



Title	肝細胞癌におけるAPC結合タンパクEB1発現による増殖および転移促進に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	相山, 健
Description	配架番号 : 2593
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14511号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81494
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_Aiyama_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 相 山 健

学 位 論 文 題 名

肝細胞癌における APC 結合タンパク EB1 発現による増殖および転移促進に関する研究

(Adenomatous polyposis coli-binding protein end-binding 1 promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis)

【背景と目的】

肝癌は世界の部位別癌死亡の第 4 位、日本では第 5 位であり、その大半を肝細胞癌が占めている。切除可能な肝細胞癌は手術により切除することで根治を得られる可能性が高いと考えられてはいるが、その一方で根治切除後であっても肝内再発や血行性転移による再発を経験することが少なくはなく、いまだ予後不良の悪性疾患と言える。

近年、肝癌細胞株 9 種類と正常肝細胞株 4 種類を用いて蛍光 2 次元電気泳動法によるプロテオミクス解析で細胞株内のタンパク発現の違いを比較検討した研究で、Adenomatous polyposis coli (APC) 結合蛋白 EB1 が肝癌細胞株において有意に高発現していることが報告された。さらに、臨床検体を用いた同手法でのプロテオミクス解析で切除した肝細胞癌組織においても非癌部組織と比較して EB1 が有意に高発現していることが報告された。

EB1 は 1995 年に癌抑制遺伝子で知られている APC に結合するタンパクとして初めて同定され、現在は微小管の主伸長端に特異的に局在する微小管関連タンパクとして認識され、様々な微小管関連タンパクと結合して細胞骨格や細胞極性の維持、細胞の遊走、細胞分裂等の微小管が関与する細胞活動に極めて重要な役割を担っていると言われている。

しかし、EB1 の癌における機能的役割の報告は少なく、EB1 の癌における具体的なメカニズムについてはいまだ不明瞭である。特に肝細胞癌における EB1 高発現が細胞レベルでどのような機能的役割を果たしているのかは明らかでない。

以上より、EB1 は肝細胞癌の新たなバイオマーカーとしての可能性を秘めており、その機能解析を行うことで新たな治療対象となるタンパクの解明や新たな治療戦略の指標となると考えられたため、本研究を行った。

【対象と方法】

免疫組織化学染色の対象は 1997 年 1 月から 2006 年 12 月までに北海道大学病院消化器外科 I にて根治切除を施行した初発肝細胞癌 235 例である。抗ヒト EB1 ラビットポリクローナル抗体 (SC-15347) を用いて免疫組織化学染色を行った。腫瘍内に胆管上皮細胞より強く染まる EB1 陽性腫瘍細胞が腫瘍の 30% を占める場合、EB1 陽性肝細胞癌症例と判定した。

ヒト肝癌細胞株は HLF、HLE、HuH7、HepG2、JHH4、PLC/PRF/5、Li-7、Hep3B を用いた。EB1 の発現は siRNA と shRNA を用いてノックダウンし、CRISPR/Cas9 技術を用いてノックアウトした。タンパクと mRNA の発現量は Western blot とリアルタイム PCR で測定した。細胞増殖能は MTS アッセイ、細胞遊走能は Boyden chamber アッセイ、細胞浸潤能は Matrigel invasion chamber アッセイで評価した。マウス xenograft モデルには生後 4 週の雌 BALB/c nu/nu mouse を用いた。同一マウスに左右別々の比較対象細胞株を皮下注し、4 週間後に犠

牲死させ、腫瘍重量や腫瘍体積を測定した。

マイクロアレイ Agilent SurePrint G3 Human GE v3 8x60K Microarray (Design ID: 072363) を用いて EB1 と連動して変化した遺伝子を網羅的に解析した。コントロールと比較して 2 倍以上に遺伝子発現が変化したものを有意な変動と判断した。

【結果】

免疫組織化学染色では、肝細胞癌症例 235 例中 EB1 陽性症例は 24 例、EB1 陰性症例は 211 例であった。EB1 は AFP 値 ($p=0.0171$)、PIVKA-II ($p=0.0303$)、TNM 分類 ($p<0.0001$)、腫瘍径 ($p=0.0006$)、分化度 ($p<0.0001$)、門脈浸潤の有無 ($p<0.0001$)、肝内転移の有無

($p<0.0001$) と有意に相関した。また、EB1 陽性症例の全生存率は陰性症例と比較して有意に悪かった ($p<0.0001$ 、EB1 陽性症例の平均生存期間は 3.9 年で EB1 陰性症例のそれは 16.5 年であった)。また、再発率も EB1 陽性症例で有意に高かった ($p<0.0001$)

HuH7, HLF, HLE の EB1 を siRNA でノックダウンすると、増殖能、遊走能、浸潤能が有意に低下した。HLF を shRNA でノックダウンしても、同様に増殖能、遊走能、浸潤能が有意に低下した。HuH7 を CRISPR/Cas9 技術で EB1 をノックアウトした後に EB1 を再発現させると、EB1 をノックアウトした EB1-KO HuH7 と比べて EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 の増殖能、遊走能、浸潤能は有意に増加した。また、それらをマウスの皮下に注射して腫瘍形成能をみると、EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 の方が EB1-KO HuH7 より有意に腫瘍形成能が増加した。

マイクロアレイ解析では、Dlk1 や HAMP、SLC01B3 遺伝子が 2 倍以上有意に増幅していた

【考察】

本研究において、EB1 が肝細胞癌根治切除後症例の予後予測因子および再発予測因子として非常に有用であることを検証した。さらに、肝細胞癌における EB1 の発現は分化度や TNM 分類、腫瘍径、門脈浸潤、肝内転移といった臨床病理学的な因子とも強く相関していることを示した。また、細胞実験では EB1 の発現がヒト肝細胞癌において増殖能や遊走能、浸潤能と深くかかわっていることを証明した。そして、Xenograft モデルではヒト肝癌細胞株における EB1 発現が腫瘍形成能を亢進させることが分かった。最後に、Dlk1, HAMP, SLC01B3 等の EB1 発現と強く関連する遺伝子候補をマイクロアレイ解析で同定した。以上のことから、EB1 は肝細胞癌の増大や浸潤、転移に強く関わっており、上記遺伝子候補の分子機構を介した癌の進展メカニズムに深く関わっているものと考えられた。

【結論】

本研究は、肝細胞癌における EB1 発現が様々な臨床病理学的パラメータと有意に相関しており、肝細胞癌患者の不良な予後および高い再発率とも強く相関していることを示した。さらに、Dlk1, HAMP, SLC01B3 遺伝子が、EB1 の肝細胞癌進展メカニズムに関与している可能性を発見した。本知見は、未知の EB1 関連伝達経路が肝細胞癌の新しいバイオマーカーあるいは治療標的となりうる可能性を示唆している。