

論 文 要 旨

Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin are potential prognostic markers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma.

〔血清 MnSOD と Thioredoxin は C 型肝炎ウイルス関連肝癌の予後を予測する〕

玉 井 努

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

肝疾患、特に C 型慢性肝炎や非アルコール性脂肪性肝疾患の病態進展には酸化ストレスが関与することから、酸化ストレスを反映するバイオマーカーの臨床的意義は極めて高い。Manganese superoxide dismutases (MnSOD) と thioredoxin (TRX) は肝細胞の酸化ストレスマーカーのひとつと考えられ、血中にも分泌されるが、肝疾患におけるこれら酸化ストレスマーカーの臨床的意義は明らかにされていない。

今回、C 型肝炎ウイルス (HCV) に関連した肝疾患における酸化ストレスに着目し、HCV 関連慢性肝疾患患者における血清 MnSOD と TRX 濃度の臨床的意義を明らかにする事を目的とした。

【材料および方法】

HCV 関連慢性肝疾患で経過観察中の患者から得られた 64 例の血清サンプルを用いて、血清 MnSOD 濃度と血清 TRX 濃度を測定し、これらを非肝細胞癌 (非 HCC 群 ; 34 例) と肝細胞癌 (HCC 群 ; 30 例) の 2 群に分け、健常者 (健常者群 ; 20 例) と合わせて 3 群間で比較した。また、患者因子 (年齢、性別、血液生化学検査など)、ウイルス因子 (HCV の遺伝子型、ウイルス量)、背景肝因子 (肝予備能スコア、肝癌の進行度など) との関連を多変量解析により検証した。

【結 果】

HCV 関連慢性肝疾患患者では、血清 MnSOD 濃度は HCC 群、非 HCC 群、健常者群の順で有意に高かった。血清 TRX 濃度も HCC 群、非 HCC 群、健常者群の順で有意に高かった。しかし、HCC 群において血

清 MnSOD 濃度と TRX 濃度は相関しなかった。非 HCC 群では、血清 MnSOD 濃度は、AST、ALT、アルブミンと正の相関を示し、TRX は血液生化学データとは相関しなかった。一方、HCC 群では血清 MnSOD 濃度は、AST、LDH、 α -フェトプロテイン (AFP)、デス- γ -カルボキシプロトロンビン (DCP) と正の相関を示し、ChE とアルブミンと負の相関を示した。血清 TRX 濃度は、血小板とのみ正の相関を示した。また、HCC 群では、血清 MnSOD 濃度は、Child-Pugh、CLIP、JIS のスコアが高い方が有意に高値を呈したが、血清 TRX 濃度はこれらのスコアと有意な関連はなかった。さらに、HCC 群における累積生存率は、血清 MnSOD 濃度が 110 ng/mL 以上の方が、110 ng/mL 未満よりも有意に低かった ($P = 0.01$)。一方、血清 TRX 濃度が 80 ng/mL 未満の症例は、それ以上の症例よりも予後不良となる傾向が見られた ($P = 0.05$)。血清 MnSOD 濃度と血清 TRX 濃度を組み合わせて予後と比較すると、血清 MnSOD 濃度が 110 ng/mL 以上で、かつ血清 TRX 濃度が 80 ng/mL 未満の患者の予後が最も不良であった。さらに log-rank test を用いた単変量解析で有意に予後に関連した 5 項目 (血清 MnSOD、プロトロンビン時間、アルブミン、AFP、DCP) を用いて多変量解析 (コックス比例ハザードモデル) したところ、血清 MnSOD 濃度が 110 ng/mL 以上 (risk ratio, 4.12; 95% confidential interval, 1.22-13.88; $P = 0.02$) と AFP 濃度が 40 ng/mL 以上 (risk ratio, 6.75; 95% confidential interval, 1.70-26.85; $P < 0.01$) が独立した予後規定因子であった。

【結論及び考察】

血清 MnSOD と Thioredoxin 濃度は、HCV 関連肝癌の予後を予測する臨床的バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 164号	学位申請者	玉井 努
審査委員	主査	高嶋 博	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	馬嶋 秀行	副査 菰方 輝夫
	副査	橋口 照人	副査 福倉 良彦

Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin are potential prognostic markers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma.

(血清 MnSOD と Thioredoxin は C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌の予後を予測する)

C型肝炎ウイルス (HCV) などによる慢性肝疾患の病態進展には酸化ストレスが関与する。また、Manganese superoxide dismutase (MnSOD) と Thioredoxin (TRX) は酸化ストレスマーカーのひとつである。しかし、HCV 関連慢性肝疾患における酸化ストレスマーカーの臨床的意義は十分解明されていない。学位申請者らは、血清 MnSOD と TRX の HCV 関連慢性肝疾患における臨床的意義を明らかにする事を目的とした。HCV 関連慢性肝疾患患者を肝細胞癌群 (HCC 群) と非肝細胞癌群 (非 HCC 群) に分け、これらの患者と健常者 (対照群) から得られた血清を用いて検討した。ELISA 法で測定した血清中の MnSOD 濃度と TRX 濃度を各群で比較した。また、MnSOD と α -fetoprotein (AFP) の HCC 診断能、HCC 群における MnSOD と TRX の臨床データとの関連を検討した。さらに、HCC 群において MnSOD および TRX と予後との関連について解析した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) MnSOD と TRX はいずれも非 HCC 群と対照群を比較して HCC 群で有意に高値であったが、両者は相関しなかった。
- 2) MnSOD と AFP の HCC 診断能は同等であった。
- 3) MnSOD はアルブミン、プロトロンビン時間 (%) と負の相関、AFP、des- γ -carboxyprothrombin と正の相関を認めた。TRX は、血小板数と正相関した。
- 4) MnSOD は Child-Pugh スコア、Japan Integrated Staging、Cancer of the Liver Italian Program が高いほど有意に高値で、TRX はこれらのスコアと関連しなかった。
- 5) HCC 群において、MnSOD 110 ng/mL 以上と AFP 40 ng/mL 以上は予後不良の独立した予測因子であった。また、MnSOD 110 ng/mL 以上かつ TRX 80 ng/mL 未満は最も予後不良で、TRX 80 ng/mL 以上は、MnSOD に関係なく予後良好であった。

本研究では、MnSOD は HCV 関連慢性肝疾患の肝予備能と負の相関をする一方で、腫瘍マーカーや HCC スコアリングシステムとも強く相関した。また、MnSOD は HCC 患者の予後に関連する独立した因子で、TRX と組み合わせることで、予後をより明確に推測できる可能性が示唆された。HCC 患者の予後はいまだ不良で、酸化ストレスマーカーを HCC 患者の予後の推定や治療方針の決定などに用いることで予後を改善できる可能性があり、MnSOD と TRX の臨床的意義は極めて高いと考えられ、今後の研究のさらなる発展が期待できる。

本研究は、HCV 関連慢性肝疾患における 2 つの酸化ストレスマーカーの臨床的意義を検討したものであり、MnSOD と TRX は HCC における予後と関係することが示され、また HCV 関連慢性肝疾患において MnSOD と TRX は異なる動態を示す可能性を明らかにした点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 164号		学位申請者	玉井 努
審査委員	主査	高嶋 博	学位	博士(医学・歯学・学術)
	副査	馬嶋 秀行	副査	菰方 輝夫
	副査	橋口 照人	副査	福倉 良彦

主査および副査の5名は、平成24年2月2日、学位申請者 玉井 努 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) manganese superoxide dismutase (MnSOD) と thioredoxin (TRX) は肝細胞癌 (HCC) でいずれも高値となるが、HCC 群では血清 MnSOD 濃度高値もしくは血清 TRX 濃度低値が予後不良となる理由を説明せよ。

(回答) MnSOD は肝予備能が低下すると上昇することから、MnSOD 高値群の HCC は低値群より背景肝の予備能が低下しているため予後不良となる。一方、TRX は肝予備能とは相関せず、肝線維化と逆相関する血小板数と相関した。HCC において TRX は高値となるが、HCC 群において TRX がより高い患者では、HCC 群において TRX が比較的低い患者に比べ肝線維化が進行していないと考えられ、そのような患者では予後は比較的良くなると推測できる。また、HCC 患者において TRX がより高値となるような患者では、TRX による抗酸化作用が十分発揮され、HCC において亢進した酸化ストレスを改善するように作用し、予後が比較的良くなると推測できる。しかし、HCC 群における TRX と血小板数や予後が関連する機序は今回の検討では十分明らかにできていない。症例数も少なく、今後のさらなる解析が必要である。

質問2) TRX は血小板数とどのように関連しているのか。

(回答) TRX が血小板に直接作用するという報告はないが、血小板中には TRX が多く含まれている。

質問3) 肝細胞が ROS の刺激を受けた際におこる細胞死はアポトーシスかネクローシスか。

(回答) HCV などによりミトコンドリアで ROS が産生されると、炎症反応が誘導され、肝細胞は主にネクローシスになると考えられるが、アポトーシスの関連も報告されている。

質問4) 論文に MnSOD は HCC を囲む正常の肝細胞、とくに壊死炎症反応部位に発現するとある。MnSOD 上昇は、HCC による ROS の産生に伴う炎症が原因か、肝組織のネクローシスが原因か。

(回答) 免疫組織学的検討で、MnSOD は HCC 部より周囲非癌部肝実質で発現が高いという報告があり、ROS により酸化ストレスが付加された肝細胞、もしくは壊死した肝細胞から MnSOD が放出されると推測される。

質問5) 論文に MnSOD は、腫瘍サイズより腫瘍数と関連があったと記載しているが、根拠を説明せよ。

(回答) HCC 群において、MnSOD は単発群 (中央値; 82.5 ng/mL) より複数群 (105.0) の方が高値であった。一方、MnSOD は、腫瘍径が 50mm 未満群 (89.1) と 50mm 以上群 (83.8) の比較において差を認めなかった。

質問6) 肝硬変患者において血小板数が減少する機序はなにか。

(回答) 肝硬変による門脈圧亢進を介した脾機能亢進が原因で、血小板の破壊・貧食が顕著になり、血小板数が減少する。また、肝硬変では血小板増殖因子である Thrombopoietin の肝細胞における産生低下も関連すると考えられる。

質問7) MnSOD は多変量解析により予後規定因子として抽出され、有用な予後予測因子と考えられる。一方、TRX は MnSOD と同じ位置づけには無理がある印象を受けた。その点について考えを述べよ。

最終試験の結果の要旨

(回答) 予後の推定には TRX より MnSOD の方が優れていると考えられる。TRX は単独より MnSOD と組み合わせることで、予後の推定をより正確にできる可能性があると考ええる。また、TRX は MnSOD と関連しないことから、MnSOD とは異なる臨床的意義があると推測され、今後さらに症例数を増やして検討する必要がある。

質問 8) MnSOD は予後予測因子としているが、治療法別 (手術、ラジオ波焼灼療法、肝化学塞栓療法等) に解析したか。

(回答) 治療法別に予後は異なる可能性があるが、治療法別の検討は行っていない。

質問 9) MnSOD と TRX ではなく、MnSOD と AFP の組み合わせが良い予後予測になるのではないか。

(回答) MnSOD と AFP が独立した予後予測因子であった。AFP と MnSOD の組み合わせの方が、より良い予後予測になる可能性はあるが、今回は検討していない。

質問 10) MnSOD と TRX のカットオフ値はそれぞれどのようにして決定したか。

(回答) 最も予後を反映する値を統計学的に検索し、カットオフ値を決定した。

質問 11) MnSOD および TRX と血液生化学検査値との相関係数は、単回帰解析か重回帰解析か。

(回答) 本文の相関係数は、いずれも単回帰解析である。重回帰解析は行っていない。

質問 12) MnSOD と TRX はどの細胞において発現が増加することにより、血清濃度が上がっているのか。

(回答) 今回は血清のみでの検討であり詳細は不明であるが、MnSOD は免疫組織学的検討において HCC より周囲非癌部肝実質での発現が高いとの報告があり、非癌部肝組織において上昇していると考えられる。一方、TRX は、正常肝細胞ではなく肝癌細胞にて産生されるとする報告もある。また TRX は血小板からも放出されることが知られている。

質問 13) MnSOD および TRX は、肝細胞の酸化ストレスにより上昇していると考えて良いか。

(回答) HCV 感染による ROS 産生が原因で、感染肝細胞に酸化ストレスが生じて MnSOD および TRX が上昇していると考ええるが、非実質肝細胞からの発現の関与は不明である。

質問 14) インターフェロン (IFN) を投与すると炎症が改善するとしているが、むしろ増悪することはないのか。

(回答) C 型慢性肝炎に対する IFN 治療では、HCV は減少もしくは消失し、肝炎は沈静化するケースが多いが、一部の症例では、肝炎が増悪する事もある。IFN による薬物性肝障害が原因の一つである。

質問 15) HCC 以外の腫瘍で、MnSOD および TRX についての報告があるのか。

(回答) MnSOD は、胃癌、口腔内扁平上皮癌、悪性黒色腫、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌において上昇し、また、TRX は、口腔内扁平上皮癌、舌扁平上皮癌、肺癌、胃癌、大腸癌、前立腺癌において上昇するという報告がある。

質問 16) MnSOD および TRX は腫瘍が存在しなくても値が上昇するのか。

(回答) MnSOD は HCC のない慢性肝疾患 (非 HCC 群) において有意に上昇しており、また、IFN 治療により低下することから、腫瘍が存在しなくても MnSOD は上昇すると考える。一方、我々の検討では TRX は HCC 群のみで上昇していたが、TRX は健常者に比較して HCC のない HCV 関連慢性肝疾患で高値であり、肝線維化が進行するとさらに上昇するという報告があり、TRX も腫瘍が存在しなくても上昇すると考えられる。

質問 17) Child-Pugh スコアと HCC のスコアリングを混合して検討しているが、検討方法として適切であるのか。

(回答) MnSOD の臨床的意義を検討するために、既存の肝予備能を表す Child-Pugh スコアや HCC スコアリングシステムを用いて検討した。これらのスコアはいずれも予後と関連することが報告されているため、混合して検討することは問題ないと考ええる。

質問 18) 2007 年に MnSOD と Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) との関連が報告されている。その論文では、NASH の肝細胞中の MnSOD の活性を評価していたが、MnSOD の活性は NASH 以外の肝疾患でも上昇するのか。

(回答) アルコール性肝硬変、B 型肝硬変等においても上昇するとの報告がある。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。