

ヒト iPS 細胞由来内胚葉細胞を肝芽細胞へ分化誘導し、レンチウイルスを用いて活性型 *CTNNB1*^{S37Y} および活性型 *YAP*^{S127A} を単独または同時に導入した。遺伝子導入後の細胞について、形態学的変化を観察するとともに、real-time qPCR および Western blotting により mRNA およびタンパク質発現の変化を評価した。さらに、RNA シーケンス解析および Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行い、肝芽腫患者検体における遺伝子発現パターンとの比較検討を行った。網羅的解析により同定された候補遺伝子については、肝芽腫臨床検体を用いた免疫組織化学染色により発現を検証した。加えて、肝芽腫細胞株を用いて候補遺伝子のノックダウン実験を行い、細胞増殖能、アポトーシス、DNA 損傷応答および遊走能に及ぼす影響を解析した。

【結果】

対照群の細胞は肝細胞様の敷石状形態が観察されたのに対し、*CTNNB1*^{S37Y} と *YAP*^{S127A} を同時に導入した細胞は、細胞境界が不明瞭となり、緻密な細胞集塊を形成するなど、対照群とは異なる細胞形態の変化が認められた。これらの細胞では、 β -catenin および YAP の下流標的遺伝子であ

る *AXIN2* や *CTGF* の mRNA 発現が上昇し、両経路が機能的に活性化されていることが確認された。RNA-seq 解析および GSEA により、*CTNNB1*^{S37Y} と *YAP*^{S127A} の両者を導入した細胞のみが、肝芽腫患者検体に特徴的な遺伝子発現パターンと有意に一致しており、肝芽腫様細胞が誘導されたことが示された。続いて、 β -catenin と YAP の協調的活性化により特異的に誘導された遺伝子を同定するため、本モデルを用いた網羅的解析を行った。その結果、*CTNNB1*^{S37Y} 単独導入群および *YAP*^{S127A} 単独導入群では顕著な発現変動を示さず、*CTNNB1*^{S37Y} と *YAP*^{S127A} を同時に導入した群において特異的に発現上昇する遺伝子群が抽出され、これらの遺伝子の中で最も顕著な発現上昇を示した *Prostate-Associated Gene 4* (*PAGE4*) が同定された。*PAGE4* は免疫組織化学染色により、肝芽腫臨床検体において正常肝組織と比較して高発現しており、核内 β -catenin および YAP 陽性腫瘍細胞と強く共局在していた。また、肝芽腫細胞株を用いて β -catenin および YAP をそれぞれノックダウン、あるいは阻害薬により機能抑制したところ、mRNA およびタンパクレベルいずれにおいても *PAGE4* の発現は有意に低下した。これらの結果から、*PAGE4* の発現は β -catenin および YAP の活性に依存して制御されていることが示唆された。さらに、肝芽腫細胞株における *PAGE4* ノックダウンにより、細胞増殖は有意に抑制され、アポトーシスマーカーおよび DNA 損傷マーカーの増加が認められたことから、*PAGE4* が肝芽腫細胞の生存維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。また遊走能も有意に抑制されており、*PAGE4* は肝芽腫の腫瘍性形質の維持および進展に寄与していると考えられた。

【考察】

本研究により、ヒト iPS 細胞由来肝芽細胞に β -catenin および YAP 変異を導入することで、肝芽腫の発生過程を模倣した新規モデルを確立した。本モデルは、従来の成熟肝細胞由来モデルとは異なり、肝芽腫の発生学的背景を反映している点で意義が大きい。本モデルを用いた解析により、 β -catenin および YAP の協調的活性化によって *PAGE4* が誘導され、増殖、生存および遊走に寄与することが明らかとなった。 β -catenin と YAP は肝芽腫において高頻度に活性化される主要なシグナル経路であるが、両者の協調的作用によって誘導される下流分子については十分に解明されていなかった。本研究は、その下流に位置する新規関連分子として *PAGE4* を同定した点で重要である。*PAGE4* は、がん精巣抗原 (Cancer-Testis Antigen) として知られており、正常成人組織における発現が精巣を除き極めて限定的であることから、肝芽腫においても腫瘍特異的分子として機能している可能性が高い。*PAGE4* ノックダウンにより DNA 損傷応答およびアポトーシスが誘導されたことから、*PAGE4* は肝芽腫細胞においてストレス耐性や生存維持に関与している可能性が考えられる。肝芽腫では集学的治療の進歩により全体として良好な治療成績が得られている一方で、一部の症例では治療抵抗性や再発を呈し、依然として臨床的課題が残されている。*PAGE4* のような腫瘍特異的分子が、こうした予後不良症例の分子病態にどのように関与しているのかを解明することは、肝芽腫の病態理解を深化させるだけでなく、新たな治療戦略の構築につながる可能性がある。

【結論】

ヒト iPS 細胞由来肝芽細胞を用いた新規肝芽腫発生モデルを確立し、 β -catenin および YAP の協調的活性化により誘導される新規肝芽腫関連分子として *PAGE4* を同定した。*PAGE4* は肝芽腫細胞の増殖および生存を促進する因子であり、肝芽腫の病態形成に関与する新規分子として位置づけられる。本研究で確立したモデルは、肝芽腫の発生学的背景を反映した実験系として、腫瘍形成に関与する分子の同定や機能解析に有用であると考えられる。さらに、腫瘍特異的発現を示す *PAGE4* は、肝芽腫の分子病態解明に寄与するだけでなく、将来的な治療標的あるいは免疫標的としての応用可能性を有する分子であることが示唆された。