



Title	Expression of carbonic anhydrase IX is associated with poor prognosis through regulation of the epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma
Author(s)	日向, 聖
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69267
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 日向 聖	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 森 正樹
	副 査 大阪大学教授 竹原 徹也
	副 査 大阪大学教授 奥山 宏臣

論文審査の結果の要旨

Carbonic Anhydrase IX (CA9)は低酸素下で誘導され、pH調整や細胞間結合に関与する蛋白であり、他癌では予後との相関が報告されている。しかし肝細胞癌でのCA9の発現とその臨床的意義はいまだ明らかではない。本研究では117例の肝細胞癌切除標本を用いた免疫組織染色法での検討をおこない、CA9の発現亢進が独立した予後因子であることが示された。また肝癌細胞株 (HuH7, HepG2)を用いた実験では、低酸素下では、CA9の発現亢進及びEMTマーカーであるE-cadherinの発現低下とN-cadherinの発現亢進が示された。さらにsiRNAによりCA9の発現抑制をおこなうと、低酸素下でのE-cadherin発現低下が解消され、EMTが抑制されることが示された。

これらの結果から、肝細胞癌ではCA9の発現亢進は予後不良因子であり、その分子機構としてCA9を介したEMTの制御が関与している可能性が示され、CA9が肝細胞癌の予後予測に関するバイオマーカーとなりうる可能性を示している。以上より、本研究は博士(医学)の学位授与に値するものと認める。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	日向 聖
論文題名 Title	Expression of carbonic anhydrase IX is associated with poor prognosis through regulation of the epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma (肝細胞癌におけるCA9の発現は、上皮間葉転換を制御することで根治切除後の予後に関与する)
論文内容の要旨(Abstract of Thesis) 〔目的(Purpose)〕 肝細胞癌（HCC）は、根治切除を施行しても高率に肝内再発をきたす予後不良な癌腫の一つであり、低酸素関連因子の発現と予後の相関が報告されている。これら低酸素関連因子の一つであるCarbonic anhydrase IX（CA9）は膜貫通型の亜鉛金属酵素で、細胞内外のpH調整や細胞間結合に重要な役割を果たしている。また低酸素環境下において中心的役割を果たすHypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) の活性化を鋭敏に反映するため、近年低酸素のバイオマーカーとして注目されている。本研究では、肝細胞癌におけるCA9発現の臨床的意義を明らかにし、悪性度獲得の機序としてCA9と上皮間葉転換（EMT）の関連について明らかにすることを目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 まず2000年から2010年に当院で術前治療なく根治手術を施行したHCC症例117例の切除標本を用いて、CA9の発現を免疫組織染色法で検討した。CA9の染色強度を0～2の3段階に、染色面積を1～4の4段階に分類し、両者の乗数でImmunoreactive score（IRS）を算出し、IRSが2以上の症例をCA9陽性とした。CA9陽性群が59例、CA9陰性群が58例で、CA9の陽性率は50.4%であった。CA9陽性群と陰性群の2群間において、臨床病理学的因子には有意差を認めなかったが、CA9陽性群は全生存率、無再発生存率とも有意に不良であり、多変量解析ではCA9発現が独立した予後不良因子であった。 次に肝癌細胞株（HuH7、HepG2）を用いて、低酸素培養下におけるCA9とEMTの関連性について、qRT-PCR法、細胞免疫蛍光法、Western blot法および細胞形態の変化について検討した。qRT-PCR法及び細胞免疫蛍光法により、低酸素下ではCA9の発現が亢進し、EMTマーカーであるE-cadherinの発現が低下し、N-cadherinの発現が亢進することを確認した。Western blot法でも同様に、低酸素培養下においてCA9の発現亢進とE-cadherinの発現低下を認め、EMT関連転写因子であるTwistとZEB1の発現が亢進していた。また低酸素培養下ではHuH7、HepG2ともに細胞の形態がspindle-likeに変化した。塩化コバルト（CoCl₂）による疑似低酸素環境下でも同様に、CA9の発現亢進、E-cadherinの発現低下とN-cadherin発現亢進を認めた。 そこでCA9とEMTの関連を検証するために、siRNAを用いてCA9をknockdownし、低酸素下で誘導されるEMTについて検討した。まず、CA9 knockdownによるCell viabilityの変化をMTT assay法にて検討した。siRNAを用いてCA9をknockdownすると、HuH7、HepG2ともに低酸素培養下での細胞増殖が抑制された。次に低酸素下において、CA9のknockdownによるEMTマーカーの発現変化をqRT-PCR法および細胞免疫蛍光法にて検討した。HuH7では、CA9をknockdownすることで、低酸素下に誘導されるE-cadherinの発現低下とN-cadherinの発現亢進がともに認められなくなった。一方、HepG2では、CA9をknockdownするとqRT-PCR法ではE-cadherinの発現に有意差を認めなかったが、N-cadherinの発現は抑制された。細胞免疫蛍光法では、HuH7、HepG2ともに、CA9をknockdownすると、低酸素下で誘導されるE-cadherinの発現低下とN-cadherinの発現亢進がともに認められなくなった。細胞形態の変化は、HuH7、HepG2ともにCA9をknockdownすることで、低酸素培養下で見られたspindle-likeな形態変化が認められなくなった。 〔総括(Conclusion)〕 肝細胞癌において、低酸素誘導因子であるCA9の発現亢進は予後不良因子であり、その機序としてCA9が低酸素環境下で誘導されるEMTの制御に関与している可能性が示唆された。	