



|                     |   |
|---------------------|---|
| Title               | 肝細胞癌の進展における表皮型脂肪酸結合タンパク質の機能解析 [論文内容及び審査の要旨]   |
| Author(s)           | 大平, 将史  |
| Description         | 配架番号 : 2658   |
| Degree Grantor      | 北海道大学   |
| Degree Name         | 博士(医学)  |
| Dissertation Number | 甲第14743号  |
| Issue Date          | 2021-12-24  |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/83876">https://hdl.handle.net/2115/83876</a>                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis   |
| File Information    | Masafumi_Ohira_review.pdf, 審査の要旨  |



## 学位論文審査の要旨

|            |        |       |       |
|------------|--------|-------|-------|
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学） | 氏名    | 大平 将史 |
| 主査         | 教授     | 谷口 浩二 |       |
| 審査担当者      | 副査     | 准教授   | 加藤 徳雄 |
|            | 副査     | 教授    | 平野 聡  |
|            | 副査     | 教授    | 園下 将大 |

### 学位論文題名

肝細胞癌の進展における表皮型脂肪酸結合タンパク質の機能解析  
(Studies on the role of fatty acid-binding protein 5  
in hepatocellular carcinoma progression)

申請者は本研究において、肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)の進展における HCC 組織中表皮型脂肪酸結合タンパク質(Epidermal fatty acid-binding protein, FABP5)と血清中 FABP5 の意義についてヒト臨床検体を用いた解析を行い、そこから得られた結果を元に HCC 細胞株と公共データベースを用いた解析を行なった。それにより、HCC の進展における FABP5 の関与を細胞外・細胞内の両面から包括的に検討している。

まず、ヒト臨床検体を用いた解析により、HCC 組織中 FABP5 発現レベルと血清 FABP5 は、お互いに独立して HCC 患者の予後の増悪に関与していることを示した。また、HCC 細胞株を用いた解析により、細胞内 FABP5 は HCC 細胞の増殖能・遊走能を低下させ、低グルコース環境での細胞生存能を促進していることを示した。そのメカニズムとしては、細胞株と公共データベースの解析結果から、FABP5 の発現による解糖系・ピルビン酸代謝の抑制や、HCC 細胞の幹細胞性の誘導が関与している可能性を示した。

審査は 2 回に分けて行われ、1 回目の審査は主査の谷口教授と副査の平野教授、園下教授により、2 回目の審査は副査の加藤准教授により行われた。

1 回目の審査においては、まず副査の平野教授から、本研究での生存期間解析は正確に HCC の予後を反映しているのか、すなわち他病死による影響は排除しているのかとの質問があった。申請者は、他病死は解析症例の選定の際に除外しているため、本研究における生存期間解析は、HCC 特異的なものであると回答した。次に、本研究においては、FABP5 と糖尿病に比較的強い関連性が見出されているが、その糖尿病の有無の基準はどの様に決めたかとの質問があった。申請者は、症例データベースの既往歴や採血データを確認し、現在の糖尿病の診断基準に照らし合わせて決定したと回答した。さらに平野教授から、細胞株の解析では外因性 FABP5 の影響が小さいとの結果であるが、血清 FABP5 は HCC 細胞への影響はないとの解釈でよいのかとの質問があった。それに対し申請者は、血清 FABP5 の生存率に対する影響を考慮すると、血清 FABP5 が HCC 細胞のなんらかの機能に影響を及ぼしている可能性は十分にあると考えられ、そのメカニズムとしては、細胞内への外因性 FABP5 の取り込みが少量であったことを考慮すると、サイトカイン様の作用を有している可能性を考えていると回答した。

次に副査の園下教授から、研究の現段階では血清 FABP5 は HCC 患者の予後を増悪させる、すなわち予後増悪因子であると言うことはできないのではないかと指摘があった。申請者は、確かに現状では血清 FABP5 の上昇が、単なる予後予測マーカーに過ぎない可能性は否定できないため、今後その因果関係を解明する実験を検討すると回答した。また、リコンビナント FABP5 の細胞株への投与濃度の 100ng/ml はどの基準で決めたのかとの質問があり、申請者は、臨床検体（血清）の解析結果を参考に決定したと回答した。さらに、外因性 FABP5 の細胞株への取り込み実験では、

なぜ FABP5 ノックアウト細胞の蛍光強度がゼロではないのかとの質問があった。それに対し申請者は、蛍光強度の測定において細胞の自家蛍光やバックグラウンドの蛍光を拾ってしまっていることが原因であると回答した。また、消化器外科 I からの既報で、FABP5 が HCC 細胞の増殖を促進し上皮間葉転換に関与するという報告があったが、本研究結果と齟齬がある様に思えるとの指摘があった。申請者はその理由として、既報においては FABP5 のノックダウンで実験を行っており、本研究においては FABP5 のノックアウトを用いている違いに起因する可能性があるとは回答した。また本研究結果から得られた、FABP5 が HCC 細胞の幹細胞性に関与している可能性を考慮すると、上皮間葉転換の誘導との関連も矛盾はしないと考えられるとは回答した。最後に、臨床検体の解析において外れ値を除外するのは妥当であるのかとの指摘があった。それに対し申請者は、一般的な外れ値の基準よりも広い基準で外れ値を同定しており、その基準で同定されたものは検体の不良な保管状態に起因するものであると考えているとは回答した。しかし、園下教授から、それらが外れ値であるとの確証は無いため、それらを含めた解析に修正するべきであるとの指摘があった。

次に、主査の谷口教授から、クローン原性細胞生存アッセイで、FABP5 野生型細胞と Empty vector を導入した細胞で実験結果に比較的大きな差があると考えられるが、どの様に考察するかとの質問があった。申請者は、FABP5 野生型細胞と FABP5 ノックアウト細胞を解析したプレートと、Empty vector を導入した細胞と FABP5 安定高発現細胞を解析したプレートは別々で、それらを行った時期も違うことから、播種細胞数や培養状態の違いが生じ、それが実験結果に影響を及ぼしている可能性があるとは回答した。次に、公共データベースの解析と一つの細胞株のデータの解析の比較で出た矛盾に関して深く考察する意義は大きくないのではないかと指摘があり、申請者は、今後複数の細胞株での解析を計画しているとは回答した。最後に、前立腺癌においては FABP5 阻害剤の治療効果を報告した論文があるが、HCC においてはその治療に関してはどの様に考えるかとの質問があった。申請者は、HCC においても同様に FABP5 の阻害による治療効果は見込めるが、FABP5 は FABP family の中で最も広い組織で発現しているため、他の組織への影響を見極める必要があるとは回答した。それに対して谷口教授は、FABP5 の阻害による不利益は現状では報告されておらず、むしろ耐糖能異常の改善などにもつながるため、全身投与による利益は大きいのではと指摘した。

2 回目の審査においては、副査の加藤准教授から、既に組織中 FABP5 は HCC 患者の予後増悪因子ということが以前の研究で示されているが、その知見が現在の実臨床における治療方針に影響しているかとの質問があり、申請者は、現状では実臨床では FABP5 の解析はしてはいないと回答した。また、生存期間解析において、糖尿病を有さない群では血清 FABP5 の高値群・低値群間に有意差があったのに対し、糖尿病を有する群では有意差がなかったのはどの様に考えるかとの質問があった。それに対して申請者は、糖尿病を有さない症例においては元々の予後が良いため、血清 FABP5 の予後に与える影響が強く出た可能性が考えられるとは回答した。さらに、加藤准教授から、FABP5 と FABP4 はお互い同じ様な機能を果たしていると考えられるが、公共データベースの解析においては FABP4 では高発現群で生存率が悪い傾向にあることはどの様に考えるかとの質問があった。申請者は、マウスモデルにおいては FABP5 と FABP4 は互いに代償関係にあるとの報告があることから、FABP5 高発現症例では FABP4 の発現が低下しており、逆に FABP5 低発現症例では FABP4 が高発現している可能性があるため、それが FABP4 低発現症例での予後の増悪につながっている可能性が考えられるとは回答した。最後に、今回の解析は、外科的に切除可能であった症例のみの解析であるため、切除不能症例においても FABP5 は HCC において同じ様に關与していると考えられるかとの質問があった。それに対し申請者は、切除不能 HCC 症例においても同様に血清 FABP5 や HCC 細胞内 FABP5 が患者予後の増悪に寄与している可能性は十分に考えられるため、今後、切除不能 HCC 症例の血清や HCC 中の FABP5 の解析も臨床研究として検討したいとは回答した。

この論文は、HCC 患者において、組織中 FABP5 のみならず血清 FABP5 もその予後において重要な因子であることを明らかにし、さらに、HCC 細胞内においては FABP5 が低栄養ストレス環境下での生存能増強に寄与している可能性を明らかにしたことが評価される。今後、血清と HCC 組織中 FABP5 の両面からのアプローチによる HCC の治療開発に発展していくことが期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。