



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14511
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81495
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_Aiyama.pdf



学位論文

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)

2021 年 3 月

北海道大学

相山健

学位論文

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)

2021 年 3 月

北海道大学

相山健

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	6 頁
緒言	7 頁
方法	9 頁
結果	14 頁
考察	31 頁
結論	34 頁
謝辞	35 頁
利益相反	36 頁
引用文献	37 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Takeshi Aiyama, Tatsuya Orimo, Hideki Yokoo, Takanori Ohata, Kanako C. Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Moto Fukai, Toshiya Kamiyama, Akinobu Taketomi
Adenomatous polyposis coli-binding protein end-binding 1 promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis
PLOS ONE, 15(9):e0239462 (2020)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Takeshi Aiyama, Tatsuya Orimo, Hideki Yokoo, Takanori Ohata, Kanako Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Yoshihiro Matsuno, Takasuke Fukuhara, Kenji Wakayama, Tatsuhiko Kakisaka, Yousuke Tsuruga, Hirofumi Kamachi, Toshiya Kamiyama, Akinobu Taketomi
Adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 as an important predictive factor for the prognosis and recurrence in hepatocellular carcinoma.
AASLD the liver meeting 2014 (2014.11.7, Boston, USA)
2. 相山健、折茂達也、横尾英樹、大畑多嘉宣、畑中佳奈子、畑中豊、松野吉宏、神山俊哉、武富紹信
肝細胞癌における APC-binding protein EB1 の予後・再発予測因子としての有用性
第 73 回日本癌学会学術総会 (2014 年 9 月 25 日、横浜)
3. 相山健、横尾英樹、折茂達也、大畑多嘉宣、畑中佳奈子、畑中豊、松野吉宏、若山顕治、柿坂達彦、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信
肝細胞癌における Adenomatous polyposis coli 結合蛋白 EB1 の予後・再発予測因子としての有用性
第 25 回日本消化器癌発生学会総会 (2014 年 11 月 13 日、福岡)
4. 相山健、横尾英樹、折茂達也、大畑多嘉宣、畑中佳奈子、畑中豊、松野吉宏、高橋秀徳、若山顕治、柿坂達彦、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信
肝細胞癌における Adenomatous polyposis coli 結合蛋白 EB1 の新規バイオマーカーとしての可能性
第 115 回日本外科学会定期学術集会 (2015 年 10 月 8 日、名古屋)
5. 相山健、横尾英樹、折茂達也、大畑多嘉宣、柿坂達彦、畑中佳奈子、畑中豊、松野吉宏、高橋秀徳、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信
肝細胞

癌における Adenomatous polyposis coli 結合蛋白 EB1 と浸潤の関連性

第 26 回日本消化器癌発生学会総会 (2015 年 11 月 19 日、鳥取)

6. 相山健、横尾英樹、折茂達也、大畑多嘉宣、畑中佳奈子、畑中豊、松野吉宏、福原崇介、高橋秀徳、若山顕治、柿坂達彦、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信

肝細胞癌における Adenomatous polyposis coli 結合蛋白 EB1 の機能解析

第 116 回日本外科学会定期学術集会 (2016 年 4 月 14 日、大阪)

7. Takeshi Aiyama, Tatsuya Orimo, Hideki Yokoo, Takanori Ohata, Kanako Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Yoshihiro Matsuno, Takasuke Fukuhara, Hidenori Takahashi, Shingo Shimada, Kenji Wakayama, Tatsuhiko Kakisaka, Yousuke Tsuruga, Hirofumi Kamachi, Toshiya Kamiyama, Akinobu Taketomi

Adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 promotes proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells via Delta-like 1

10th ILCA annual conference (2016.9.2, Vancouver, Canada)

要旨

【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、現在は微小管の主に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りう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EB1 の 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* 等の18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。また、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。さらに、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*等の 18 候補遺伝子が、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。

略語表

AFP	alpha-fetoprotein
APC	adenomatous polyposis coli
AU	arbitrary units
CRSPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Cas9	CRISPR-associated proteins 9
Dlk1	delta-like 1 homolog
HAMP	hepcidin antimicrobial peptide
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
KO	knock out
PIVKA-II	prothrombin induced by vitamin K absence II
TNM	tumor-node-metastasis
UICC	union for international cancer control
SLC01B3	solute carrier organic anion transporter family member 1B3

緒言

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 (Bray F et al., 2018)。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 (Kudo et al., 2016 ; Shimada et al., 2017)。また、現在のところ術後補助化学療法を含めた術後治療については確立されていない。

従来、肝細胞癌の腫瘍マーカーとしては alpha-fetoprotein (AFP), AFP-L3, prothrombin induced by vitamin K absence II (PIVKA-II) が用いられてきたが、肝切除後の再発予測因子としては十分ではなく、様々な手法による肝細胞癌のバイオマーカーの探索的な研究がおこなわれてきた。そこで、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 (Fujii et al., 2005)。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 (Orimo et al., 2008)。

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、その後さまざまな種に高度に保存されたタンパクであることがわかり、現在は微小管の主に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ている (Su et al., 1995 ; Vaughan et al., 2005)。そのため、EB1 は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える (Vaughan et al., 2005 ; Morrison et al., 2007 ; Schliwa et al., 2002 ; Tirnauer et al., 2000)。

しかし、EB1 の癌における機能的役割の報告は少ない。食道癌や大腸癌、乳癌、神経膠芽腫の細胞株においては EB1 の増減が増殖能や遊走能、浸潤能に関与していることが報告はされている (Wnag et al., 2005 ; Sugihara et al., 2012 ; Dong et al., 2010 ; Bergers et al., 2014)。そして、肝細胞癌だけでなく、食道癌や胃癌、大腸癌、乳癌、神経膠芽腫においては癌部組織で EB1 が高発現を示し、それぞれの癌種において予後不良因子としても有用であることも報告されている (Orimo et al., 2008 ; Wnag et al., 2005 ; Nishigaki et al., 2005 ; Sugihara et al., 2012 ; Dong et al., 2010 ; Bergers et al., 2014)。しかし、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り、特に肝細胞癌における EB1 高発現は、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りうると考えられたため、本研究を行った。具体的には、肝細胞癌における EB1 の発現の有無が当院の臨床検体においても予後および再発予測因子として有用であるかどうかを検討した。また、肝癌細胞株において EB1 発現の増減が増殖能や遊走能、浸潤能にどのような影響を与えるのかを検討した。さらに、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR-Associated Proteins 9 (Cas9) 技術等を用いて肝癌細胞株の EB1 発現を遺伝的に操作し、*in vivo* における腫瘍形成能の変化を検討した。そして、RNA microarray を用いて EB1 の発現に関与する遺伝子を網羅的に解析した。

方法

1. 免疫組織化学染色

本実験は北海道大学病院高度先進医療センター自主臨床研究事務局により承認された課題名「新規バイオマーカーAPC 結合蛋白 EB1 の肝細胞癌発癌進展における分子機構の解明」(臨床研究番号: 013-0071) に基づき行われた。

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。腫瘍の病理診断は臨床・病理原発性肝癌取扱い規約(日本肝癌研究会, 2015) および Union for International Cancer Control (UICC) の tumor-node-metastasis (TNM) 分類 (Brierley JD, et al., 2017) に沿って病理医によって行われた。

方法は次の手順で行った。パラフィン包埋切片を 4 μ m に薄切しスライドグラスに固定した後に、キシレンを用いて脱パラフィンし、抗原賦活化処理を行った。抗原賦活化処理は PT Link (DAKO, Denmark) に Target Retrieval Solution (Dako, Denmark) を用いて 97°C で 20 分間施行した。次に、0.03% 過酸化水素で 5 分間内因性ペルオキシターゼ活性をブロックした後に、組織切片を 200 倍希釈した一次抗体である抗ヒト EB1 ラビットポリクローナル抗体 (SC-15347, Santa Cruz Biotechnology, USA) と共に室温で 30 分間インキュベートした。一次抗体希釈液を洗い流し、二次抗体 Envision FLEX HRP (DAKO, Denmark) を用いて 4°C で 30 分間反応させ、ジアミノベンジジン色素原を用いて発色させた。最後に、ヘマトキシリン染色で核を染色し、封入した。

腫瘍細胞の EB1 染色強度は、既存の論文 (Orimo et al., 2008) を参考に、胆管上皮細胞をコントロールとして比較し、それより強く染まっている腫瘍細胞を EB1 陽性腫瘍細胞とした。そして、腫瘍内における 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。この評価および判定は 2 人の病理医によって行った。

2. 細胞培養

本研究の細胞実験にはヒト肝癌細胞株である HLF、HLE、HuH7、HepG2、JHH4、PLC/PRF/5、Li-7、Hep3B を用いた。HLF、HLE、HuH7、HepG2、JHH4、PLC/PRF/5 は JCRB 細胞バンクより、Li-7 は RIKEN BRC CELL BANK より、Hep3B は ATCC より購入した。いずれの癌細胞株は 10% 非働化ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's Medium (Nacalai Tesque, Japan) を用いて、37°C、5%CO₂ 下の条件で培養した。

3. siRNA による EB1 ノックダウン肝癌細胞株の樹立

ヒト肝癌細胞株 HLF と HLE、HuH7 に対して、10nM のコントロール siRNA あるいは *EBI*-targeting siRNA (HSS117899 and HSS177032, Invitrogen, USA) をトランスフェクション試薬 Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Japan) とともに用いてトランスフェクションさせ、48 時間後にそのノックダウン効果を確認した。使用した *EBI*-targeting siRNA (si*EBI*-1 と si*EBI*-2) の塩基配列は表 1 に示す通りである。

表 1 *EBI*-targeting siRNA の塩基配列

si <i>EBI</i> -1	5' -CCGAAGAAACCUCUCACUUCUAGCA-3'
si <i>EBI</i> -2	5' -GGAUCAAUGAGUCUCUGCAGUUGAA-3'

4. shRNA による EB1 ノックダウン肝癌細胞株の樹立

本実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って行った。ヒト肝癌細胞株 HLF に対して、Non-targeting あるいは *EBI*-targeting shRNA ベクターを導入したレンチウイルス (MISSION TRC-Hs1.0 TRC-0000062138, Sigma-Aldrich, USA) をトランスフェクション試薬 FuGENE6 (Promega, Germany) とともにトランスフェクションし、ピューロマイシンでクローンを選択し、そのノックダウン効果を確認し、Non-targeting shRNA HLF と EB1 shRNA HLF を樹立した。

5. CRISPR/Cas9 技術による EB1 ノックアウト肝癌細胞株の樹立

本実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って行った。また、本実験に使用したプラスミド pX330 (plasmid #42230) は Addgene (USA) より購入した。ヒト肝癌細胞株 HuH7 に対して、*EBI* を特異的にターゲットとするように設計したプラスミド pX330-*EBI* をトランスフェクション試薬 TransIT-LT1 (Mirus, USA) とともにトランスフェクションし、Surveyor Mutation Detection Kit (IDT-706020, IDT, Japan) で *EBI* の塩基配列の変異を確認した後に、Aria III (BD Biosciences, USA) でソーティングし、限界希釈クローニングにて EB1 ノックアウト細胞株を単離し、EB1 の Knock out (KO) を確認し、EB1-KO HuH7 #1 細胞株と EB1-KO HuH7 #2 細胞株を樹立した。

6. EB1-KO 肝癌細胞株から EB1 再発現肝癌細胞株の樹立

本実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って行った。また、本実験に使用したレンチウイルスベクタープラスミド pLVSI-N-IRES-ZsGreen1 Vector および Lenti-X 293T Cell line は TAKARA (Japan) より購入した。EB1-KO HuH7 #1 細胞株

と EB1-K0 HuH7 #2 細胞株に対して、空のレンチウイルスあるいは *EB1* の遺伝子配列を組み込んだレンチウイルスをポリブレン (Nacalai Tesque, Japan) とともにトランスフェクションし、AriaIII (BD Biosciences, USA) でソーティングし、EB1 の再発現を確認し、EB1-K0 HuH7 #1 細胞株と EB1-K0 HuH7 #2 細胞株の EB1 再発現細胞株をそれぞれ樹立した。

7. リアルタイム PCR

細胞株から QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany) を用いて total RNA を抽出し、ReverTra Ace alpha (TOYOBO, Japan) で cDNA を作製した後に、SYBR Fast qPCR Mix (TAKARA, Japan) とそれぞれのプライマーを用いて Light Cycler (Roche, Switzerland) で増幅し、内在性コントロール遺伝子として β アクチンを用いて目的遺伝子の発現量を相対的に定量化した。使用したプライマーの塩基配列は表 2 に示す通りである。

表 2 それぞれのプライマーの塩基配列

<i>EB1</i>	forward	5' - CCTGGATCAATGAGTCTCTGC-3'
	reverse	5' - CACTTTCTTCAAGGCAATGGA-3'
<i>β-actin</i>	forward	5' - CTGTGGCATCCACGAAACTA-3'
	reverse	5' - GTACTTGCCTCAGGAGGAG-3'
<i>Dlk1</i>	forward	5' - AAATGGATTCTGCGAGGATG-3'
	reverse	5' - CAGGCCCCGAACATCTCTATC-3'

8. Western blot

細胞のタンパクはプロテアーゼ阻害剤を含んだ NP40 lysis buffer で細胞を溶解し抽出し、SDS sample buffer で調整し、95°C、5 分間加熱処理した。調整したサンプルは SDS-PAGE によって分離し、ゲルから PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜は 3% BSA でブロッキングした後で、1 次抗体希釈液で 90 分間室温でインキュベートし、さらに HRP 標識された 2 次抗体 (Cell Signaling Technology, USA) 希釈液で 60 分間室温でインキュベートし、化学発光器質を添加し、Chem Doc XRS (Bio-Rad, USA) で検出した。使用した 1 次抗体は表 3 に示す通りである。

表 3 使用した 1 次抗体

EB1	rabbit polyclonal	SC-15347, Santa Cruz Biotechnology, USA
β -actin	rabbit monoclonal	#4970, Cell Signaling Technology, USA

Aurora B	rabbit polyclonal	ab2254, Abcam, UK
Phos-Aurora B	rabbit polyclonal	ab115793, Abcam, UK
Cyclin D1	rabbit monoclonal	#2978, Cell Signaling Technology, USA
Phos-Cyclin D1	rabbit monoclonal	#3300, Cell Signaling Technology, USA
Rb	rabbit monoclonal	#9313, Cell Signaling Technology, USA
Phos-Rb	rabbit monoclonal	#3590, Cell Signaling Technology, USA
Erk1/2	rabbit monoclonal	#4695, Cell Signaling Technology, USA
Phos-Erk1/2	rabbit monoclonal	#4370, Cell Signaling Technology, USA
JNK	rabbit monoclonal	#9258, Cell Signaling Technology, USA
Phos-JNK	rabbit monoclonal	#4668, Cell Signaling Technology, USA
Acetyl- α tubulin	rabbit monoclonal	#5335, Cell Signaling Technology, USA
α -tubulin	rabbit monoclonal	#2125, Cell Signaling Technology, USA
E-cadherin	mouse monoclonal	ab1416, Abcam, UK
Dlk1	rabbit polyclonal	ab21682, Abcam, UK

9. 細胞増殖アッセイ

本実験には CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay キット (G3580, Promega, Germany) を使用し、次の手順で行った。それぞれの細胞株を 96 ウェルのカルチャープレートに 1.0×10^3 個/ウェルの条件で撒き、day 1, 2, 3, 4 に上記キットを使用し、490nm の吸光度を Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA) で測定した。

10. 細胞遊走アッセイ

本実験には 24 well plate の Transwell Permeable support 8.0 μ m PET Membrane (BD Biosciences, USA) を用いた。血清抜きの培養液を入れた上のチャンバーに細胞を撒き、そのチャンバーを 10% 非働化ウシ胎児血清を含んだ培養液が入った下のチャンバーにセットし、22 時間培養した後、上のチャンバー内に残った細胞は綿棒で除去し、膜を通過しチャンバーの下の方に遊走した細胞を Diff-Quick (Sysmex, Japan) で染色し、顕微鏡の 200 倍率で 5 視野をランダムに選別しカウントした。

11. 細胞浸潤アッセイ

本実験には 24 well plate の Matrigel invasion chamber (Corning, USA) を用いた。血清抜きの培養液を入れた上のチャンバーに細胞を撒き、そのチャンバーを 10% 非働化ウシ胎児血清を含んだ培養液が入った下のチャンバーにセットし、22 時間培養

した後に、上のチャンバー内に残った細胞は綿棒で除去し、膜およびマトリゲルを通してチャンバーの下面に浸潤した細胞を Diff-Quick (Sysmex, Japan) で染色し、顕微鏡の 200 倍率で 5 視野をランダムに選別しカウントした。

1 2. マウス xenograft model (n=5)

本実験は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。また、本実験に使用した生後 4 週の雌 BALB/c nu/nu mouse は CLEA Japan (Japan) から購入した。50 μ l の PBS と 50 μ l のマトリゲル基底膜マトリックスグロースファクターリデュースト (#356230, BD Sciences, USA) の混合液に 1.0×10^7 個の EB1-KO HuH7 細胞株を混ぜ合わせ、マウスの側腹部に皮下注した。マウスの右側に EB1-KO 後にレンチウイルスで EB1 を再発現させた HuH7 細胞株を、左側に EB1-KO 後に空のレンチウイルスを感染させたコントロール HuH7 細胞株を皮下注した。形成された皮下腫瘍は毎週大きさを測定し、皮下注後 4 週目にマウスを犠牲死（全身麻酔＋頸椎脱臼）され、皮下腫瘍を摘出し、大きさと重量を測定した。腫瘍体積 (mm³) は (短径 mm)² × (長径 mm) × 0.5 という近似式を用いて算出した。

1 3. マイクロアレイ解析

EB1-KO 後にレンチウイルスで EB1 を再発現させた HuH7 細胞株と EB1-KO 後に空のレンチウイルスを感染させたコントロール HuH7 細胞株から QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany) を用いて抽出した total RNA を、Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color (Agilent Technologies, USA) を用いて Cy3 で標識した cRNA に変換し、マイクロアレイ Agilent SurePrint G3 Human GE v3 8x60K Microarray (Design ID: 072363) のプローベにハイブリダイゼーションさせ、Agilent feature extraction software version 11.5.1.1 で数値化し、Agilent GeneSpring software version 13.1.1 で解析した (正規化条件: per chip normalization to 75 percentile shift)。本実験では 2 倍以上の発現差がある遺伝子を有意に発現差が認められた遺伝子と判定した。

1 4. 統計解析

本実験には JMP Pro 14 (SAS Institute, USA) を使用し解析した。2 群間の比較には、データのカテゴリによって Student t 検定や Fisher 検定、Mann-Whitney U 検定を使用した。ただし、生命曲線は Kaplan-Meier 法を用い、群間比較をログランク検定で行った。有意差がある場合、 $p < 0.05$ を図中で*として表記した。

結果

1. EB1 陽性肝細胞癌症例は予後不良で再発率が高かった

EB1 の免疫組織化学染色では正常肝細胞は染まらなかったが、肝細胞癌の腫瘍細胞の一部、胆管上皮細胞、リンパ球が強く染色された (図 1)。胆管上皮細胞より強く染まる腫瘍細胞を EB1 陽性腫瘍細胞とし、さらにその EB1 陽性腫瘍細胞が腫瘍全体の 30%以上を占める場合に EB1 陽性肝細胞癌症例と定義したところ、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。

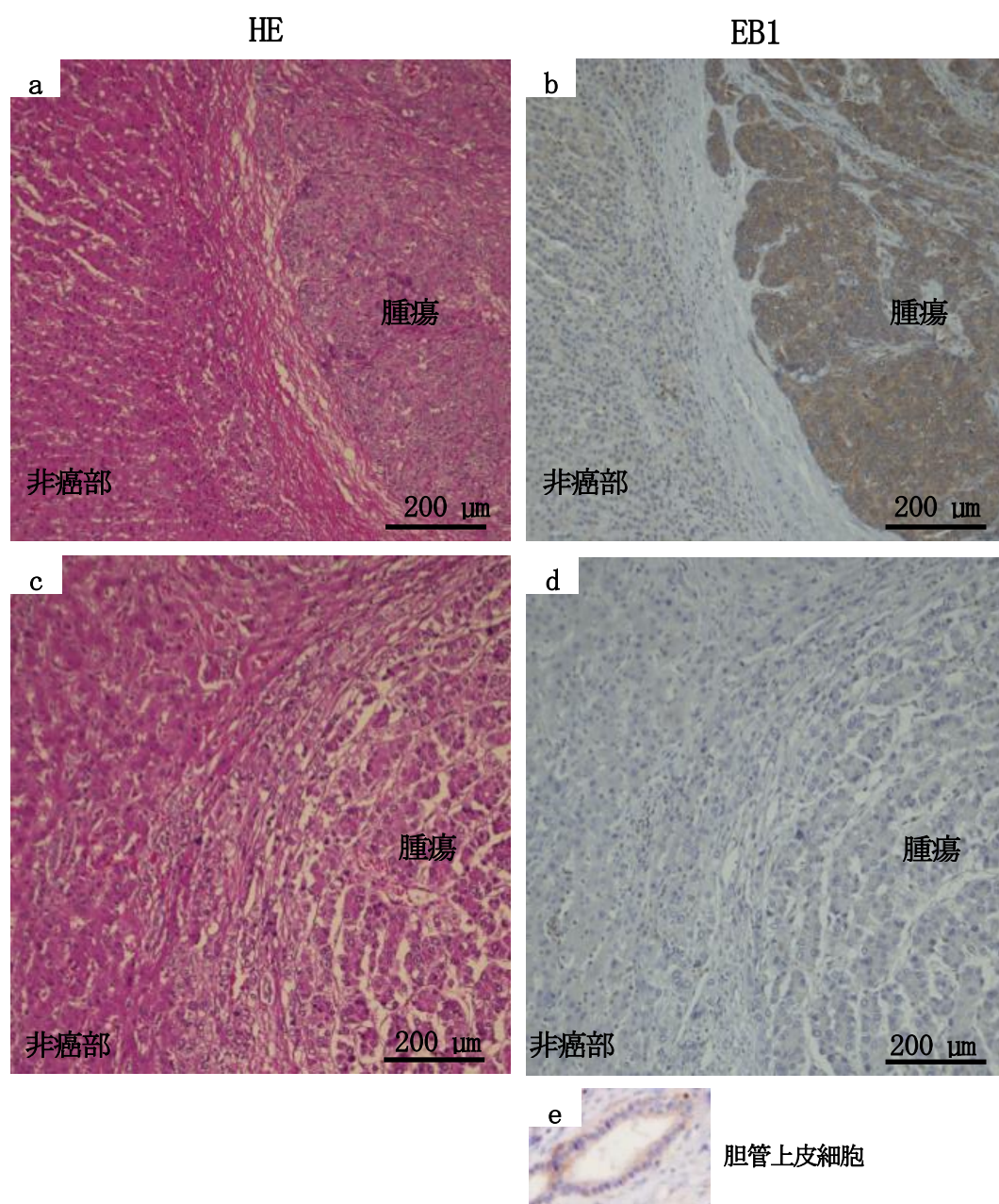


図1 肝細胞癌組織検体における EB1 免疫組織化学染色

肝細胞癌組織検体を EB1 抗体で免疫組織化学染色し、胆管上皮細胞より強く染まっている腫瘍細胞を EB1 陽性細胞とし、腫瘍内における EB1 陽性腫瘍細胞が 30%を占める肝細胞癌症例を EB1 陽性症例とした。その EB1 陽性症例と EB1 陰性症例の代表例を示す。

a と b: 腫瘍細胞全体が EB1 に強く染まっている EB1 陽性肝細胞癌症例

(a が HE 染色、b が EB1 免疫組織化学染色)

c と d: 腫瘍細胞全体が EB1 に染まっていない EB1 陰性肝細胞癌症例

(c が HE 染色、d が EB1 免疫組織化学染色)

e: EB1 に弱く染まっているコントロールの胆管上皮細胞

2 群間における臨床病理学的因子の関連性を検討したところ、EB1 陽性症例は 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 ($p<0.0001$) において有意に悪性度が高かった (表 1)。

表 1 肝細胞癌症例における EB1 と臨床病理学的因子との関連性

	n	EB1		p 値
		陰性 (%)	陽性 (%)	
症例数	235	211	24	
性別				
男性	195	172 (81.5)	23 (95.8)	0.0891
女性	40	39 (18.5)	1 (4.2)	
年齢 (歳)		61.7 ± 9.0	56.3 ± 7.6	0.0054
肝炎ウイルス感染				
HBV	89	77 (36.5)	12 (50.0)	0.3461
HCV	86	78 (37.0)	8 (33.3)	
両方	6	5 (2.4)	1 (4.2)	
なし	54	51 (24.1)	3 (12.5)	
Child-Pugh 分類				

A	228	207 (98. 1)	21 (87. 5)	0. 0251
B	7	4 (1. 9)	3 (12. 5)	
肝硬変				
あり	80	70 (33. 1)	10 (41. 6)	0. 4957
なし	155	141 (66. 9)	14 (58. 4)	
AFP (ng/ml)				
≥20	119	101 (47. 8)	18 (75. 0)	0. 0171
<20	116	110 (52. 2)	6 (25. 0)	
PIVKA-II (AU/ml)				
≥40	137	118 (55. 9)	19 (79. 1)	0. 0303
<40	98	93 (44. 1)	5 (20. 9)	
TNM 分類				
I or II	198	188 (89. 1)	10 (41. 6)	<0. 0001
III or IV	37	23 (10. 9)	14 (58. 4)	
腫瘍個数				
単発	172	160 (75. 8)	12 (50. 0)	0. 0130
多発	63	51 (24. 1)	12 (50. 0)	
腫瘍径 (cm)		4. 7 ± 3. 4	7. 4 ± 4. 8	0. 0006
分化度				
高 or 中分化度	188	178 (84. 3)	10 (41. 6)	<0. 0001
低分化度	47	33 (15. 7)	14 (58. 4)	
門脈浸潤				
あり	43	29 (13. 7)	14 (58. 4)	<0. 0001
なし	192	182 (86. 3)	10 (41. 6)	
肝内転移				
あり	57	46 (21. 8)	11 (45. 8)	0. 0207
なし	178	165 (78. 2)	13 (54. 2)	

2 群間における予後および再発率について検討したところ、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 ($p<0.0001$) (図2)。

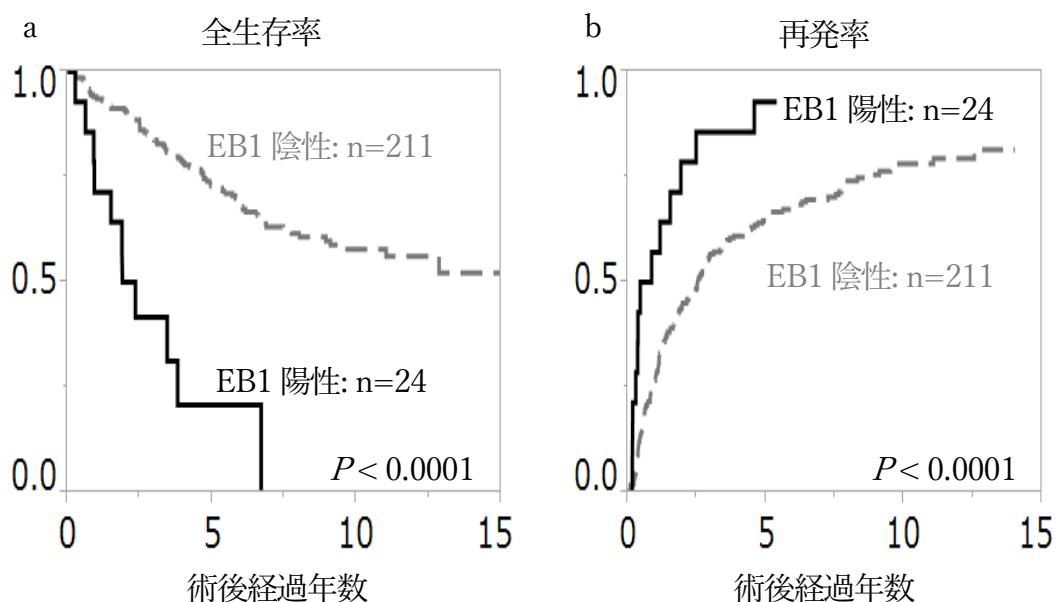


図2 肝細胞癌症例の全生存率と再発率

EB1免疫組織化学染色によって肝細胞癌症例をEB1陽性症例とEB1陰性症例に群分けし、全生存率と再発率をKaplan-Meier法を用いてグラフ化し、ログランク検定でそれぞれを比較検討した。

a: EB1陽性症例はEB1陰性症例と比較して有意に予後が悪い。

b: EB1陽性症例はEB1陰性症例と比較して有意に再発率が高い。

2. ヒト肝癌細胞株におけるEB1の発現

ヒト肝癌細胞株 HLF, HLE, PLC/PRF/5, HepG2, Li-7, HuH7, JHH4, Hep3B におけるEB1の発現の有無をタンパクおよびmRNAレベルで確認したところ、すべてのヒト肝癌細胞株においてEB1の発現が認められた (図3)。

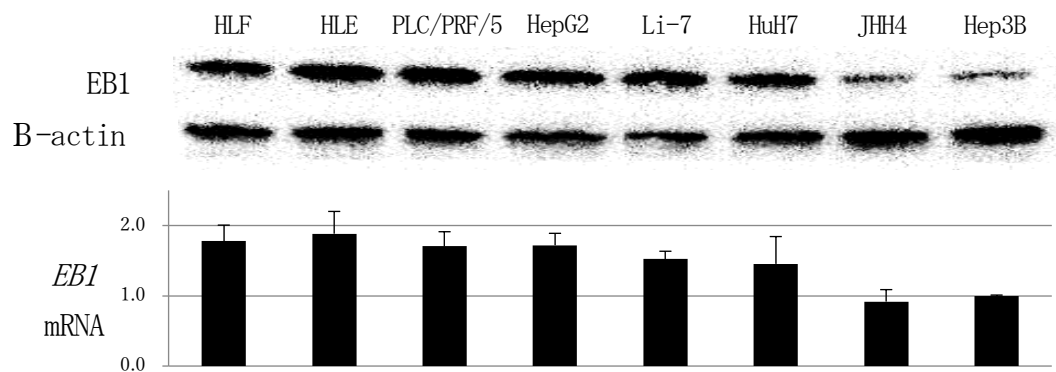


図3 ヒト肝癌細胞株におけるEB1のタンパクとmRNAの発現

ヒト肝癌細胞株 HLF、HLE、PLC/PRF/5、HepG2、Li-7、HuH7、JHH4、Hep3B からタンパクと mRNA を抽出し、Western blot とリアルタイム PCR を用いて各細胞株における EB1 タンパクと mRNA の発現を検討した。

全てのヒト肝癌細胞株において EB1 タンパクと mRNA 発現が確認された。

3. HuH7, HLF, HLE において *EB1* 特異的 siRNA による EB1 のノックダウンは増殖能、遊走能、浸潤能を低下させた

2 種類の *EB1* 特異的 siRNA は HuH7, HLF, HLE においてそれぞれ EB1 の発現を抑制していることをタンパクおよび mRNA レベルで確認した (図 4a)。

HuH7, HLF, HLE の増殖能は siRNA による EB1 のノックダウン効果によってそれぞれ有意に低下した (図 4b)。同様に、遊走能も浸潤能も低下した (図 4c と 4d)。

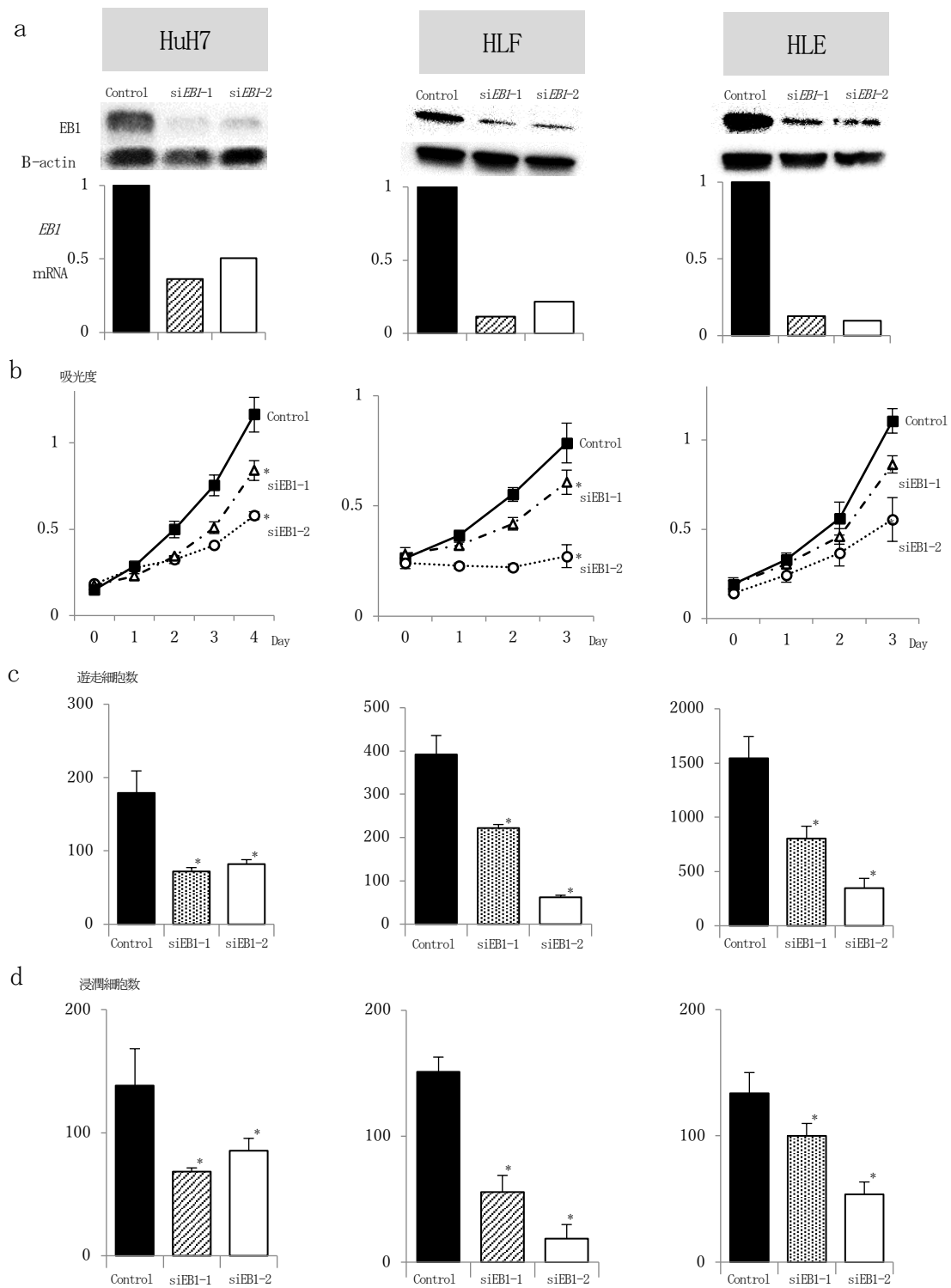


図4 *EB1* 特異的 siRNA による HuH7, HLF, HLE の増殖能、遊走能、浸潤能の低下

HuH7, HLF, HLE に対して 2 種類の *EB1* 特異的 siRNA を用いて *EB1* を一過性にノックダウンし、各細胞株の増殖能、遊走能、浸潤能がどのように変化するかを比較検討した。*EB1* タンパクと mRNA の発現は Western blot とリアルタイム PCR を用いて評価した。増殖能は MTS assay を用いて評価した。遊走能は Transwell chamber を用いて評価した。浸潤能は Matrigel invasion chamber を用いて評価した。

- a: HuH7、HLF、HLE のいずれにおいても 2 種類の *EB1* 特異的 siRNA によって *EB1* がノックダウンされた。
- b: HuH7、HLF、HLE のいずれにおいても *EB1* 特異的 siRNA によって増殖能が有意に低下した。
- c: HuH7、HLF、HLE のいずれにおいても *EB1* 特異的 siRNA によって遊走能が有意に低下した。
- d: HuH7、HLF、HLE のいずれにおいても *EB1* 特異的 siRNA によって浸潤能が有意に低下した。

4. HLF において *EB1* 特異的 shRNA による *EB1* ノックダウンは増殖能、遊走能、浸潤能を低下させた

EB1 特異的 shRNA は HLF において *EB1* の発現を抑制していることをタンパクおよび mRNA レベルで確認した (図 5a)。

HLF の増殖能は shRNA による *EB1* のノックダウン効果によって有意に低下した (図 5b)。同様に、遊走能も浸潤能も低下した (図 5c と 5d)。

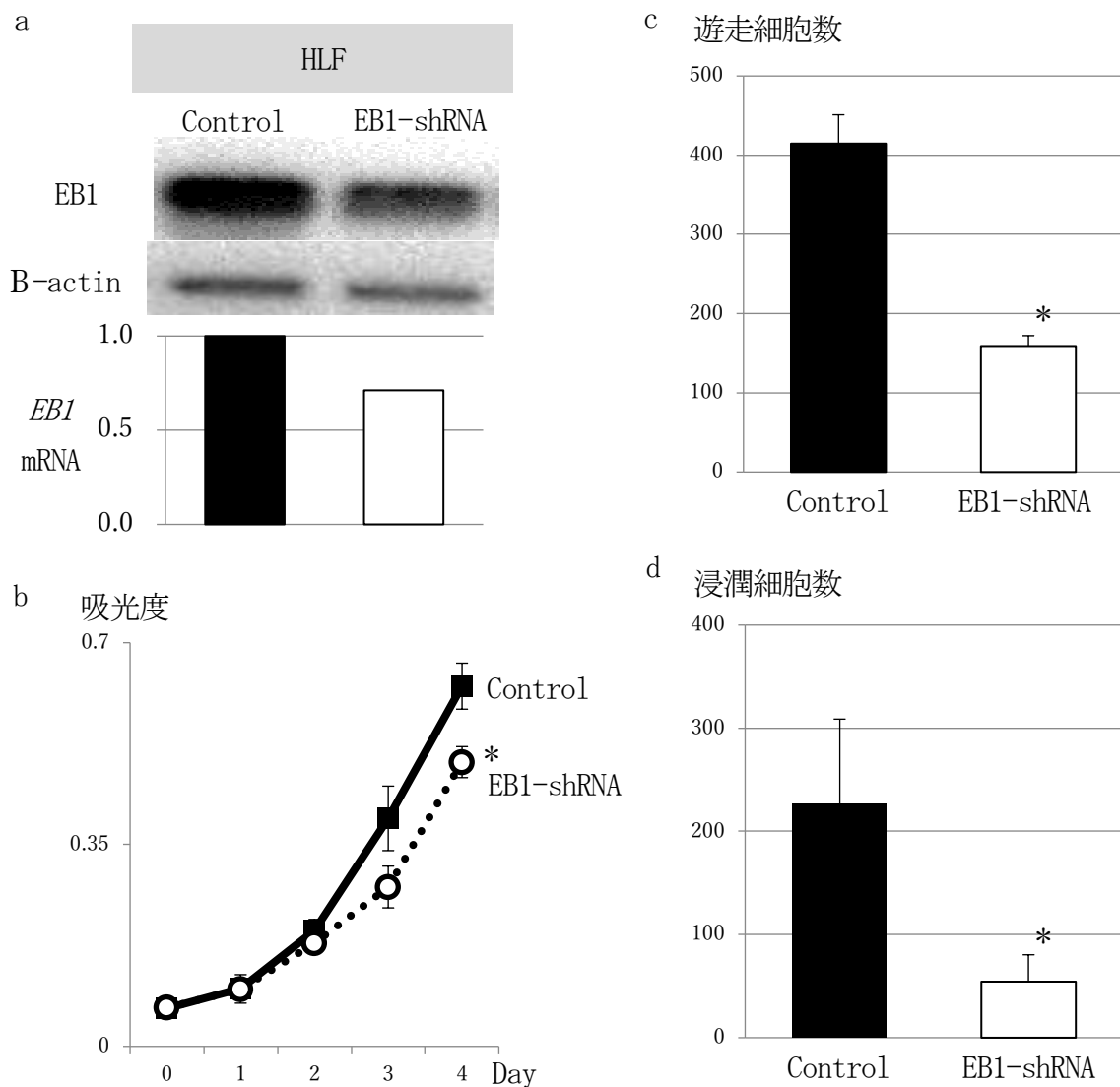


図5 *EB1* 特異的 shRNA による HLF の増殖能、遊走能、浸潤能の低下
 HLF に対して *EB1* 特異的 shRNA を用いて EB1 を定常的にノックダウンし、
 HLF の増殖能、遊走能、浸潤能がどのように変化するかを比較検討した。
 EB1 タンパクと mRNA の発現は Western blot とリアルタイム PCR を用いて
 評価した。増殖能は MTS assay を用いて評価した。遊走能は Transwell
 chamber を用いて評価した。浸潤能は Matrigel invasion chamber を用い
 て評価した。

- a: *EB1* 特異的 shRNA によって EB1 がノックダウンされた。
 b: *EB1* 特異的 shRNA によって HLF の増殖能が有意に低下した。
 c: *EB1* 特異的 shRNA によって HLF の遊走能が有意に低下した。
 d: *EB1* 特異的 shRNA によって HLF の浸潤能が有意に低下した。

5. EB1-KO HuH7 に EB1 を再発現させると増殖能、遊走能、浸潤能が増加した

EB1 を KO した EB1-KO HuH7 #1 と #2 に EB1 を再発現させたことをタンパクおよび mRNA レベルで確認した (図 6a)。

EB1-KO HuH7 #1 と #2 に EB1 を再発現させると、それぞれ増殖能が増加した (図 6b)。同様に、遊走能も浸潤能もそれぞれで増加した (図 6c と 6d)。

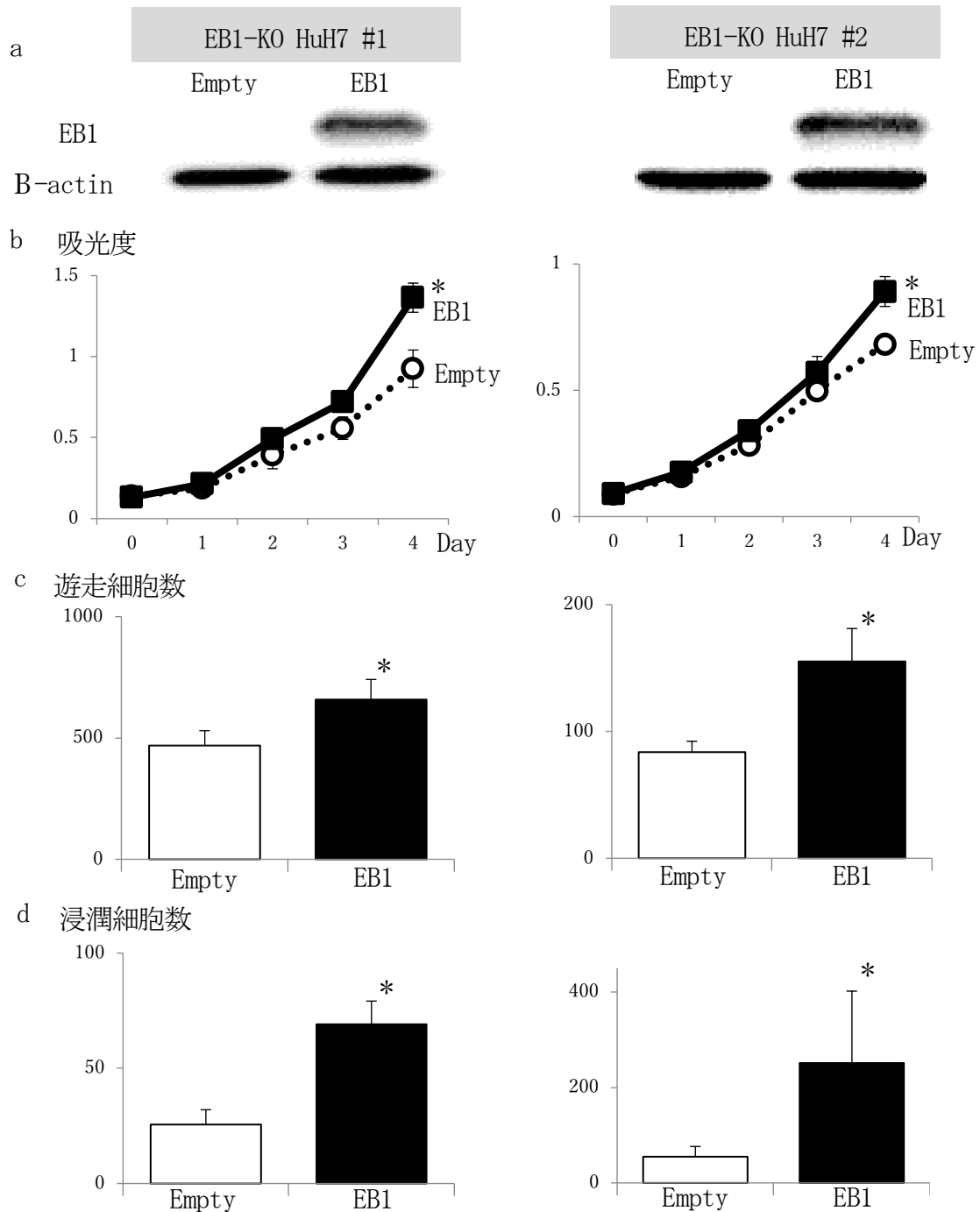


図6 EB1再発現後EB1-KO HuH7における増殖能、遊走能、浸潤能の増加
CRISPR/Cas9技術を用いてEB1をノックアウト(KO)したEB1-KO HuH7に対して、*EB1*遺伝子配列を組み込んだレンチウイルスでEB1を再発現させることで、EB1-KO HuH7の増殖能、遊走能、浸潤能がどのように変化するかを比較検討した。EB1タンパクの発現はWestern blotを用いて評価した。増殖能はMTS assayを用いて評価した。遊走能はTranswell chamberを用いて評価した。浸潤能はMatrigel invasion chamberを用いて評価した。

- a: EB1再発現後EB1-KO HuH7でEB1の再発現を確認した。
- b: EB1の再発現によってEB1-KO HuH7の増殖能が有意に増加した。
- c: EB1の再発現によってEB1-KO HuH7の遊走能が有意に増加した。
- d: EB1の再発現によってEB1-KO HuH7の浸潤能が有意に増加した。

6. EB1-KO HuH7にEB1を再発現させるとマウスにおける腫瘍形成が促進された

同一マウス (n=5) の左側にEB1をKOしたEB1-KO HuH7を、右側にEB1再発現したEB1再発現後EB1-KO HuH7を皮下注し、1週間毎に腫瘍の短径と長径を測定し、4週間後に腫瘍を摘出し重量を比較したところ、EB1-KO HuH7にEB1を再発現させることで肉眼的にも明らかに腫瘍形成が促進され (図7aと7b)、腫瘍重量も腫瘍体積も有意に増加した (図7cと7d)。摘出した腫瘍をEB1抗体で免疫組織化学染色したところ、EB1-KO HuH7ではEB1の発現が認められず、EB1再発現後EB1-KO HuH7ではEB1の再発現が維持されていることが確認できた (図7e-7h)。

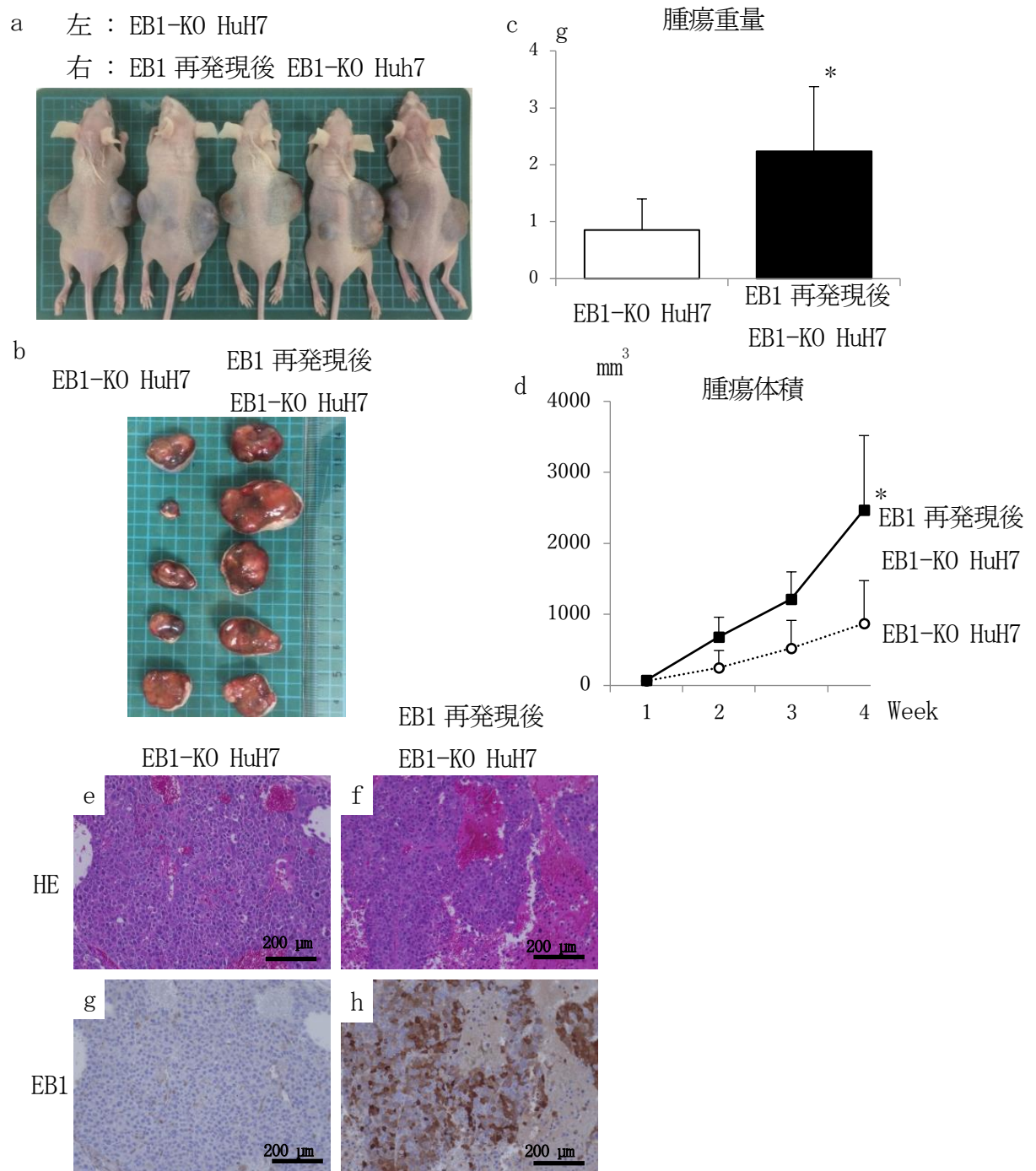


図7 EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 における腫瘍形成能の増加

マウスの右側に EB1-KO 後にレンチウイルスで EB1 を再発現させた EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 を、マウスの左側に EB1-KO 後に空のレンチウイルスを感染させた EB1-KO HuH7 を皮下注射し、1 週間毎にそれぞれの皮下腫瘍径を測定し、4 週間後に全ての皮下腫瘍を摘出し、腫瘍重量と腫瘍体積を測定し

比較検討した。腫瘍体積 (mm^3) は (短径 mm)² × (長径 mm) × 0.5 という近似式を用いて算出した。それぞれの皮下腫瘍内の EB1 発現は EB1 抗体を用いた免疫組織化学染色で評価した。

a と b: 右の EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 により形成された腫瘍は EB1-KO HuH7 の腫瘍より肉眼的に明らかに増大した。

c: EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 の腫瘍重量は EB1-KO HuH7 の腫瘍より有意に増加した。

d: EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 の腫瘍体積は EB1-KO HuH7 の腫瘍より有意に増大した。

e と g: EB1-KO HuH7 の腫瘍では EB1 のノックアウトが維持されていた。(e が HE 染色、g が EB1 免疫組織化学染色)

f と h: EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 の腫瘍では EB1 の再発現が維持されていた。(f が HE 染色、h が EB1 免疫組織化学染色)

7. EB1-KO HuH7 では EB1 再発現前後で Aurora B のリン酸化は変化しなかった

EB1-KO HuH7 において、EB1 を再発現させても Aurora B のリン酸化促進は認められなかった (図 8)。

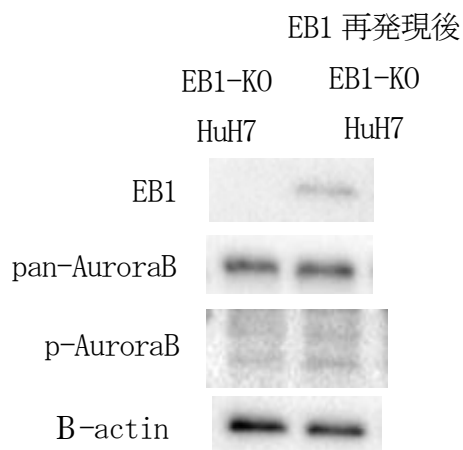


図 8 EB1-KO HuH7 と EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 における Aurora B のリン酸化状態

同条件で通常培養した EB1-KO HuH7 と EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 からタンパクを抽出し、Western blot を用いて Aurora B のリン酸化状態を比較検討した。

AuroraB のリン酸化状態は EB1-KO HuH7 において EB1 発現の有無に関わっていないかった。

8. EB1-KO HuH7 ではEB1 再発現前後で Rb と Cyclin D1 のリン酸化は変化しなかった

EB1-KO HuH7 において、EB1 を再発現させても癌抑制遺伝子 Rb のリン酸化の促進は認められなかった。また、Cyclin D1 のリン酸化も促進されなかった(図 9)。

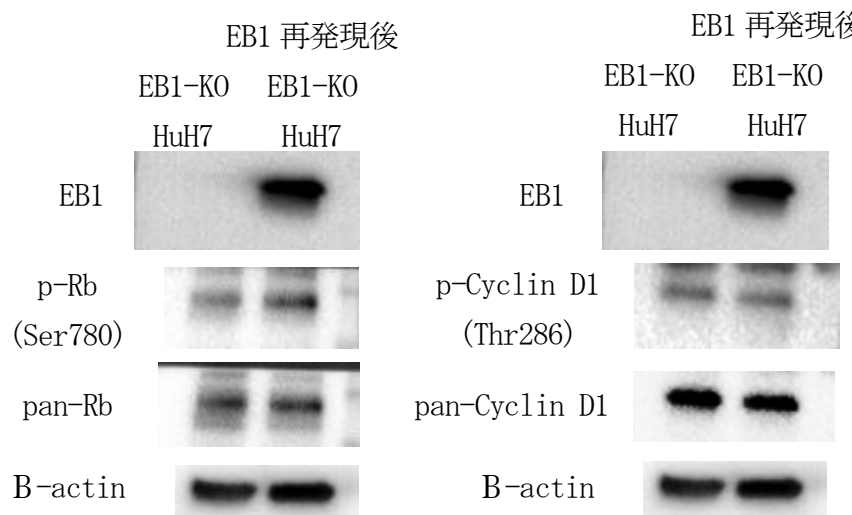


図 9 EB1-KO HuH7 と EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 における Rb と Cyclin D1 のリン酸化状態

同条件で通常培養した EB1-KO HuH7 と EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 からタンパクを抽出し、Western blot を用いて Rb と Cyclin D1 のリン酸化状態を比較検討した。

左: Rb のリン酸化状態は EB1-KO HuH7 において EB1 の発現の有無に関わっていないかった。

右: Cyclin D1 のリン酸化状態も EB1-KO HuH7 において EB1 の発現の有無に関わっていないかった。

9. EB1-KO HuH7 では EB1 再発現前後で Erk と JNK のリン酸化は変化しなかった

EB1-KO HuH7 において、EB1 を再発現させても癌抑制遺伝子 Erk のリン酸化の促進は認められなかった。また、JNK のリン酸化も促進されなかった(図 10)。

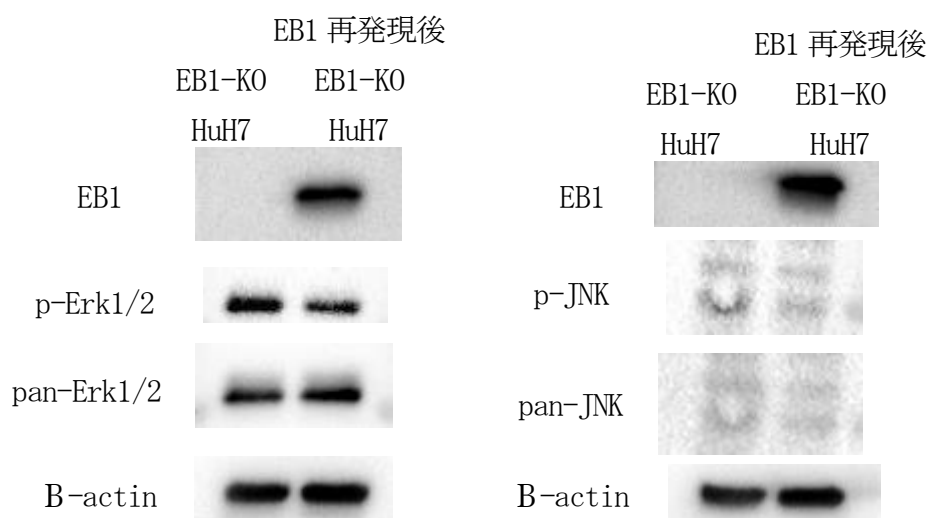


図 10 EB1-KO HuH7 と EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 における Erk と JNK のリン酸化状態

同条件で通常培養した EB1-KO HuH7 と EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 からタンパクを抽出し、Western blot を用いて Erk と JNK のリン酸化状態を比較検討した。

左: Erk のリン酸化状態は EB1-KO HuH7 において EB1 の発現の有無に関わっていないかった。

右: JNK のリン酸化状態も EB1-KO HuH7 において EB1 の発現の有無に関わっていないかった。

10. EB1-KO HuH7 では EB1 再発現前後で α -tubulin のアセチル化は変化しなかった
EB1-KO HuH7 において、EB1 を再発現させても細胞内全体の α -tubulin のアセチル化促進は認められなかった (図 11)。

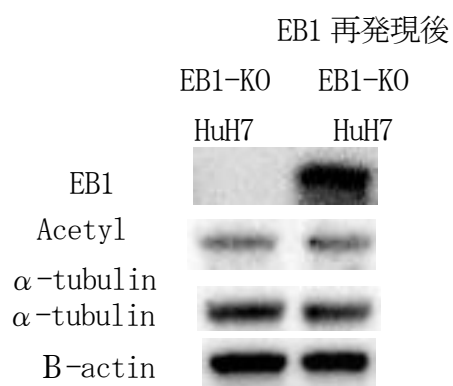


図 11 EB1-KO HuH7 と EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 における α -tubulin のアセチル化状態

同条件で通常培養した EB1-KO HuH7 と EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 からタンパクを抽出し、Western blot を用いての α -tubulin のアセチル化状態を比較検討した。

α -tubulin のアセチル化状態は EB1-KO HuH7 において EB1 発現の有無に関わっていなかった。

1 1. EB1-KO HuH7 では EB1 再発現前後で E-cadherin の発現量に変化はなかった

EB1-KO HuH7 において、EB1 を再発現させても E-cadherin の発現量の変化は認められなかった (図 12)。

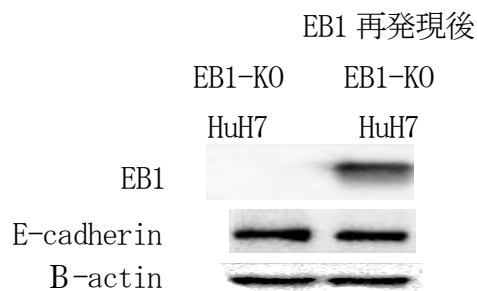


図 12 EB1-KO HuH7 と EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 における E-cadherin の発現量変化

同条件で通常培養した EB1-KO HuH7 と EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 からタンパクを抽出し、Western blot を用いての E-cadherin の発現量を比較検討した。

E-cadherin の発現量は EB1-KO HuH7 において EB1 発現の有無に関わっていなかった。

1 2. マイクロアレイ解析による EB1 発現に関連する遺伝子の同定

EB1 を KO した EB1-KO HuH と EB1 を再発現させた EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 の細胞内で 2 倍以上発現が変動した遺伝子を同定するためにマイクロアレイ解析を行ったところ、*Delta-like 1 homolog (Dlk1)* , *Hepcidin antimicrobial peptide (HAMP)* , *Solute carrier organic anion transporter family member 1B3 (SLC01B3)* などの 18 遺伝子候補が同定された (図 13)。

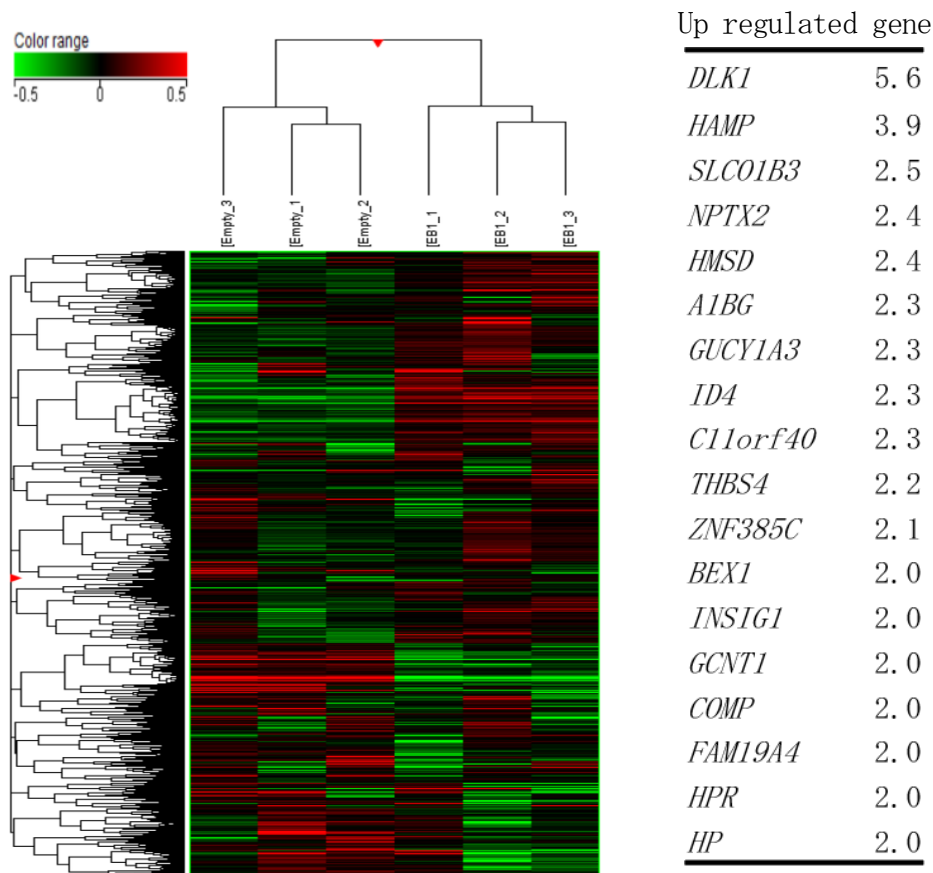


図 13 マイクロアレイ解析で同定された EB1 発現によって変動した遺伝子
EB1-KO 後にレンチウイルスで EB1 を再発現させた EB1 再発現後 EB1-KO
HuH7 と EB1-KO 後に空のレンチウイルスを感染させた EB1-KO HuH7 から抽
出した total RNA を Cy3 で標識した cRNA に変換し、マイクロアレイ
Agilent SurePrint G3 Human GE v3 8x60K Microarray (Design ID:
072363) のプローベにハイブリダイゼーションさせ解析し、EB1 の発現の有
無によって変動した遺伝子を比較検討した。本実験では 2 倍以上の発現差
がある遺伝子を有意な発現差が認められた遺伝子と判定した。
EB1 が発現していない EB1-KO HuH7 に EB1 を再発現させることで、*DLK1*、
HAMP、*SLC01B3*、*NPTX2*、*HMSD*、*A1BG*、*GUCY1A3*、*ID4*、*CLLORF40*、*THBS4*、
ZNF385C、*BEX1*、*INSIG1*、*GCNT1*、*COMP*、*FAM19A4*、*HPR*、*HP* の 18 遺伝子に 2
倍以上の変動がみられた。

1 3. EB1-KO HuH7 では EB1 再発現前後で *Dlk1* の mRNA とタンパクの発現に変化がみ
られた

マイクロアレイ解析にて最も発現変動が大きかった *Dlk1* に着目して、EB1-KO HuH7 における実際の mRNA およびタンパク発現の変化を確認した。EB1-KO HuH7 において、EB1 を再発現させると *Dlk1* の発現量が mRNA レベルでもタンパクレベルでも増加していることがリアルタイム PCR と Western blot で認められた (図 14)。

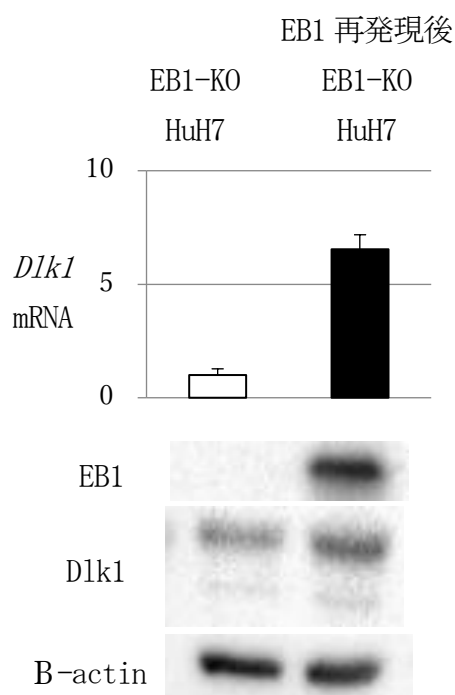


図 14 EB1-KO HuH7 と EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 における *Dlk1* の発現量変化

同条件で通常培養した EB1-KO HuH7 と EB1 再発現後 EB1-KO HuH7 からタンパクと mRNA を抽出し、Western blot とリアルタイム PCR を用いての *Dlk1* の発現量を比較検討した。

EB1-KO HuH7 において EB1 が再発現することで、

上: *Dlk1* の mRNA 発現量が増加した。

下: *Dlk1* のタンパク発現量も増加した。

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当院の肝細胞癌根治切除症例において検証した。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。しかし、EB1 関連の分子機構の解明には難渋し、EB1 発現変動による増殖能の変化は Rb や Cyclin D1、Erk、JNK のリン酸化に関連する細胞増殖促進経路の関与ではなかった。また、EB1 発現変動における遊走能や浸潤能の変化は上皮間葉転換に関与する E-cadherin の発現変化や細胞の遊走に関わる α -tubulin のアセチル化によるものではなかった。従って、EB1 発現と強く関連する遺伝子候補を検索するためにマイクロアレイ解析を行い、癌の増殖や転移に深く関与されていることが示唆されている *Dlk-1*, *HAMP*, *SLCO1B3* 等の 18 の遺伝子候補を同定した。以上のことから、EB1 は肝細胞癌の増大や浸潤、転移に深く関与し、上記遺伝子候補の分子機構を介した新たな癌の進展メカニズムが示唆された。

これまでに EB1 は肝細胞癌 (Orimo et al, 2008) 以外にも食道癌、神経膠芽腫、大腸癌、胃癌、乳癌 (Wang et al., 2005 ; Sugihara et al., 2012 ; Dong et al., 2010 ; Bergers et al., 2014) などの他の悪性腫瘍において発現が亢進していることが報告されている。特に乳癌においては、EB1 発現が乳癌の組織学的グレード、病理学的 TNM 分類およびリンパ節転移 (Dong et al., 2010) と強く関連していた。また、本研究では EB1 が染色される腫瘍組織における平均的な染色率が 30%前後であったため、Orimo らの先行研究 (Orimo et al, 2008) における EB1 陽性肝細胞癌の基準である 50%以上の染色率ではなく 30%を陽性判定に採用したが、EB1 発現と腫瘍径や門脈浸潤等といった臨床病理学的因子との関連性は一致していることから、肝細胞癌では EB1 発現が腫瘍の増大や浸潤、転移といった癌の進展メカニズムに深く関与していることが裏付けられた。さらに、EB1 は神経膠芽腫や大腸癌、肝細胞癌 (Sugihara et al., 2012; Gerges et al., 2014; Orimo et al., 2008) 患者において独立した予後予測因子であったと報告されており、本研究でも EB1 が肝細胞癌症例の予後および再発予測因子として非常に有用であったことから、EB1 は肝細胞癌の進行にも強く関与しているものと考えられた。

EB1 は、もともと 1995 年に Su らによって酵母ツーハイブリッド法を用いて癌抑制遺伝子として有名な APC に結合するタンパク質として同定された (Su et al.,

1995)。そして、肝細胞癌において β カテニンの変異は発癌のメカニズムとして良く知られている (Huang et al., 1999; Legoux et al., 1999; Zucmann-Rossi et al., 2007)。そのため、我々はEB1がAPCによって調整される古典的 Wnt シグナル伝達経路 (Rubinfeld et al., 1993; Su et al., 1993) を介して癌の進展に関わっているものと推測した。しかし、北海道大学大学院生化学分野の築山忠維先生の協力のもと、 β カテニン/Tcf ルシフェラーゼレポーターシステム (Tukiyama et al., 2007) を用いて、EB1 の存在が Wnt3a 刺激によって活性化される Wnt/ β カテニンシグナルをさらに活性化させるかどうかを検証したが、その確証は得られなかった。これは食道癌の報告とは対照的な結果であった (Wang et al., 2005) が、少なくとも肝細胞癌ではEB1は古典的 Wnt シグナル伝達経路とは違うメカニズムで癌の進展に関わっているものと考えられた。

最近の研究では、EB1がprotein phosphatase 2Aと結合することでそのリン酸化作用を阻害し、protein phosphatase 2Aによって不活性化されるはずのAurora-B kinaseが活性化するというメカニズムが報告されている。しかし、本研究で樹立したEB1-KO HuH7とEB1再発現後EB1-KO HuH7のWestern blot分析では、EB1の再発現によるAurora-B kinaseの活性化亢進は認められなかったため、肝細胞癌においてはAurora-B関連とは違う分子機構による制御が働いているものと考えられた。

また、癌抑制遺伝子であるRb (Burkhardt et al., 2008) や癌の増殖に関わるMAP kinase (Dhillon et al., 2007) も肝細胞癌の進展に関与していると報告されている (Hui et al., 1999; Ito et al., 1998; Schmitz et al., 2008; Nakanishi et al., 2005) が、本研究ではHuH7においてEB1の発現変動はRbやCyclin D1、Erk、JNKのリン酸化状態を変化させることはなかったため、EB1が関わる癌進展メカニズムはいままで報告されていない新しい経路に関わっている可能性が示唆された。

他方で、EB1は癌細胞の増殖だけでなく、遊走や浸潤にも関わっていることが本研究でも明らかとなった。細胞の遊走や浸潤は、特定の生理学的かつ病理学的条件下でのアクチンおよび微小管細胞骨格の協調的な細胞再構築を必要とする複雑なプロセスである (Small et al., 2002; Schoumacher et al., 2010; Rodriguez et al., 2003; Small et al., 2003; Akhmanova et al., 2008)。FilopodiaやLamellipodia、Invadopodiaは、細胞の移動 (Small et al., 2002) や侵入

(Schoumacher et al., 2010) の間に細胞前面に出現する細胞の突出構造物であるが、微小管はこのInvadopodiaを伸縮し細胞を移動させている間に、細胞骨格と協調して細胞の偏極を維持する役割を担っている (Rodriguez et al., 2003; Small et al., 2003; Akhmanova et al., 2008)。そして、これらの微小管機能は、EB1を含む微小管伸長端結合タンパクによって制御または媒介されていると考えられて

いる (Akhmanova et al., 2008)。実際に、EB1 の過剰発現またはノックダウンによって、神経膠芽腫細胞株 (Berges et al., 2014) や大腸癌細胞株 (Sugihara et al., 2012)、悪性黒色腫細胞株 (Schober et al., 2009)、本研究で使用した肝癌細胞株でも、細胞遊走能や浸潤能が増減したことから、癌細胞の遊走や浸潤にも EB1 は深く関与しており、さらにその発現量が癌細胞の活動性を反映している可能性が示唆された。

ヒストン脱アセチル化酵素のひとつである HDAC6 は主に微小管の構成要素である α tubulin を脱アセチル化することが知られており (Seidel et al., 2015; Szyk et al., 2014)、その阻害剤は癌の治療薬としても注目され、EB1 との関連も近年報告されている (Zilberman et al., 2009; Falkenberg et al., 2014)。しかし、本研究では HuH7 において EB1 発現の変化に伴う α tubulin のアセチル化の変動は認められなかったため、肝細胞癌の浸潤あるいは転移メカニズムにおいては HDAC6 関与していないと考えられた。また、上皮間葉転換は癌の浸潤や転移メカニズムとして近年注目され (Gurzu et al., 2016; Pastushenko et al., 2018)、肝細胞癌においても報告がみられる (Simona et al., 2019; Nitta et al., 2008; Giannelli G., 2016) が、本研究では HuH7 における EB1 発現の増加によって E-cadherin の喪失は認められなかったため、EB1 関連の転移形式には上皮間葉転換は関与していないと考えられた。

これまでの研究では、EB1 がどのような分子機構を介して肝細胞癌の増殖、浸潤、転移に関与しているかは不明瞭であり、いままでの報告を頼りに EB1 の分子機構を探索するのには限界があると考えられた。しかし、本研究のマイクロアレイ解析で、EB1 の発現によって *Dlk1*、*HAMP*、*SLC01B3* 等の 18 候補の遺伝子発現が増幅されていることが明らかとなった。特に、*Dlk1* は、父性発現遺伝子からのみ転写されるインプリンティング遺伝子であり (Schmidt et al., 2000; Floridon et al., 2000)、興味深いことに肝臓の発達と肝細胞癌の腫瘍形成において重要な役割を果たしていると報告されている (Schmidt et al., 2000; Floridon et al., 2000; Tanaka et al., 2009; Yanai et al., 2010; Tanimizu et al., 2003; Huang et al., 2007; Yu et al., 2010)。さらに、*Dlk1* 陽性肝細胞癌は *Dlk1* 陰性肝細胞癌より強い増殖能と腫瘍形成能を示すとも報告されている (Xu et al., 2012)。また、*HAMP* 遺伝子は、主に肝臓で産生され重要な鉄調節ホルモンであるヘプシジンをコードする遺伝子である (Ganz et al., 2003)。非小細胞肺癌や乳癌、膀胱癌患者において血清ヘプシジン値は、健常者と比較して有意に高いと報告されている (Chen et al., 2014; Ciniselli et al., 2015; Toshiyama et al., 2018)。特に、非小細胞肺癌または膀胱癌患者ではヘプシジンの発現亢進が転移や TNM 分類と相関し、予後不良であったとされている (Chen et al., 2014; Toshiyama et al., 2018)。それから、*SLC01B3* を

コードする遺伝子は、有機アニオン輸送ポリペプチド(OATP)をコードする *SLCO* 遺伝子スーパーファミリーの一つである。OATP1B1 および OATP1B3 欠乏症は、共役ビリルビンが肝臓に再取り込みされることを阻害されるため Rotor 症候群を引き起こすことが知られている (Van de Steeg et al., 2012)。しかし、高レベルの *OATP1B3* 転写物は、大腸癌および前立腺癌と強く関連しており、OATP1B3 がそれらの癌に対してバイオマーカーとして有望であるという報告がある (Morio et al., 2018; Alsinawawi et al., 2019)。以上より、本研究のマイクロアレイ解析結果で得られた上位 3 遺伝子 *Dlk1*、*HAMP*、*SLCO1B3* 遺伝子ではすでに癌との関連が報告されている。従って、本研究のマイクロアレイ解析結果は *Dlk1*、*HAMP*、*SLCO1B3* 等の 18 候補遺伝子が EB1 と連動して癌の増殖、浸潤、転移を亢進させている可能性を示すものであると考える。

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、EB1 発現はヒト肝癌細胞株の増殖、遊走、浸潤に深くかかわっており、その EB1 関連肝細胞癌進展メカニズムには *Dlk1*、*HAMP*、*SLCO1B3* 等の 18 の候補遺伝子が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戦略の指標となりうる可能性を示唆している。

結論

①本研究から得られた新知見

- ・EB1 は肝細胞癌の分化度、TNM 分類、腫瘍径、門脈浸潤の有無、肝内転移の有無と相関していた
- ・EB1 は肝細胞癌根治切除症例において予後および再発予測因子として有用であった
- ・ヒト肝癌細胞株において、EB1 発現の増減は増殖能、遊走能、浸潤能の増減に強く関与した
- ・ヒト肝癌細胞株において、EB1 発現によって腫瘍形成能が増加した
- ・ヒト肝癌細胞株において、EB1 発現は Aurora B, Rb, Cyclin D1, Erk, JNK のリン酸化状態、 α -tubulin のアセチル化状態、E-cadherin の喪失には影響を与えない
- ・ヒト肝癌細胞株において、EB1 の発現は *Dlk1* や *HAMP*、*SLC01B3* 等の 18 候補遺伝子の増幅に関与する可能性が示唆された

②新知見の意義

本知見は、*Dlk1* や *HAMP*、*SLC01B3* 等の 18 候補遺伝子が関与する分子機構が未知の EB1 関連伝達経路に関与している可能性が示唆され、それらの解明は肝細胞癌の新しいバイオマーカーや治療薬の開発につながると考えられる。

③本研究の課題と今後の展開

本研究では、臨床検体における EB1 の染色率の違いから Orimo らの EB1 陽性肝細胞癌基準と異なる判定基準を採用した。これは、患者背景の違いによる影響もあると思われるが、免疫組織化学染色の染色条件や評価基準の違いによる影響もかなりあると考える。従って、免疫組織化学染色の精度と再現性を向上させるためには、さらなる検討が必要である。

本研究で明らかとなった *Dlk1* や *HAMP*、*SLC01B3* 等の 18 の候補遺伝子は EB1 によってどのように制御されているのかは解明されていない。また、逆にこれらの候補遺伝子を変動させることで EB1 の発現がどのように変動するかも分かっていない。今後も CRISPR/Cas9 技術等の遺伝子技術を駆使して、さらなる分子機能の解明が必要である。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究のご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院外科系部門外科学分野消化器外科学教室 I の武冨紹信教授ならびに横尾英樹元助教に深謝いたします。また、病理診断学や免疫組織化学染色の手法などについてご助言ご指導を賜りました北海道大学病院ゲノム・コンパニオン診断研究部門の畑中豊特任准教授ならびに北海道大学病院臨床研究開発センター研究開発推進部門の畑中佳奈子部門長、CRISPR/Cas9 技術についてご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院病理系部門微生物学免疫学分野の福原崇介教授、Wnt シグナル伝達の関与についてご指導ご協力を賜りました北海道大学大学院医学研究院生理系部門生化学分野の築山忠維助教へ感謝申し上げます。併せて、本研究の遂行にあたり様々な助言やアドバイス、励ましを頂きました北海道大学大学院医学研究院外科系部門外科学分野消化器外科学教室 I の皆様に心よりお礼を申し上げます。

本研究の一部は JSPS 科研費 JP25430134 の助成を受けたものである。

利益相反

本研究に関して著者全員に開示すべき利益相反はありません。

引用文献

- Akhmanova A, Steinmetz MO. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol.* *9*, 309–322.
- Alsinnawi M, Zhang A, Bianchi-Frias D, Burns J, Cho E, Zhang X, Sowalsky A, Ye H, Slee AE, True L, et al. (2019). Association of prostate cancer SLC0 gene expression with Gleason grade and alterations following androgen deprivation therapy. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* *22*, 560–568.
- Berges R, Baeza-Kallem N, Tabouret E, Chinot O, Petit M, Kruczynski A, Figarella-Branger D, Honore S, Braguer D. (2014). End-binding 1 protein overexpression correlates with glioblastoma progression and sensitizes to Vinca-alkaloids in vitro and in vivo. *Oncotarget.* *5*, 12769–12787.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* *68*, 394–424.
- Burkhardt DL, Sage J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev cancer.* *8*, 671–682.
- Chen Q, Wang L, Ma Y, Wu X, Jin L, Yu F. (2014). Increased hepcidin expression in non-small cell lung cancer tissue and serum is associated with clinical stage. *Thorac Cancer.* *5*, 14–24.
- Ciniselli CM, De Bortoli M, Taverna E, Varinelli L, Pizzamiglio S, Veneroni S, Bonini C, Orlandi R, Verderio P, Bongarzone I. (2015). Plasma hepcidin in early-stage breast cancer patients: no relationship with interleukin-6, erythropoietin and erythroferrone. *Expert Rev Proteomics.* *12*, 695–701.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LC, et al. (2013). Multiple genome engineering using CRISPR/CAS systems. *Science.* *339*, 819–823.
- Dong X, Liu F, Sun L, Liu M, Li D, Su D, Zhu Z, Dong JT, Fu L, Zhou J. (2010). Oncogenic function of microtubule end-binding protein 1 in breast cancer. *J Pathol.* *3*, 361–369.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. *26*, 3279–3290.

Falkenberg KJ, Johnstone RW. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological disease and immune disorders. *Nat. Rev. Drug Discov*. *13*, 673–691.

Floridon C, Jensen CH, Thorsen P, Nielsen O, Sunde L, Westergaard JG, , Thomsen SG, Teisner B. (2000). Does fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation. *Differentiation*. *66*, 49–59.

Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Yamada T, Iwatsuki K, Hirohashi S. (2005). Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye. *Proteomics*. *5*, 1411–1422.

Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, et al. (2014). Amphipathic α -helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog*. *10*, e1004534.

Ganz T. (2003). Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. *102*, 783–788.

Giannelli G, Koudelkova P, Dituri F, Mikulits W. (2016). Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. *65*, 798–808.

Gurzu S, Silveanu C, Fetyko A, Vutiurca V, Kovacs Z, Jung I, (2016). Systematic review of the old and new concepts in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. *22*, 6764–6775.

Huang H, Fujii H, Sankila A, Mahler-Araujo BM, Matsuda M, Cathomas G, Ohgaki H. (1999). Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol*. *155*, 1795–1801.

Huang J, Zhang X, Zhang M, Zhu JD, Zhang YL, Lin Y, Wang KS, Qi XF, Zhang Q, Liu GZ, et al. (2007). Up-regulation of DLK1 as an imprinted gene could contribute to human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. *28*, 1094-1103.

Hui AM, Li X, Makuuchi M, Takayama T, Kubota K. (1999). Over-expression and lack of retinoblastoma protein are associated with tumor progression and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. *84*, 604-608.

Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, Ueki T, Hirano T, Yamamoto H, Fujimoto J, et al. (1998). Activation of mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. *27*, 951-958.

Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. (2017). TNM classification of malignant tumours (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd)

Kudo M, Izumi N, Ichida T, Ku Y, Kokudo N, Sakamoto M, Takayama T, Nakashima O, Matsui O, Matsuyama Y. (2016). Report of the 19th follow-up survey of primary liver cancer in Japan. *Hepatol Res*. *46*, 372-390.

Legoix P, Bluteau O, Bayer J, Perret C, Balabaud C, Belghiti J, Franco D, Thomas G, Laurent-Puig P, Zucmann-Rossi, J. (1999). Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity. *Oncogene*. *18*, 4044-4046.

Mizukami T, Kamachi H, Fujii Y, Matsuzawa F, Einama T, Kawamata F, Kobayashi N, Hatanaka Y, Taketomi A. (2018). The anti-mesothelin monoclonal antibody amatuximab enhances the anti-tumor effect of gemcitabine against mesothelin-high expressing pancreatic cancer cells in a peritoneal metastasis mouse model. *Oncotarget*. *9*, 33844-33852.

Morio H, Sun Y, Hanada M, Ide H, Shimozaoto O, Zhou X, Higashi K, Yuki R, Yamaguchi N, Hofbauer JP, et al. (2018). Cancer-type OATP1B3 mRNA in extracellular vesicles as a promising candidate for a serum-based colorectal cancer biomarker. *Biol Pharm Bull*. *41*, 445-449.

Morrison EE. (2007). Action and interactions at microtubule ends. *Cell Mol Life Sci*. *64*, 307-317.

Nakanishi K, Sakamoto M, Yamasaki S, Todo S, Hirohashi S. (2005). Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. *103*, 307–312.

Nishigaki R, Osaki M, Hiratsuka M, Toda T, Murakami K, Jeang KT, Ito H, Inoue T, Oshimura M. (2005). Proteomic identification of differentially-expressed genes in human gastric carcinomas. *Proteomics*. *5*, 3205–3213.

Nitta T, Kim JS, Mohuczy D, Behrns KE. (2008). Murine cirrhosis induces hepatocyte epithelial mesenchymal transition and alterations in survival signaling pathways. *Hepatology*. *48*, 909–919.

Orimo T, Ojima H, Hiraoka N, Saito S, Kosuge T, Kakisaka T, Yokoo H, Nakanishi K, Kamiyama T, Todo S. (2008). Proteomic profiling reveals the prognostic value of adenomatous polyposis coli-end-binding protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. *48*, 1851–1863.

Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, Fioramonti M, Revenco T, Boumahdi S, Van Keymeulen A, Brown D, Moers V, Lemaire S, et al. (2018). Identification of the tumor transition states occurring during EMT. *Nature*. *556*, 463–468.

Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandoto CA, Forscher P, Bement WM, Watermann-Storer CM. (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol*. *5*, 599–609.

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Mueller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science*. *262*, 1731–1734.

Schliwa M. (2002). The evolving complexity of cytoplasmic structure. *Nat Rev Mol Cell Biol*. *3*, 291–296.

Schmidt JV, Matteson PG, Jones BK, Guan XJ, Tilghman SM. (2000). The Dlk1 and Gtl2 genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes Dev*. *14*, 1997–2002.

Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Lang H, Sotiropoulos GC, Malago M, Steveling K, Reis H, Cicinnati VR, Schmid KW, Baba HA. (2008). Activation of the ERK and AKT signaling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *J Hepatology*. *48*, 83–90.

Schober JM, Cain JM, Komarova YA, Borisy GG. (2009). Migration and actin protrusion in melanoma cells are regulated by EBI protein. *Cancer Lett.* *284*, 30–36.

Schoumacher M, Goldman RD, Louvard D, Vignjevic DM. (2010). Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol.* *189*, 541–556.

Seidel C, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. (2015). Histone deacetylase 6 in health and disease. *Epigenomics.* *7*, 103–118.

Shimada S, Kamiyama T, Yokoo H, Orimo T, Wakayama K, Einama T, Kakisaka T, Kamachi H, Taketomi A. (2017). Clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma with microscopic portal venous invasion and the role of anatomical liver resection in these cases. *World J Surg.* *41*, 2087–2094.

Simona G, Laszio K, Decebal F, Ioan J. (2019). Epithelial mesenchymal and endothelial mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma: a review. *Biomed Res Int.* 2019, 2962580

Small JV, Kaverina I. (2003). Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol.* *15*, 40–47.

Small JV, Stradal T, Vignal E, Rottner K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* *12*, 112–120.

Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW. (1995). APC binds to the novel protein EBI. *Cancer Res.* *55*, 2972–2977.

Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science.* *262*, 1734–1737.

Sugihara Y, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Kubota D, Ichikawa H, Sakamoto K, Nakamura Y, Tomonaga T, Fujita S, et al. (2012). Proteomic-based identification of the APC-binding protein EBI as a candidate of novel tissue biomarker and therapeutic target for colorectal cancer. *J Proteomics.* *75*, 5342–5355.

- Sun L, Gao J, Dong X, Liu M, Li D, Shi X, Dong SJ, Lu X, Liu C, Zhou J. (2008). EB1 promotes Aurora-B kinase activity through blocking its inactivation by protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *105*, 7153–7158.
- Szyk A, Deaconescu AM, Spector J, Goodman B, Valenstein ML, Ziolkowska NE, Kormendi V, Grigorieff N, Roll-Mecak A. (2014). Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase. *Cell.* *157*, 1405–1415.
- Tanaka M, Okabe M, Suzuki K, Kamiya Y, Tsukahara Y, Saito S, Miyajima A. (2009). Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of EpCAM and DLK1: drastic change of EpCAM expression during liver development. *Mech Dev.* *126*, 665–676.
- Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H, Tsujimura T, Miyajima A. (2003). Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci.* *116*, 1775–1786.
- Tirnauer JS, Bierer BE. (2000). EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J Cell Biol.* *149*, 761–796.
- Toshiyama R, Konno M, Eguchi H, Asai A, Noda T, Koseki J, Asukai K, Ohashi T, Matsushita K, Iwagami Y, et al. (2018). Association of iron metabolic enzyme hepcidin expression levels with the prognosis of patients with pancreatic cancer. *Oncol Lett.* *15*, 8125–8133.
- Tsukiyama T, Fukui A, Terai S, Fujioka Y, Shinada K, Takahashi H, Yamaguchi H, Yamaguchi TP, Ohba Y, Hatakeyama S. (2015). Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. *Mol Cell Biol.* *35*, 2007–2023.
- Van de Steeg E, Stránecký V, Hartmannová H, Nosková L, Hřebíček M, Wagenaar E, Van Esch A, De Waart DR, Oude elferink RP, Kenworthy KE, et al. (2012). Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *J Clin Invest.* *122*, 519–528.
- Vaughan KT. (2005). TIP maker and TIP marker; EB1 as a master controller of microtubule plus ends. *J Cell Biol.* *171*, 197–200.

Wang Y, Zhou X, Zhu H, Liu S, Zhou C, Zhang G, Xue L, Lu N, Quan L, Bai J, et al. (2005). Overexpression of EB1 in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) may promote cellular growth by activating β -catenin/TCF pathway. *Oncogene*. *24*, 6637–6645.

Xu X, Liu RF, Zhang X, Huang LY, Chen F, Fei QL, Han ZG. (2012). DLK1 as a potential target against cancer stem/progenitor cells of hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther*. *11*, 629–638.

Yanai H, Nakamura K, Hijioka S, Kamei A, Ikari T, Ishikawa Y, Shinozaki E, Mizunuma N, Hatake K, Miyajima A. (2010). Dlk-1, a cell surface antigen on foetal hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency. *J Biochem*. *148*, 85–92.

Yu F, Hao X, Zhao H, Ge C, Yao M, Yang S, Li J. (2010). Delta-like 1 contributes to cell growth by increasing the interferon-inducible protein 16 expression in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. *30*, 703–714.

Zilberman Y, Ballestrem C, Carramusa L, Carramusa L, Mazitschek R, Khochbin S, Bershadsky A. (2009). Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J Cell Sci*. *122*, 3531–3541.

Zucmann-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, Boyault S, Grimber G, Balabaud C, Cunha AS, Bioulac-Sage P, Perret C. (2007). Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. *26*, 774–780.

日本肝癌研究会. (2015). 臨床・病理 原発性肝癌取扱い規約 第6版. (東京: 金原出版)