

氏 名	霜 田 雅 之 ^{しも だ まさ ゆき}
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3192 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	A Homeobox Protein, Prox1, Is Involved in the Differentiation, Proliferation, and Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. (ホメオボックス蛋白 Prox1 は肝細胞癌の分化、増殖および予後に関係する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 田 潤 教 授 一 山 智 教 授 中 畑 龍 俊

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕 胎生期のリンパ管の分化を制御する主要な遺伝子である *prox1* はホメオボックス遺伝子のひとつである。*prox1* は胎生期の未熟な肝細胞および成体の成熟肝細胞の両方に発現が認められ、これまでに胎生期の肝細胞の移動にも必須の役割を担っていることが示され、また肝細胞の正常な分化や増殖に関っていることが示唆されるが、肝悪性腫瘍との関係は不明である。一方、*prox1* は血液悪性腫瘍においてはその分化や増殖に関与していることが示されているが、固形癌についての報告はない。本研究では、肝細胞癌と *prox1* との関連を明らかにする目的で、ヒト臨床検体および肝細胞癌由来細胞株を用いて解析を行った。

〔方法〕 ヒト臨床検体での肝細胞および肝細胞癌における *prox1* の発現の有無を免疫染色法と RT-PCR 法により確認した後、発現量の定量をリアルタイム PCR 法で行い、その発現量と肝細胞癌の分化度およびその予後との関連を 52 例の臨床データを用いて解析した。次に *prox1* の制御機構の解明のために臨床検体を用いてその DNA 変異および Loss of Heterozygosity (LOH) の解析を行い、さらに細胞株を用いて methylation の影響を調べた。また細胞株を用いて Prox1 による細胞増殖の抑制について検証するために、RNA 干渉法により細胞株の Prox1 発現を抑制し、その細胞の増殖を MTT Assay で解析した。さらに TET-off システムを用いて Prox1 を過剰発現する細胞株を作成してその増殖を同様に検証した。

〔結果〕 ヒト成体肝細胞および肝細胞癌に *prox1* の発現を認めた。さらに臨床検体において肝細胞癌の *prox1* の発現量と癌の分化度は有意な相関を示し、高分化型癌での発現が高く、未分化になるほど発現が低下した。また、*prox1* の発現の高低で 2 群に分けるとその予後に有意な差が認められ、高発現群は低発現群より明らかに予後が良好であった。*prox1* の制御機構の解析については、臨床検体 30 例中で DNA 変異と LOH は認めず、細胞株での methylation の影響も認められなかった。In vitro において RNA 干渉法により細胞株での Prox1 の発現を抑制すると、3 日～5 日後の細胞の増殖は有意に促進された。また、TET-off システムを用いて Prox1 を過剰発現させると細胞増殖は有意に抑制された。

〔結論〕 Prox1 は肝細胞癌の分化、増殖とその予後に関係があり、肝細胞癌においては癌の悪性度を抑制するよう機能している可能性が示唆された。*prox1* は肝細胞癌の予後診断や治療に応用できる可能性も考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

胎生期のリンパ管の分化を制御する主要な遺伝子である *prox1* はホメオボックス遺伝子のひとつである。*prox1* は胎生期および成体の肝細胞の両方に発現が認められる。一方、これまで *prox1* と悪性腫瘍との関係についての報告はほとんどなかった。本学位申請者は肝細胞癌と *prox1* との関連を明らかにする目的で、ヒト臨床検体および肝細胞癌由来細胞株を用いて解析を行った。ヒト肝細胞癌における *prox1* の発現の定量をリアルタイム PCR 法で行い、発現量と肝細胞癌の分化度およびその予後との関連を 52 例の臨床データを用いて解析した。臨床検体において肝細胞癌の *prox1* の発現量と癌の分化度は有意な正の相関を示した。また *prox1* の高発現群は低発現群より有意に予後が良好であった。さらに癌での *prox1* の制御機

構の解析を行ったが臨床検体で DNA 変異とヘテロ接合性消失は認めず、細胞株での **methylation** の影響も認めなかった。細胞増殖との関連については、細胞株において RNA 干渉法により *prox1* の発現を抑制すると細胞の増殖は有意に促進され、逆に *prox1* を過剰発現させると増殖は有意に抑制された。以上の研究は *prox1* が肝細胞癌の分化、増殖とその予後に関係があることを初めて示唆したもので、肝細胞癌の予後診断や癌制御機構解明の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 1 月 15 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。