

(第3号様式)

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 大野 芳敬

論 文 名 肝細胞癌における ANP32B のアポトーシス制御作用と肝癌の予後に対する臨床的役割について

---

### 学位論文要旨

#### 【背景と目的】

ANP32 (Acidic nuclear phosphoprotein 32 family member)は核内リン酸化蛋白であり、そのサブクラスである ANP32B がマウスの正常な発達において重要な役割を担っていると報告された。しかしながら、癌における ANP32B の作用機序、腫瘍進展に対する生理的役割については不明である。申請者らは肝細胞癌において、特に ANP32B に着目し、その肝細胞癌における役割についてヒト肝細胞癌組織及び、ヒト肝癌細胞株を用いて検討した。

#### 【材料と方法】

- 手術時に得られた 31 症例の肝細胞癌組織の癌部、非癌部における ANP32B の発現を、リアルタイム RT-PCR, ウェスタンブロット法、免疫組織染色を用いて検討した。
- 肝組織の癌部、非癌部より、mRNA を抽出した。各々の症例で癌部、非癌部の ANP32B mRNA の発現比をとり、癌部/非癌部 ANP32B mRNA 比の低下群 (Tumor low ANP32B; N=16)と増加群 (Tumor high ANP32B; N=15)に分けて、予後と治療後の再発、臨床背景因子との関連について検討した。
- 肝細胞癌で発現する ANP32B の役割について検討するため、ヒト肝癌由来細胞株である Huh 7, HLE を用いて、ANP32B siRNA により ANP32B 発現をノックダウンし、癌関連遺伝子の変化について網羅的に解析した。作用していたアポトーシスについて検討するため、スタウロスポリンを用いてアポトーシスを誘導した細胞株に、ANP32B をノックダウンすることで、アポトーシスが増強、減弱するか Annexin V で染色しフローサイトメトリーで解析した。さらにウェスタンブロット法にて活性型カスパーゼの発現変化を検討した。ANP32B ノックダウンにて修飾される細胞内関連遺伝子を PCR アレイや抗体アレイで検討し、ウェスタンブロット法で同定した。アポトーシス誘導剤である ABT-737 を添加し、細胞内関連遺伝子の変化を検討した。

氏名 大野 芳敬

4. ANP32B-GFP, GFP を発現したプラスミドをトランスフェクションし ANP32B を高発現させ、GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーでソーティングして回収し、各々の細胞におけるアポトーシスの変化、修飾される細胞内遺伝子の変化をウェスタンブロット法で検討した。さらにレンチウイルスベクターを用いて ANP32B を持続的に高発現させ、ABT-737 を添加し、アポトーシスの変化を調べた。
5. ヒト肝細胞癌組織における ANP32B の発現を免疫組織染色で確認し、アポトーシスとの関係について TUNEL 法による染色所見と比較検討した。

**【結果と考察】**

1. 肝組織の癌部、非癌部ともに ANP32B は発現し、症例により発現量の差異がみられた。
2. 肝組織において Tumor low ANP32B 群は UICC stage が進行しており、予後不良であった。
3. 肝癌細胞株における ANP32B ノックダウン後に PCR アレイで解析したところ、複数のアポトーシス関連遺伝子に変化がみられた。スタウロスポリンによるアポトーシス誘導下で、ANP32B のノックダウンにより、Annexin V 陽性細胞が減少し、アポトーシス抑制効果がみられた。活性型カスパーゼ 8 の発現は変化なかったが、活性型カスパーゼ 9、活性型カスパーゼ 3 が低下し、ミトコンドリア経路に作用してアポトーシスを抑制することが示唆された。
4. 修飾される細胞内関連遺伝子を検討したところ、ミトコンドリア経路を制御する Bcl-2 ファミリーに属する Bad のリン酸化、Bak の発現に変化が見られた。スタウロスポリンによるアポトーシスを誘導下で ANP32B をノックダウンすると、Bad のリン酸化が増加し、Bak の発現が低下した。ANP32B ノックダウン細胞株では、ABT-737 濃度依存的にアポトーシスの抑制がみられた。
5. プラスミドを用いて ANP32B を高発現したところ、ノックダウンと反対に Bad のリン酸化が低下し、Bak の発現が増加した。しかし、Bax の発現低下が同時に見られ、アポトーシスは誘導されなかった。レンチウイルスベクターによる ANP32B 発現誘導株においてもスタウロスポリン、ABT-737 の添加によるアポトーシス誘導亢進作用はみられなかった。
6. ヒト肝細胞癌組織において、ANP32B 高発現例に比較して ANP32B 低発現例では TUNEL 陽性細胞が減少していた。

**【結論】** ANP32B は Bad リン酸化、Bak, Bax の発現に関連して、アポトーシスを抑制しており、ヒト肝細胞癌組織における非癌組織に対する ANP32B mRNA の相対的低下は、肝癌の進行および予後不良に関連していた。ANP32B は肝細胞癌に対する治療、予後予測マーカーとして臨床上有用な指標になりうる可能性が示唆された。

キーワード (3~5)	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B protein; apoptosis; clinical marker; drug targeting; hepatocellular carcinoma
-------------	--