

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	加藤 豊
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Achaete-scute family bHLH transcription factor 2 activation promotes hepatoblastoma progression (Achaete-scute family bHLH transcription factor 2 の活性化は肝芽腫の進行を促進する)			
論文審査担当者			
主 査 教授	大段 秀樹	印	
審査委員 教授	有廣 光司		
審査委員 准教授	柘植 雅貴		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p><b>背景</b> 肝芽腫は小児において最も一般的な肝臓の癌であるが、その病態は未だに不明な点も多い。Achaete-scute family bHLH transcription factor 2 (ASCL2) は肝芽腫で高発現している。また肝芽腫において特異的な低メチル化が維持されており、ASCL2 はその低メチル化部位に結合することが判明していることから、ASCL2 は肝芽腫の病態形成において何らかの役割を果たしている可能性がある。ASCL2 はすでにいくつかの癌で重要な役割を果たしていることが報告されているが、肝芽腫においてはその役割は不明である。本研究では、肝芽腫における ASCL2 の役割を明らかにすることを目的として、肝芽腫の細胞株に ASCL2 の発現を誘導して、その生物学的機能の変化を検討した。</p> <p><b>方法</b> 肝芽腫の細胞株 HepG2 と Tet-On system を用いて、doxycycline をトリガーとして ASCL2 の発現を誘導できる HepG2 Tet-On ASCL2 という細胞を作製した。この HepG2 Tet-On ASCL2 を用い、細胞機能解析実験と遺伝子発現解析実験を行った。細胞機能解析実験としては、増殖性を評価するため 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)-アッセイとコロニー形成アッセイ、移動性を評価するため遊走アッセイと浸潤アッセイ、幹細胞性を評価するため球体形成アッセイを行った。遺伝子発現解析としては定量的逆転写 PCR 法を用いて、増殖性マーカー (<i>CCND1</i>, <i>MYC</i>)、上皮-間葉転換マーカー (<i>SNAI1</i>, <i>TWIST1</i>, <i>ZEB1</i>)、間葉-上皮転換マーカー (<i>CDH1</i>)、幹細胞性マーカー (<i>KLF4</i>, <i>POU5F1</i>, <i>SOX9</i>) を解析した。</p> <p><b>結果</b> ASCL2 を誘導していない HepG2 と比較して、ASCL2 を誘導した HepG2 はバイアピリティー、コロニー数、遊走域 (%), 球体数, 浸潤域 (%) が細胞機能解析実験を開始してからそれぞれ 7, 14, 2, 7 日, 90 時間後に有意に増加した。ASCL2 の誘導は doxycycline を添加してから、<i>CCND1</i>, <i>MYC</i>, <i>POU5F1</i>, <i>SOX9</i>, <i>KLF4</i> 発現をそれぞれ 2, 2, 3, 3, 5 日後、<i>SNAI1</i>, <i>TWIST1</i>, <i>ZEB1</i> と <i>CDH1</i> の発現比を 5 日後に有意に上方制御した。</p> <p><b>考察</b> ASCL2 は HepG2 において、Wnt シグナリング経路、上皮-間葉転換、幹細胞性に関連する遺伝子発現を上方制御することで悪性形質の形成を促進していることが示唆された。従って、ASCL2 の活性化は肝芽腫の進行に関係している可能性がある。ASCL2 の研究は肝芽腫の進行に関する病態解明や新たな治療標的の発見につながる可能性がある。</p> <p>本論文は、肝芽腫における ASCL2 高発現の状態を、肝芽腫の細胞株と誘導発現系を使用して in vitro で再現した研究である。細胞機能と遺伝子発現に関する実験結果から、ASCL2 は HepG2 において遺伝子発現制御を介して増殖性、移動性、幹細胞性を促進させ、さらなる悪性化を引き起こしていることが示唆された。一連の結果から、ASCL2 の機能をさらに究明することは、肝芽腫の進行に関する病態解明や新たな治療標的の発見につながる可能性があると考えられた。</p> <p>よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な</p>			

価値あるものと認めた。