



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 相山 健

	主査	七戸 俊明	准教授
審査担当者	副査	加藤 徳雄	准教授
	副査	北村 秀光	准教授
	副査	畠山 鎮次	教 授

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)

申請者は、肝細胞癌症例における EB1 のバイオマーカーとしての有用性を臨床検体を用いて検討し、さらに肝癌細胞株における EB1 の細胞機能と EB1 発現の制御機構を検討した。まず、肝細胞癌症例の組織検体を用いた検討において、EB1 の発現が予後予測因子および再発予測因子として有用であることを示した。次に、肝癌細胞株に対して EB1 の発現を変動させることで、細胞増殖能や遊走能、浸潤能、腫瘍形成能が増減することを示した。さらに、EB1 をノックアウトさせた肝癌細胞株 HuH7 と再発現させた細胞株とのマイクロアレイ解析により、EB1 の分子機構に *Dlk1* 等の 18 遺伝子が関与している可能性を示した。

審査にあたり、まず副査の加藤准教授から既報の折茂らの論文と今回の申請者の研究では EB1 陽性の判定基準が異なっているが、その理由についての質問があり、申請者は本研究では EB1 が染色される腫瘍組織の平均的な染色率が 30%前後であったため、折茂らの 50%ではなく 30%を陽性判定に採用したと回答し、その旨を学位論文に追記すると回答した。また、臨床病理学的因子を示す表の数値の記載が発表スライドと学位論文で異なるとの指摘があり、申請者は確認し必要な訂正を加えると回答した。次に、Child-Pugh 分類の割合が群間で異なるが、Child-Pugh 分類 A に限定した解析を行わなかった理由についての質問があり、申請者は検討時には考慮しなかったが、このままの解析で問題ないと判断すると回答した。また、Stage 別の検討の有無についての質問があったが、申請者は未検討であると回答した。続いて、今回の実験に使用した肝癌細胞株の選定理由について質問があり、申請者は、HuH7 は CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子操作がしやすい細胞株であること、HLF と HLE は浸潤能が高いとされ細胞実験での差が出やすいと細胞株であると考え使用したと回答した。

次に、副査の北村准教授から EB1 の発現のメカニズムと再発肝細胞癌症例や転移巣での EB1 の発現変化に関する質問があり、申請者は十分な検討が行われていないと回答した。また、HuH7 細胞の EB1 をノックアウトしてから EB1 を再発現させる手法を用いた理由について質問があり、申請者は、当初 EB1 の過剰発現させた細胞株を実験に用いる予定であったがうまくいかず、EB1 を CRISPR/Cas9 でノックアウトした後、EB1 を再発現させる系を用いたと回答した。続いて、EB1 を shRNA でノックダウンした細胞株を用いた in vivo 実験の

実施の有無についての質問があり、申請者は実施していないと回答した。また、これらの細胞株に対して MTS assay 以外の増殖能評価の実施の有無について質問があり、申請者は発表には提示しなかったが cell count で確認していると回答した。さらに、EB1 の分子機構の解明において、HIF-1 やミトコンドリアの解糖系などの検討は行ったかとの質問があり、申請者は行っていないと回答した。また、これらの細胞に形態変化を認めたかの質問に対し、申請者は認めなかったと回答した。続いて、EB1 をターゲットとした治療法の可能性を問われ、申請者は EB1 自体を標的とすると副作用の観点から難しいことが推測されるので、EB1 の発現を調整する上流のタンパクを標的とするのがよいと思っていると回答した。

また、副査の畠山教授から EB1 のがん遺伝子的機能の分子メカニズムおよび *Dlk1* と EB1 のがん化における関連性の質問をしたところ、適切な回答をした。

最後に、主査の七戸准教授が、EB1 の発現調節の機能、正常細胞発現、EB1 ノックアウトマウスの表現型などの EB1 に対する基本的な知識を確認したが、申請者より一部回答が得られない部分があったため、主査は知識の再整理を行うように指導した。次に、siRNA を 2 種類用いた理由について質問があり、申請者は一般的に siRNA にはオフターゲット効果があるので、最低 2 種類以上の siRNA を用いて結果の妥当性を検証する必要があると回答した。また、論文記載において、RNA マイクロアレイ解析結果で得られた 18 遺伝子から 3 遺伝子を絞り込む経緯に関する記載が不十分であるとの指摘があり、申請者は適切に修正すると回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。