

氏名(本籍)	はい ち か 花(中国)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第5530号			
学位授与年月日	平成22年5月31日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	肝腫瘍における dickkopf3 (Dkk3) の発現と機能解析			
主査	筑波大学教授	医学博士	大河内 信 弘	
副査	筑波大学教授	医学博士	加 藤 光 保	
副査	筑波大学准教授	医学博士	安部井 誠 人	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	堀 米 仁 志	

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

dickkopf 3 (Dkk3) はブタにおいて成体肝幹様細胞に発現する遺伝子として発見された。胎生期では、極初期の肝組織にのみ発現することから未分化な肝細胞を検出する分子とされている。肝細胞癌、肝芽腫は肝臓の代表的な悪性腫瘍であり、現在マーカーとして AFP、PIVKA-II などが用いられているが、全ての腫瘍をスクリーニング、フォローアップできないという問題がある。本研究の目的は Dkk3 が肝悪性腫瘍に特異的に存在するかどうか、Dkk3 が腫瘍マーカーとして有用かどうかを明らかにすることである。

(方法)

1981年から2007年までの間に筑波大学附属病院において手術で切除された肝細胞癌(HCC)および肝芽腫(HBL)に加えて、生検組織が行われた肝芽腫14症例、肝細胞癌72症例について解析を行った。また肝癌細胞株としてヒト肝癌由来 KYN-3細胞、ヒト肝芽腫由来 HuH6細胞、および成人非癌肝臓由来不死化 tPH5CH細胞を用いた。腫瘍中の mRNA および蛋白質は、*in situ* Hybridization (ISH) と免疫組織染色により解析した。Dkk3 細胞内局在は免疫組織染色により評価した。腫瘍細胞における Dkk3 発現抑制は、tPH5CH、HuH6細胞に対して siRNA を添加した。mRNA および蛋白質発現はリアルタイム PCR および ELISA により測定した。細胞数の変化は WST-1 Assay により解析した。JNK のリン酸化はウェスタンブロット法を用いて解析した。

(結果)

Dkk3 遺伝子の mRNA 発現は HBL14 症例中 11 例 (79%)、HCC72 症例中 10 例 (14%) であり、HBL が HCC より、有意に発現頻度が高かった。Dkk3 蛋白の発現は HBL14 症例中 11 例 (79%)、HCC72 症例中 14 例 (19%) であり、mRNA と同様 HBL が HCC より有意に発現頻度が高かった。またどちらの腫瘍においても一部の腫瘍細胞に限局して発現する傾向が見られた。HBL では解析した全ての症例で、AFP または Dkk3 のいずれかを発現していた。Dkk3 の発現と Ki67 や mitotic index との間には関連を認めなかった。また、Dkk3 陽性腫瘍細胞は AFP 陽性腫瘍細胞とは異なっており、CK19細胞を共発現する傾向がある事が示された。また Dkk3 を高発現する HuH6 および tPH5CH において、siDkk3 を導入し Dkk3 の発現を抑制すると、接着

細胞数の減少と同時 JNK のリン酸化の亢進が認められた。

(考察)

本研究では Dkk3 は非癌肝組織では陰性であり、現在汎用されている肝腫瘍マーカーである AFP を発現しない腫瘍細胞においても発現が認められ、特に肝芽腫においては Dkk3 もしくは AFP のいずれかを発現することが明らかになった。この結果から、Dkk3 と AFP との測定を併用すれば、より広範にこれらの腫瘍を検出できる可能性が示唆された。また Dkk3 が細胞外に分泌されることから、肝腫瘍を検出する血清マーカーとしての応用も期待された。Dkk3 の発現は一部の腫瘍細胞に限局されていたこと、Dkk3 と AFP 陽性細胞は相互排他的であるが Dkk3 と CK19 は共発現する傾向にあったことから、Dkk3 は AFP 発現腫瘍細胞とは異なる腫瘍細胞を検出できる可能性が示唆された。今後 Dkk3 の発現が腫瘍の予後や治療反応性にどのように関わるかを明らかにすることが、Dkk3 測定の臨床的価値を判断する上で重要と考えられた。siRNA による Dkk3 の発現抑制実験から Dkk3 の発現を抑制すると腫瘍細胞の増殖抑制、アポトーシスを誘導し、その機序には JNK シグナル経路が関与することが示唆された。これらの結果は Dkk3 の癌抑制遺伝子以外の新しい機能を持つことを示唆しており、Dkk3 を高発現する腫瘍細胞の特質を解明するために重要な知見と考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は肝芽腫・肝細胞癌の新たなマーカーを探索する目的で、癌抑制遺伝子 Dkk3 の腫瘍における発現を検証した。その結果、Dkk3 は非癌組織では陰性であること、現在汎用されている肝腫瘍マーカーを発現しない腫瘍細胞にも発現することが明らかになり、肝芽腫・肝細胞癌に対してより広範な腫瘍を検出できるマーカーとして有用である事が示唆された。また Dkk3 を siRNA によって発現抑制したところ、細胞増殖抑制と同時に JNK のリン酸化が促進され、Dkk3 は JNK シグナル経路が関与するアポトーシスを抑制し、生存に必要な機能を担っている可能性が示唆された。これらの結果は Dkk3 の新規の機能を示唆し、Dkk3 を高発現する肝癌の特質解明に大きく貢献したと判断される。

これらの内容は雑誌 Virchow Archives (2009 年) に掲載されており、肝癌の発生機序の解明と診断に寄与する貴重な研究といえる。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。