

氏名	宮川 恒一郎
<p>論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと) Lipid-induced endoplasmic reticulum stress impairs selective autophagy at the step of autophagosome-lysosome fusion in hepatocytes. (遊離脂肪酸による小胞体ストレスは肝細胞における選択的オートファジーをオートファゴソームとライソゾームの融合の段階で障害する)</p>	
<p>論文要旨</p> <p>【背景・目的】非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はメタボリックシンドロームにおける肝の表現型として知られており、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) から肝硬変、肝細胞癌へと進展することもある。また、細胞内蛋白分解機構の一つとして知られているオートファジーは細胞内異常蛋白や障害された細胞内小器官を選択的に除去する。NASH では肝におけるオートファジーは障害されており、病態進展に関与している可能性が示唆されている。しかし、その機序は未だ解明されていない。本研究では、NASH におけるオートファジーの抑制機序について形態学的ならびに生化学的手法を用いて検討した。</p> <p>【方法・結果】C57BL/6J マウスに高脂肪食を投与し、12 週後の小胞体ストレスとオートファジーを評価した。高脂肪食投与マウスでは小胞体ストレスマーカーである eIF2α のリン酸化、spliced XBP1 の発現上昇とともに、オートファゴソームの指標となる LC3-II の増加をウエスタンブロットで認めた。また、LC3 の免疫染色や電子顕微鏡による評価においても高脂肪食投与マウスの肝においては有意にオートファゴソームが増加していた。<i>In vitro</i> ではヒト不死化肝細胞株 (OUMS-29) と肝癌細胞株 (Huh7) を、飽和脂肪酸 [パルミチン酸 (PA) C16:0、ステアリン酸 (SA) C18:0]、または不飽和脂肪酸 [パルミトレイン酸 (PO) C16:1、オレイン酸 (OA) C18:1] で処理し、小胞体ストレスとオートファジーを評価したところ、飽和脂肪酸でのみ小胞体ストレスの誘導、LC3-II の増加を認めた。LC3-II の増加はオートファジーの亢進のみならず (オートファジー前期段階の亢進)、オートファゴソームの分解が低下している際 (オートファジー後期段階の障害) にも認められる現象であり、それらを分けて検討するため LC3 turnover assay を行った。その結果、飽和脂肪酸負荷で認められた LC3-II の増加はオートファゴソームの分解が障害されたことによるものと考えられた。また、mRFP-GFP tandem fluorescent-tagged LC3 (tf-LC3) を OUMS-29 細胞に遺伝子導入して OA と PA を負荷した際のオートファジーを評価した。GFP は酸性では退色するが、mRFP は退色しないことが知られているが、PA においてはオートファゴソームを示す GFP と mRFP の共在の増加とオートライソゾームを示す mRFP 単独のシグナルの減少を認めた。このことも、PA 負荷で認められたオートファゴソームの増加はオートファジーの後期段階が障害されたことに起因することを支持するものである。オートファジー後期段階 (オートファゴソームとライソゾームの融合、ライソゾームによるオートファゴソームの分解) をさらに評価するため、GFP-LC3 あるいは mRFP-LC3 を遺伝子導入した OUMS-29 細胞のライソゾームを Lamp1 で標識して評価したところ、GFP のみならず mRFP においても Lamp1 との co-localization が低下していた。以上から、PA においてはオートファゴソームとライソゾームの融合が障害されていると考えられた。また、Lysotracker で酸性オルガネラを標識した OUMS-29 細胞を Lamp1 で免疫染色を行いライソゾームの酸性化を評価したところ、PA はライソゾームの酸性化を阻害しなかった。また、カテプシン活性についても Magic Red を用いて評価したところ、PA 負荷によるカテプシン活性の低下は見られなかった。以上のことから、PA におけるオートファゴソームの増加はオートファゴソームとライソゾームの融合の障害に起因するものと考えられた。さらに PA によるオートファジーの障害と小胞体ストレスとの関係を検討したところ、PA による LC3-II の増加は小胞体ストレスの程度と相関していた。オートファジーの選択性を評価するため、選択的オートファジーのアプター蛋白であるリン酸化 p62 (S351) について評価したところ、PA でのみ増加しており、これはライソゾーム阻害薬の同時投与で更に増加した。加えて、GFP-LC3 で標識したオートファゴソームは PA により形成されたユビキチン陽性の細胞内凝集体に局在していた。このことは、高脂肪食マウスにおいても同様の結果であった。</p> <p>【考察・結論】過剰な遊離脂肪酸、特に飽和脂肪酸の肝臓への流入は小胞体ストレスを惹起し、それによりオートファジーをオートファゴソームとライソゾームの融合の段階で障害することが示唆された。しかし、オートファジーの異常蛋白に対する選択的認識機能は保たれていると考えられた。このことは小胞体ストレスを軽減する薬剤が NASH において低下したオートファジーによる異常蛋白除去能力を回復させ、病態進展を制御する可能性を示しており、新たな治療戦略の一つとなると考える。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	宮川 恒一郎			
論文審査委員	主査 所属	障害機構系	病態機構部門	齋藤 光正 (印)
	副査 所属	環境・産業生態系	環境適応医学部門	足立 弘明 (印)
		障害機構系	病態機構部門	久岡 正典 (印)
		系	部門	(印)
		系	部門	(印)

論文題目

Lipid-induced endoplasmic reticulum stress impairs selective autophagy at the step of autophagosome-lysosome fusion in hepatocytes.

(遊離脂肪酸による小胞体ストレスは肝細胞における選択的オートファジーをオートファゴソームとライソゾームの融合の段階で障害する)

学位論文審査結果要旨

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 病態進展にオートファジー障害が関与していることがすでに示唆されていたが、オートファジーの抑制機序は解明されていなかった。本研究は、形態学的手法を用いてその機序を解明した。

1. 高脂肪食投与マウスの解析

・高脂肪食投与マウスの肝臓では小胞体ストレス誘導、オートファゴソーム増加が起こっている。

マウス肝臓組織切片の LC3 (オートファゴソーム関連タンパク) による免疫染色ならびに電子顕微鏡を用いた形態学的解析の結果オートファゴソームの有意な増加を認めた。また、ウエスタンブロットで肝臓組織における LC3-II の増加、小胞体ストレスマーカー蛋白 (リン酸化 eIF2 α 、spliced XBP1) の増加を認めた。

2. ヒト不死化肝細胞株 (OUMS-29) および肝癌細胞株 (Huh7) を用いた *in vitro* 解析

1) 遊離脂肪酸 (飽和脂肪酸) は、肝細胞に小胞体ストレスの誘導、オートファゴソームの増加を来す。

飽和脂肪酸 (パルミチン酸、ステアリン酸) または不飽和脂肪酸 (パルミトレイン酸、オレイン酸) を肝細胞に負荷し、小胞体ストレスとオートファジーを評価したところ、飽和脂肪酸負荷でのみ小胞体ストレスマーカー、LC3-II の増加を認めた。オートファジー隔離膜関連タンパク Atg7、Beclin1 の増加は認めず、オートファジー前期段階の亢進によるものではないと考えられた。

2) オートファゴソームの増加はオートファジーの後期段階が障害されたことに起因する。

mRFP-GFP tandem fluorescent-tagged LC3 (tf-LC3) を遺伝子導入した OUMS-29 細胞にオレイン酸とパルミチン酸を負荷し、オートファジーを評価した。(GFP は酸性では退色するが、mRFP は退色しない。) その結果、パルミチン酸負荷細胞においてのみ、GFP と mRFP の co-localization (オートファゴソームを示す) の増加と、mRFP 単独シグナル (オートライソゾームを示す) の減少を認めた。

3) オートファゴソームの増加はオートファゴソームとライソゾームの融合が障害されたことに起因する。

GFP-LC3 あるいは mRFP-LC3 を遺伝子導入した OUMS-29 細胞のライソゾームを Lamp1 で標識して評価したところ、パルミチン酸負荷細胞においては、GFP のみならず mRFP においても Lamp1 との co-localization が低下していた。Lysotracker (酸性オルガネラを標識) と Lamp1 で免疫染色を行ったところ、ライソゾームの酸性化への影響はなかった。また、カテプシン活性を Magic Red を用いて評価したところ、活性の低下は見られなかった。

4) オートファゴソームとライソゾームの融合障害は小胞体ストレスの程度と相関する。

Puromycin もしくは 4-PBA を細胞に添加することにより小胞体ストレスを増強もしくは軽減すると、LC3-II のそれぞれ減少、増加がみられ、オートファゴソームとライソゾームの融合障害はそれぞれ軽減、増強した。

以上より、過剰な遊離脂肪酸 (とくに飽和脂肪酸) は、肝細胞での小胞体ストレスを惹起し、それによりオートファゴソームとライソゾームとの融合障害を来し、オートファジーを抑制することが明らかになった。

本研究は、NASH 病態進展に関与するオートファジー抑制の機序を論理的に解明したもので、今後新たな治療法の開発につながる重要な研究成果である。よって本学の学位論文として適格であると判断した。

平成 28 年 4 月 27 日

氏 名

原田 佳和

論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)

Strong expression of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 independently predicts shortened disease-free survival in patients with early stage oral squamous cell carcinoma (GalNAc-T3 強発現は早期口腔扁平上皮癌における無病生存期間の短縮を予測し得る)

論文要旨

【背景】口腔扁平上皮癌(OSCC)は早期診断・手術により予後改善を得られる疾患である。しかし早期症例(ESOSCC)においてさえ、局所再発や後発頸部リンパ節転移が屢々認められ予後悪化となるため、再発や転移のリスクを推測し得る生物学的マーカーの発見は非常に重要である。近年、癌細胞の浸潤・転移能への、細胞表面での糖鎖修飾変化の関与が明らかになっている。N-アセチルガラクトサミン転移酵素(GalNAc-Ts)はムチン0結合型糖鎖付加を触媒する糖転移酵素であり、その内GalNAc-T3は、悪性腫瘍における臨床病理学的因子や予後との関連性が多数報告されているが、OSCCやESOSCCでの検討はなされていない。

【目的】GalNAc-T3の発現とESOSCCの臨床病理学的因子および予後の関連性を解析し、GalNAc-T3がESOSCCに対する有意な生物学的マーカーとなり得るかを検討する。

【方法】1) GalNAc-T3抗体の作成・特異性の確認: GalNAc-T3のアミノ酸配列解析により抗原性の高い配列を同定し、合成したペプチドをウサギへ免疫して抗体を作製した。さらに、抗体特異性を確認した。

2) 対象症例: 産業医科大学病院にて、ESOSCCに対して手術単独による治療を受け、予後追跡可能な患者110例を対象とした。

3) 免疫組織化学染色と評価: パラフィン包埋切片を使用し、GalNAc-T3抗体を用いて免疫染色した標本の浸潤部にて癌細胞の陽性率を以て評価し、強陽性(20%以上)、弱陽性(20%未満)に分類した。

【結果】免疫組織染色では、GalNAc-T3は細胞質に発現が見られ、強陽性70例(63.6%)、弱陽性40例(36.4%)であった。 χ^2 乗検定・フィッシャー正確確率検定では、強陽性例では陰性例に比べて有意に低分化、静脈浸潤・リンパ管浸潤、再発が認められた。再発症例中、救済手術を施行した35例の組織では、強陽性19例(54.3%)、弱陽性16例(45.7%)であり、特に後発頸部リンパ節転移症例において強陽性例が多い傾向が見られ、原発巣および転移リンパ節の両方の組織で強発現の傾向が見られた。Kaplan-Meier生存曲線では、術後2年および5年のどちらにおいても無病生存期間の有意な短縮を認め、特に2年以内の再発傾向を強く認めた。全生存期間には有意差を認めなかった。Cox比例ハザードモデル検討では、GalNAc-T3強発現は浸潤様式やリンパ管浸潤と共にESOSCCの独立した予後規定因子であることが示された。

【考察および結論】ESOSCCにおいて、GalNAc-T3強発現例では、特に後発頸部リンパ節転移の出現傾向を認め、原発巣および転移リンパ節の両方の組織で強発現の傾向が見られたことから、GalNAc-T3強陽性細胞が高い転移能を有していると考えられた。種々の癌における先行研究では、GalNAc-T3は転移成立までの過程において、原発巣からの離脱・浸潤、または血管内皮への接着に関与しているとされており、本結果と合致する。OSCCの頸部リンパ節転移に対して、頸部郭清術は最も重要な治療方法であるが、cN0症例に対する予防的頸部郭清術の適応に関して統一した結論は得られていない。今回の研究において、GalNAc-T3強発現は潜在性頸部リンパ節転移の高危険群抽出の有用なマーカーと考えられることから、予防的頸部郭清術の有効症例の選択の精度向上が期待でき、ESOSCC患者の再発率低下につながると思われる。

学位論文審査結果要旨

氏 名	原田 佳和					
論文審査委員	主査 所属	障害機構	系	病態機構	部門	久岡 正典 (印)
	副査 所属	障害機構	系	災害外科	部門	田中 文啓 (印)
		障害機構	系	災害医学	部門	中村 元信 (印)
			系		部門	(印)
			系		部門	(印)

論 文 題 目

Strong expression of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 independently predicts shortened disease-free survival in patients with early stage oral squamous cell carcinoma (GalNAc-T3 強発現は早期口腔扁平上皮癌における無病生存期間の短縮を予測し得る)

学位論文審査結果要旨

口腔癌は頭頸部領域において最も高頻度にみられる癌であり、その約 90%を扁平上皮癌が占めているが、術後に再発やリンパ節転移をきたすなど、例え早期であっても予後の不良な症例が少なからず存在するため、患者予後を予測し、より適切な治療計画に応用できるバイオマーカーの探索が重要と考えられる。申請者らは、大腸癌や腎癌などの他の部位の癌において、それらの不良な予後との相関関係が近年指摘されている N-アセチルガラクトサミン転移酵素(GalNAc-Ts)の過剰発現が、早期の口腔扁平上皮癌においても患者予後を予測し得る因子であるか否かを、免疫組織化学的手法を用いて検討した。

すなわち、本学病院で 1994 年から 2015 年までの期間に切除された早期 (T1-2、N0) の口腔扁平上皮癌 110 例を対象として、申請者らが以前に合成した GalNAc-T3 に対するウサギポリクローナル抗体を用いて免疫染色を施行し、特に腫瘍の先進浸潤部での GalNAc-T3 の発現の程度から、弱陽性例 (陽性細胞が癌細胞の 20%未満) と強陽性例 (20%以上) の 2 群に大別し、その結果と患者の年齢や性別、癌の発生部位、分化度、先進部浸潤様式、脈管侵襲の状況などの種々の臨床病理学的因子との関係の有無をカイ二乗法やフィッシャー正確確率検定を用いて検討した。また、術後の患者予後との関係の有無について Kaplan-Meier 法による生存曲線と Log-rank 検定により検討し、さらに Cox 比例ハザードモデルを用いて単・多変量解析を行い、早期口腔扁平上皮癌の予後因子の抽出を試みた。

その結果、検索した 110 例のうち 70 例が GalNAc-T3 強陽性、40 例が弱陽性と判定され、強陽性を示した例の群は弱陽性例の群に比してより低分化な腫瘍であり ($P=0.03$)、リンパ管侵襲 ($P=0.03$)・静脈侵襲 ($P=0.04$)と術後再発 ($P=0.01$)が高頻度に認められた。また、GalNAc-T3 強陽性の群は弱陽性の群に比べ、術後 2 年及び 5 年の観察期間のいずれにおいても、無病生存期間が有意に短縮していた ($P \leq 0.001$)。さらに単・多変量解析では、GalNAc-T3 の強発現は今回検討した臨床病理学的因子の中で唯一の独立した予後因子であることが示された。

以上の結果は、早期口腔扁平上皮癌においても GalNAc-T3 が強発現するものは悪性度が高く予後が不良であることを意味していると考えられる。腫瘍の生検材料や切除検体で GalNAc-T3 の免疫染色を行って上記のような染色態度の評価を行うことは比較的簡便に実施可能であり、将来的に患者のより適切な取り扱いや治療方針の選択にも結びつく可能性が期待できる。癌細胞の GalNAc-T3 の発現やその生物学的機能に関わる詳細なメカニズムの解明にはさらなる検討を要するが、口腔扁平上皮癌での糖鎖修飾に関わる分子異常に初めて焦点を当てた本研究は、臨床病理学的に重要な知見を示した意義あるものであり、本学の学位論文として適格であると判定した。

平成 28 年 6 月 3 日