

【21】

氏 名	西 雄 介
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第852号
学位授与の日付	令和5年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (消化器外科学)
学位論文題目	Significance of cytoplasmic expression of telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver resection (肝細胞癌根治的切除検体における腫瘍細胞質内テロメラーゼ逆転写酵素発現の意義)
論文審査委員	(主査) 教授 小 嶋 一 幸 (副査) 教授 入 澤 篤 志 教授 石 田 和 之

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

テロメラーゼ逆転写酵素 (Telomerase reverse transcriptase : TERT) は、テロメラーゼのサブユニットであり、テロメア長を延長させることで、遺伝的に安定性を維持させる役割を担っている。癌細胞においてはTERTの転写活性が上昇することでテロメラーゼ活性が上昇し、不死化を獲得できる。肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma : HCC) においてはTERTの転写を制御するTERTプロモーター領域で最も遺伝子変異の頻度が高いとされており、B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus : HBV) 関連HCCではHBV-DNAがTERTプロモーター領域に取り込まれた結果、変異していることが報告されている。報告上は80%以上のHCCでテロメラーゼ再活性化が確認されている。他の悪性腫瘍の多くでTERTは主に核に分布しているが、HCCの場合は細胞質にTERTが分布するとされている。酸化ストレスがTERTを核から細胞質に輸送するとの報告も存在し、酸化ストレスのマーカーとして8-ヒドロキシグアノシン (8-OHdG) が知られ、8-OHdGの高発現がHCC患者における予後不良因子であるとの報告もある。更に、血清HBV-RNAの宿主蛋白であるDNA依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit : DNA-PKcs) の高い発現がHBs抗原陽性とHCC腫瘍進行に関与する報告がある。多くのHCCではテロメア長が短くなり遺伝子が不安定な状況に陥るためテロメラーゼ再活性化においてDNA-PKcsがDNA修復することでその再活性化に関与している可能性があったが、TERTとDNA-PKcsの関係は明らかではなかった。

上記より、HCCにおけるTERT発現様式と酸化ストレス・DNA修復因子の関係性を研究するに至った。

【目 的】

2種類のTERTの一次抗体を用いてHCCにおけるTERT発現の細胞内分布を確認し、その臨床的意義を確認する。また、HCCにおける細胞質TERT発現と酸化ストレスの関係を、HCCにおけるTERT発現とDNA-PKcsの関係をそれぞれ明らかにする。

【対象と方法】

本研究は当院の臨床研究管理センターに倫理申請し、承認済である (provided ID number : 28110)。

2012年1月から2019年10月まで獨協医大病院第二外科でHCCに対して施行された455例の肝切除術施行症例のうち、今回施行した免疫染色実験に適した病理組織サンプルとして選択した135例の手術検体を対象とした。症例の内訳は男女比が103 : 32、年齢の中央値は68.6、37症例がB型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen : HBsAg) 陽性、37症例がC型肝炎ウイルス抗体 (anti-hepatitis C virus antibody : HCVAb) 陽性、2症例が双方とも陽性、59症例が双方とも陰性であった。

4 μ mの厚さの検体を用いてヘマトキシリンエオジン (HE) 染色・免疫染色を施行した。使用したTERT抗体はウサギのモノクローナル抗体とマウスのモノクローナル抗体を用いて腫瘍部の免疫染色を行った。また陽性・陰性の判定方法を記載する。TERT発現は腫瘍の細胞質または核の30%以上染色された症例を陽性と判定した。8-OHdG発現は腫瘍の核の30%以上染色された症例を陽性と判定した。DNA-PKcsは腫瘍の先端の核が染色されている、または腫瘍内部の核や細胞質が染色されていた症例を陽性と判定した。DNA-PKcs発現は腫瘍の核染色が30%より少ない症例は陰性と判定した。

TERT発現とHCC患者の術後転帰に対する統計学的処理はKaplan-Meyer法、log-rank法を用いて施行した。

【結 果】

ウサギのモノクローナル抗体を用いた135症例のうち、TERT抗体の細胞質陽性例は86症例 (63.7%)、核陽性例は3症例 (2.2%)、細胞質・核の双方陽性例は5症例 (3.7%)、双方陰性例は41症例 (30.4%) であった。マウスのモノクローナル抗体を用いたTERT抗体の細胞質陽性例は65症例 (61.3%)、核陽性例は4症例 (3.8%)、細胞質・核の双方陽性例は15症例 (14.2%)、双方陰性例は22症例 (20.8%) であり、双方の抗体を用いた結果は有意に一貫性が認められた。(p<0.001)

手術を施行したHCC患者において細胞質TERT発現例でHBsAg (p=0.007)、低分化型 (p=0.043)、DNA-PKcs高発現 (p=0.042)、8-OHdG高発現 (p<0.001) がそれぞれ有意に関連していた。細胞質TERT発現は予後と関連は認められなかったが、HBs抗原陽性・低分化型・DNA-PKcs高発現・8-OHdG高発現との有意な関連が認められた。

【考 察】

癌は核にTERTを供給することでテロメア長を維持し、遺伝子を安定化させる機能をもつ。また、細胞質におけるTERTの発現は炎症や上皮間葉移行などの癌の生存や進行・転移に関わる細胞内のシ

グナル経路の活性化に貢献する可能性が示唆される。本研究では細胞質TERT発現が低分化型HCCと関連しており、低分化型HCCの発現にはTERTの細胞質発現によるシグナル経路活性化が寄与している可能性が考えられた。

また、報告上は酸化ストレスによりTERTは核からミトコンドリアへ侵入しミトコンドリアDNA損傷を防ぎ、アポトーシスを抑制するはたらきを有する。今回の研究では多くのHCC症例で8-OHdGが陽性であり、これらを裏付ける結果と考えられた。

HBs抗原とHBV-RNAはcovalently closed circular DNA (cccDNA) により転写され、DNA-PKcsはHBVRNAの宿主蛋白である。今回の研究ではHBV細胞質TERT発現はHBsAg陽性とDNA-PKcs高発現と有意に関連していたため、HBV関連HCCにおいてTERTとDNA-PKcsの発現はcccDNAによって調節されている可能性も考えられた。

【結 論】

TERTは他の癌腫と異なり、HCC腫瘍では細胞質に多く発現しており、HCCの細胞質TERT発現はHBsAg陽性・低分化型・DNA-PKcs高発現・8-OHdG高発現と有意に関連していた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

テロメラーゼ逆転写酵素 (Telomerase reverse transcriptase : TERT) の癌細胞における発現は様々な癌種で報告されているが、肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma : HCC) 細胞内でのTERT分布の意義は明らかではなかった。申請論文では免疫染色の手法で、根治的切除のHCC検体135例におけるTERT発現の細胞内分布を確認し、そこで得られたTERTの発現と患者背景、酸化ストレスにより誘導される蛋白である8-ヒドロキシグアノシン (8-OHdG) の発現、また当科での先行研究によりB型肝炎関連HCCにおいて高発現し、腫瘍の進行や予後の悪化に関連することが示されたDNA依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit : DNA-PKcs) との関連性について解析した。その結果、TERTはHCCでは細胞質に有意に分布し、細胞質TERT発現は全生存期間や無再発生存期間と有意な関連は認めないものの、B型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen : HBsAg) 陽性、低分化型HCC、DNA-PKcs高発現、8-OHdG高発現と有意に関連すると結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では当院で施行されたHCC肝切除検体のみを使用し、異なる4種類の一次抗体を使用して免疫染色を施行している。特にTERTの発現の評価にあたっては、異なる2種類の抗体を用いて評価を行い、TERTの発現部位の評価を慎重に行った。また、当院の臨床研究管理センターに倫理申請し、承認済である (provided ID : 28110)。免疫染色結果の解析には適切な統計解析を行っており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

これまでHCC細胞内におけるTERT発現の意義は明らかではなかった。また、他の癌種において、

TERTは核内での発現増強が報告されているのに対して、HCCにおいては細胞質におけるTERT発現増強が報告されており、TERTが核から細胞質に移動していることが想定されたが、そのメカニズムは明らかではなかった。申請論文では豊富な症例を用いて、免疫染色の手法を用いてHCC細胞内でTERTが細胞質で強く発現し、詳細な解析により細胞質TERT発現と有意に関連する患者背景因子・マーカーを明らかにし、細胞質TERT発現がHCCの予後ではなく発癌に寄与する可能性を示した。また、TERTが核から細胞質に移動する機序として、酸化ストレスの関与を示唆する所見を得た。これらの点において、本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では自施設で切除した多数のHCC症例を、適切な対象群の設定の下、確立された実験手法と統計解析を用いて、HCC細胞内TERT発現との有意関連因子を導いている。免疫染色という実験手法は以前からある手法であるが、実験者の技量や抗体の質により結果が影響を受けやすいことから、複数の抗体の使用や自動免疫染色器の使用により、そのバイアスを抑える工夫を行っている。そこから導き出された結論および結論から想定されるTERT発現のメカニズムや意義は、先行研究の結果と部分的に一致しており、また、HCCの腫瘍学的特性を考慮しても妥当なものであると考えられる。

【当該分野における位置付け】

先行研究2編では、TERTの細胞質発現および予後への影響を解析しているが、発現部位の詳細な解析が行われていないこと、さまざまな病因からの発癌症例を扱っていないこと、などの問題点があった。申請論文では、これらの問題点を解決するべく、異なる4種類の1次抗体を用いてHCC検体の免疫染色を施行しており、その結果細胞質TERT発現と有意に関連する患者背景因子・マーカーを明らかにしている。これは、今後HCCの早期発見・術前診断などの臨床応用に繋がり得る大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、消化器外科学・腫瘍学・病理学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Molecular and Clinical Oncology

(15 : 244, 2021)