

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	大野 芳敬
審査委員	主査 北澤 荘平 副査 高田 泰次 副査 松原 圭一 副査 鵜久森 徹 副査 高野 昌平

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

### 審査結果の要旨

#### 【背景と目的】

ANP32 (Acidic nuclear phosphoprotein 32 family member)は核内リン酸化蛋白であり、細胞の分化、遺伝子の発現調節、蛋白質のリン酸化、細胞遊走、細胞死経路と多様な生物現象に関与していることが報告されている。ANP32 のサブクラスの一つである ANP32B を欠損したマウスでは、体重減少や臓器の形成不全などの異常を示すことが知られている。一方、腫瘍の発生、進展における ANP32B の役割についての報告は殆ど無い。申請者らは肝細胞癌における ANP32B の役割について、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】、

1. 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。
2. 各々の症例において、肝組織の癌部、非癌部より mRNA を抽出し、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。
3. ヒト肝癌由来細胞株である Huh7 および 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。更に、アポトーシスへの関与を検討するために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で ANP32B をノックダウンし、Annexin V 染色後、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。

4. ANP32B-GFP を発現させるプラスミドを細胞株に導入し、GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーで回収し、アポトーシス、導入による細胞内遺伝子の変化を検討した。逆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、アポトーシスへの影響を評価した。
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連続切片で比較検討した。

#### 【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 のノックダウンによりアポトーシス抑制効果がみられ、その効果は、ミトコンドリア経路を介することが示唆された。
4. アポトーシスを誘導下で ANP32B をノックダウンすると、Bad のリン酸化の増加、Bak 発現の低下が認められ、その結果、アポトーシスの抑制がみられた。
5. ANP32B を高発現させたところ、ノックダウンとは反対に、Bad のリン酸化の低下、Bak 発現の増加が認められた。しかし、Bax の発現低下も同時に認められ、結果としてアポトーシスの誘導は認められなかった。レンチウイルスベクターによる ANP32B 高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充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 の発現を制御して、アポトーシスを調節しており、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。

本研究に関する公開審査会は平成 28 年 12 月 26 日に行われた。本研究は、ANP32B 発現が、肝細胞のアポトーシスに関連しており、臨床的な予後と相関することを示し、今後の予後予測マーカーの開発や創薬にもつながる重要な研究である。審査会では、本研究にかかわる研究手法に関する問題から、臨床的な有用性など広範囲に質疑がなされ、申請者はいずれにも的確に回答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。