

【9】

氏名	しみず たか ゆき 清水 崇 行
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第653号
学位授与の日付	平成27年3月4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	Frequent alteration of the protein synthesis of enzymes for glucose metabolism in hepatocellular carcinomas (肝細胞癌における糖代謝関連酵素の変化)
論文審査委員	(主査) 教授 平 石 秀 幸 (副査) 教授 加 藤 広 行 教授 安 西 尚 彦

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

ヒトの細胞はその恒常性を保つために、糖代謝を用いたエネルギー産生を行っている。分化した細胞の多くは、十分な酸素供給下におけるミトコンドリアのクエン酸回路 (tricarboxylic acid cycle : TCA cycle) での酸化的リン酸化により、グルコースを代謝し、効率よくアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate : ATP) の産生を行っている。一方、癌細胞はグルコースの取り込みが亢進し、十分に酸素が供給される環境にあるのにも関わらず、酸化的リン酸化が抑制されている。癌細胞がなぜこのような効率の悪いエネルギー産生を行っているのかは未だに解明されていない。

【目 的】

肝細胞癌における糖代謝の変化について調べることである。

【対象と方法】

本研究はUMIN臨床試験登録（登録番号：UMIN000011465）を行い、患者からのインフォームド Consent と獨協医科大学倫理委員会の承認（承認番号：24089）を得て、指針にしたがって行った。

肝細胞癌と診断され、肝切除術を施行された45人の患者を対象とした。摘出した検体を癌部と非癌部に分けた。検体の重量を測定し、はさみを用いて細切した。細切した検体は低張液に浸して、homogenizerを用いて、均質化した。検体は核と細胞質に分画して、それぞれタンパク質を抽出した。検体からのタンパク質の抽出が成功していることを確認するために、抽出した検体に細胞質のコ

ントロールである glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と核のコントロールである histone H3について immunoblotting を行った。

SDS-PAGE および immunoblotting 法を用いて、目的とする糖代謝関連酵素のタンパク質合成を測定した。

また癌部と非癌部に分けた検体の糖代謝関連酵素の mRNA の発現量を調べた。reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて、糖代謝関連酵素の mRNA の発現量を測定し、タンパク質合成との相関を比較検討した。

糖代謝関連酵素のウェスタンブロッティングのデータは、IQTL software (version 8.1, GE healthcare) を用いて、定量化した。定量化した癌部と非癌部のタンパク質合成の比を、コントロールである GAPDH の癌部と非癌部のタンパク質合成の比で割ることで、定量化したデータを標準化した。

糖代謝関連酵素の変化と臨床背景因子の関係については、SPSS statistical software package (version 20.0, Chicago, IL, USA) を用いて、統計学的に分析した。カイ 2 乗検定を用いて、2 群間の臨床背景因子の分布を統計学的に比較検討した。また Mann-Whitney U-test を用いて、2 群間の臨床背景因子のパラメータを統計学的に比較検討した。それぞれの検定の有意水準は 5% とした。

【結 果】

酸化的リン酸化の酵素であるコハク酸脱水素酵素のサブユニットである SDHA と SDHB が癌部では、高い頻度で合成が低下していた (56%、48%)。一方、pentose phosphate pathway (PPP) の律速酵素である glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) と transketolase (TKT) は、癌部では高い頻度で合成が上昇していた (45% および 55%)。解糖系の酵素である アルドラーゼは高い頻度で合成が低下していた (55%)。

コハク酸脱水素酵素の失活による安定化する oncogene の hypoxia inducer 1 α (HIF-1 α) に関しては、殆どの検体では検出できなかった。また HIF-1 α の安定化を示す cytochrome oxidase 4-1 (COX4-1) の低下や活性化するピルビン酸キナーゼ M2 と乳酸脱水素酵素は有意な変化は認められなかった (それぞれ 18%、15%、8%)。

PPP を活性すると報告されている転写因子 NRF2 は、リン酸化されているものと非リン酸化の 2 種類を調べたが、癌部では 2 種類とも、高い頻度で核に集積していた (それぞれ 77%)。

mRNA の発現に関しては、G6PD と TKT はタンパク質合成と正の相関を示していたが、TKT1、アルドラーゼ、SDHA、SDHB は、mRNA 発現とタンパク質合成は相関していなかった。

【考 察】

肝細胞癌では SDHA と SDHB のタンパク質合成が高頻度で減少しており、肝細胞癌における酸化的リン酸化の抑制が示唆された。従来は酸化的リン酸化の抑制には HIF-1 α の安定化が関与していると考えられていたが、今回の研究では実際の肝細胞癌の検体からは HIF-1 α を検出できなかった。肝細胞癌は富血管性の腫瘍であり、十分な酸素状態下に存在していることから、HIF-1 α は肝細胞癌の悪性度や進行には、有意に関連しないと考えられた。

一方肝細胞癌ではPPPの制限酵素でありG6PDとTKTのタンパク合成が増加しており、アルドラーゼの合成が低下していた。この結果は取り込まれたグルコースの多くが、解糖系で代謝されず、PPPで代謝されることを示唆している。PPPは細胞増殖に必要な脂質や核酸を合成することから、肝細胞癌の増殖にはエネルギー産生よりも、むしろ細胞増殖するために脂質や核酸をより多く合成することが重要である可能性が考えられた。

アルドラーゼの合成低下は、従来のWarburg効果とは相反する現象であり、肝細胞癌の診断においてFDG-PET検査の有用性が低い理由のひとつと考えられた。

肝細胞癌でPPPが活性化している背景には、酸化ストレスの転写因子であるNF-E2 related factor-2 (NRF2) の安定化があることが、今回の研究で確認された。酸化ストレスのない状態ではNRF2はKelch like ECH associated protein 1 (KEAP1) と結合して、ユビキチン化されて分解される。また肝細胞癌の患者の多くは慢性肝炎および肝硬変を有しており、常に肝臓に酸化ストレスが加わっている状態が想定される。慢性炎症による酸化ストレスがNRF2を安定した結果、PPPを活性化させ、肝細胞癌の増殖が促進すると考えられた。

【結 論】

肝細胞癌は転写因子NRF2の活性化により、PPPの律速酵素のmRNAおよびタンパクを増加していた。酸化的リン酸化を構成する酵素は合成低下していたが、解糖系本流の酵素アルドラーゼは増加していなかった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

癌細胞はグルコースの取り込みが亢進し、十分に酸素が供給される環境にあるのにも関わらず、酸化的リン酸化が抑制されている。癌細胞がなぜ効率の悪いエネルギー産生を行っているのかは未だに解明されていない。肝細胞癌においても同様の報告がされているが、酸化的リン酸化が抑制される原因は解明されていない。申請論文では、肝細胞癌における糖代謝の変化を明らかにすることを目的とし、肝細胞癌の診断で肝切除術を施行した患者45例の検体を癌部と非癌部に分けて検討している。結果、1) コハク酸脱水素酵素のサブユニットであるsuccinate dehydrogenase (SDH) subunit A (SDHA) とSDH subunit B (SDHB) が癌部では、高い頻度で合成が低下していた (56%、48%)。一方、pentose phosphate pathway (PPP) の律速酵素であるglucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) とtransketolase (TKT) は、癌部では高い頻度で合成が上昇していた (45%、55%)。解糖系の酵素であるアルドラーゼは高い頻度で合成が低下していた (55%)。2) 肝細胞癌で糖代謝の変化の要因として報告されているコハク酸脱水素酵素の失活により安定化するoncogeneのhypoxia inducer 1 α (HIF-1 α) に関しては、ほとんどの検体で検出できなかった。また、HIF-1 α の安定化を示すcytochrome oxidase 4-1 (COX4-1) の低下や活性化するピルビン酸キナーゼM2と乳酸脱水素酵素の有意な変化を認めなかった (それぞれ18%、15%、8%)。3) PPPを活性化すると報告されている転写因子nuclear factor erythroid-derived 2 related factor-2 (NRF2) は、リン酸化され

ているものと非リン酸化の2種類を調べたが、癌部では2種類とも、高い頻度で核に集積していた(77%)。4) mRNAの発現に関しては、G6PDとTKTはタンパク合成と正の相関を示していたが、transketolase1、アルドラーゼ、SDHA、SDHBは、mRNA発現とタンパク質合成は相関していなかった。以上の結果から、肝細胞癌はHIF-1 α ではなく、転写因子NRF2の活性化により、自身の糖代謝を変化させていることが明らかとなった。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、当院の倫理委員会の承認を受けている(承認番号:24089)。また申請論文では、当院での豊富な症例を用いて、western blot法で糖代謝関連酵素の蛋白合成を測定した。western blot法は定量性に優れ、異なるサイズの非特異シグナルを見分けることが容易であるため、偽陽性のデータを直ちに除外することができる。培養細胞ではなく実際の肝細胞癌検体を用いることで、細胞株を樹立する過程で生じるアーティファクトを防ぐことができる。また客観的な統計解析を加えることで、詳細な考察を行っており、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】

肝細胞癌における糖代謝の変化は培養細胞や免疫染色で報告されていたが、その多くが定量性に乏しく、糖代謝のごく一部に注目するのみで、腫瘍糖代謝全体像の正しい把握がされているとは言い難い状況であった。申請論文では、豊富な症例に対するwestern blot法を用いて、肝細胞癌における糖代謝の変化を検討し、従来報告されていたHIF-1 α ではなく、転写因子NRF2により糖代謝の変化が説明できることを初めて明らかにしている。これは、Warburg効果がHIF-1 α により説明しようという従来の概念とは異なるものである。よって申請者の研究成果は、高い独創性を有している。解糖系の迂回路としてのPPPの意義は近年急速に注目を集めており、肝細胞癌で変異が見つかる転写因子NRF2がその回路を活性化させるという発見の意義は大きい。

【結論の妥当性】

申請論文では、症例の検体を癌部と非癌部に分けて、確立した実験手法と統計解析を用いて、肝細胞癌の糖代謝の変化とその機序について、詳細な検討を行っている。結果から導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、消化器学、生化学などの関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、肝細胞癌における糖代謝とその機序を、実際の手術検体を用いて研究し、その結果、転写因子NRF2の活性化が肝細胞癌においてPPPが活性化していることを明らかにしている。これは、肝細胞癌のみならず、糖代謝を標的とした新しい癌の治療戦略の可能性が示唆される極めて有意義な研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、消化器外科学や生化学・分子生物学の広範な知識の基に作業仮説を立て、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。また申請者は統計解析も積極的に学び、本研究にもその知識が活かされている。研究成果は当該領域の国際誌に掲載されており、これらのこ

とより申請者の研究能力は極めて高いと評価できる。

【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断した。

（主論文公表誌）

Journal of Gastroenterology

49 : 1324-1332, 2014