

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 637 号	学位申請者	伊集院 翔
審査委員	主査	堀内 正久	学位 博士 (医学)
	副査	橋口 照人	副査 西尾 善彦
	副査	上野 真一	副査 東 美智代

主査および副査の5名は、令和4年2月17日、学位申請者伊集院翔君に面接し、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) HCCの病因として非B非Cが増えているが、実際にNAFLD肝癌の実数は増えているか。

(回答) NAFLD患者数の増加、高齢化に伴いNAFLD肝癌患者の割合、実数は共に増加している。

質問2) 高血糖、糖尿病は肝癌の発症にどのように関与しているか。

(回答) インスリン抵抗性、インスリン分泌低下による小胞体ストレスが肝癌発症に関与していると言われている。

質問3) 他の消化器癌細胞株と比較して肝癌細胞株でSPTLC3が高発現していたが、NAFLD由来の株なのか。

(回答) 本研究で使用した肝癌細胞株はNAFLDに特異的な細胞株ではない。悪性黒色腫細胞など消化器以外の癌細胞株での上昇も認めており、HBVやHCVを含めた一般的な肝癌でもSPTLC3は発現していると考えている。

質問4) SPTと肝発癌との関連について、SPT活性によるものか、蛋白量の増加によるものなのか。

(回答) SPT蛋白の増加と共にセラミド合成が促進され、肝発癌に関与していると考えられる。

質問5) SPTLC1とSPTLC2の発現も上昇するか。 (回答) 肝癌細胞株での検討では発現上昇は認めなかった。

質問6) SPTLC3の発現上昇の機序に関して、現在判明している機序はあるか。

(回答) 脂肪毒性が加わることで小胞体ストレスのセンサー蛋白"IRE1"が働き、SPT転写の促進やセラミドの合成促進に関連すると報告されている。

質問7) サンプル採取にあたり、患者の同意はどのように取得したか。

(回答) 入院時に血清及び肝組織採取についても説明し、同意を取得している。

質問8) SPTLC3が肝発癌に関与するファーストヒットとすると、セカンドヒットは何と考えるか。

(回答) 脂肪毒性によるSPTLC3の発現が上昇し、それに伴い合成されるセラミドを含むスフィンゴ脂質は細胞の増殖・分化・アポトーシスに関与すると言われている。これに、患者本人のもつがん抑制因子の脆弱性や上記慢性炎症によるがん遺伝子の増幅や変異などがセカンドヒットとなっているかも知れない。

質問9) NAFLとNASHの患者は進行すると全例発癌するのか。

(回答) NAFLでは発癌を来しにくいと言われている。基本的にNAFL→NASH→肝発癌は連続性の病態だが、NAFL→NASHに進行しない症例もあり、小胞体ストレスの有無などが複合的な要因が関与していると考えられる。

質問10) SPTLC3の変異が肝発癌に関与するか。

(回答) 以前SPTLC3のsiRNAを作成し肝癌細胞株への添加実験を行い、肝癌細胞のcell viabilityが抑制されることを確認した。NASH発癌モデルマウスにおける更なる検討が望ましいと考えられるが、今回行っていない。

質問11) もし、NAFLD HCCをゲノム解析するならば、多くのがんで見られる染色体不安定性群、免疫関連遺伝子発現群や代謝関連遺伝子異常群などのサブグループのうち、代謝関連によるサブグループと考えてよいか。その観点から治療介入としては何が望ましいか。

(回答) 代謝関連と考えている。治療としては生活習慣病の改善が肝癌発症の抑制につながると考える。

質問12) SPTの3つのサブユニットは別々の遺伝子産物か、一つの遺伝子からのスプライスバリエントか。

(回答) SPTLC2とSPTLC3は12個のexonからなる同一の構成を示すが、異なる染色体上に存在する。したがっ

最終試験の結果の要旨

て、SPTLC3 は SPTLC2 のアイソフォームと考えられている。SPTLC1 に関しては検索し得なかった。

質問 1 3) SPT の分子量 480kDa の定義についてどのように考えているか。

(回答) 分子量に単位はないため“molecular weight of 480 kDa”の表記は不適切である。kDa は質量の単位であり、“molecular mass of 480kDa”という表記が正しい。

質問 1 4) SPTLC3 のプロモーターに発癌に関連する分子に共通の転写因子の結合配列が存在するか。

(回答) 発癌が SPTLC3 の発現を亢進するのではなく、脂肪毒性で SPTLC3 の発現が亢進し、セラミドが産生され、発癌をきたすと考えている。

質問 1 5) HCC を有する NAFLD の症例においては必ず強い肝線維化を伴っていると考えてよいか。

(回答) 実際に肝発癌症例では線維化の進行例が多いのは事実だが、実臨床では肝線維化の軽度な症例での発癌例もある。肝の炎症や宿主因子など複合的な要素が肝発癌に寄与すると考えられる。

質問 1 6) SPTLC3 の発現が、肝組織で非癌部が高く、血清では癌合併例で高い根拠はなにか。

(回答) 脂肪毒性を受けた肝細胞が SPTLC3 を発現し、その結果発癌をきたすと考えている (以前の解析で primary hepatocyte に脂肪毒性を与えると SPTLC3 が高発現した)。つまり肝癌自体が SPTLC3 を発現するのではなく、脂肪毒性を受けた肝組織 (非癌部) が発現の主体となっていて、血清中の SPTLC3 価は個体全体としての発癌ポテンシャルを反映しているものと考ええる。

質問 1 7) NAFLD 肝癌が巨大腫瘍で見つかることが多いのは、医療機関で経過観察されていないためか。

(回答) ウイルス性は消化器内科の通院となることが多いが、脂肪肝は病院受診しない人が多いためと考える。

質問 1 8) ヒト血清の解析として ELISA 法を用いたのはなぜか。細胞株や肝癌組織で免疫染色は検討したか。

(回答) 臨床利用を想定し、測定の簡便性を考慮し、ELISA 法を選択した。論文掲載はしていないが以前、肝癌細胞株及び肝癌組織にて SPTLC3 抗体を用いた免疫を行い、SPTLC3 発現を確認した。

質問 1 9) Hep3B が他の肝癌細胞株と比較して SPTLC3 mRNA 発現が低いのはなぜか。

(回答) Hep3B は HBV genome を有しており、HBV の要素が強く脂質代謝との関与が低いため SPTLC3 mRNA があまり上昇しなかった可能性が考えられた。

質問 2 0) mRNA を評価した肝癌組織はどのような検体であったか。 (回答) HCC 摘出検体の凍結組織であった。

質問 2 1) 癌部と非癌部で SPTLC3 mRNA 発現量に差がある症例と差があまりない症例での差異があるか。

(回答) 血清 SPTLC3 濃度と HCC stage との関連について比較したが、あまり有意な特徴は得られなかった。

質問 2 2) ウイルス関連 HCC の SPTLC3 の機能に関して。HCV では血清 SPTLC3 値が高かったがその理由は。

(回答) スフィンゴ脂質は HCV の非構造タンパク質と関連する脂質ラフトの重要な構成要素であり、HCV 複製に重要な脂質である。SPT と HCV 肝発癌との関連に関しては、検索しうる限りでは報告はなかった。

質問 2 3) NAFLD で AFP、PIVKA II の陽性率が低い (50%) が肝癌全体での陽性率は。 (回答) 70~80%程度。

質問 2 4) セリンを肝細胞にかけると SPTLC3 の発現はどうなるか。

(回答) セリン自体の細胞毒性の報告はなく、逆にセリン欠乏により正常なスフィンゴ脂質代謝が機能せず、デオキシスフィンゴ脂質が合成され細胞毒性を発揮する。パルミチン酸は脂肪毒性から IRE1 による SPT の転写促進につながるが、セリン単独で肝細胞に添加しても SPTLC3 の発現はあまり亢進しないと考える。

質問 2 5) APRI では AST をかけているが、AST で割ると SPTLC3 と相関する結果が得られるのではないか。

(回答) ご指摘のとおり、AST が低下に転じる様な高度肝硬変の状態では APRI が低値になる可能性が考えられる。AST を分母に置き、再検討したところ SPTLC3 と正の相関 ($R=0.266$, $P=0.008$) が得られた。

質問 2 6) SPTLC3 などのセラミド代謝に関連する酵素を強制発現 (トランスジェニックマウスなど) した場合、発がんが生じることが報告されているのか。

(回答) in vivo モデルにおいてセラミド増加に関連する発がんの報告はこれまでにない。

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。