



Title	18F-fluorodeoxyglucose/18F-fluoromisonidazole-PETを用いた膠芽腫における低酸素下糖代謝の重要分子を探索する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	岡本, 迪成
Description	配架番号 : 2683
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14939号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85747
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	OKAMOTO_Michinari_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 岡本 迪成

学位論文題名

^{18}F -fluorodeoxyglucose/ ^{18}F -fluoromisonidazole-PET を用いた膠芽腫における低酸素下糖代謝の重要分子を探索する研究

(Studies on exploration a potent key molecule of hypoxic glucose metabolism of glioblastoma derived from the depiction of ^{18}F -fluoromisonidazole and ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography)

【背景】WHO grade IV に分類される膠芽腫は 5 年生存率は未だに 10%程度と予後不良である。我々は過去に膠芽腫に対し、 ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG)-PET と ^{18}F -fluoromisonidazole (FMISO)-PET を用いて糖代謝と低酸素状態を評価し、低酸素下糖代謝亢進が予後不良因子であることを示した。しかし、糖代謝や低酸素に関する分子発現については未解明だった。本研究は、術前 FDG/FMISO PET で評価された膠芽腫の摘出検体を用い、低酸素下糖代謝の key molecule を探索しバイオマーカーたり得るかを検証することを目的とした。

【対象と方法】2008 年から 2017 年の期間に FDG-PET および FMISO-PET で術前に評価した膠芽腫 33 例を対象とした。凍結検体から抽出した messenger RNA (mRNA) を用い reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)によって低酸素と糖代謝に関わる分子として glucose transporter (GLUT)1, GLUT3, glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC)1, G6PC2, G6PC3, hexokinase (HK)1, HK2, Hypoxia inducible factor (HIF)-1 α , HIF-2 α , CA IX, さらに proliferation cell nuclear antigen (PCNA), vascular endothelial growth factor (VEGF)の遺伝子発現を評価し、各 PET 核種の集積の半定量値(病変-正常脳比, LNR: lesion-to-normal ratio) との関連を調べた。また HIF-1 α については免疫組織学的染色を行い、蛋白発現と FMISO 集積の半定量評価も行った。続いて、膠芽腫の細胞株(U87MG, U138MG)を用いて低酸素下培養を行い、低酸素下で発現が亢進していた分子に関して、通常環境下培養細胞との比較を行うことで、遺伝子発現の変化を検証した。さらに上記過程から探索された分子について、予後の判明している患者群で検証した。まず当院で治療された上記 33 例以外の膠芽腫患者で、肉眼的全摘出が達成された後に一般的な標準治療を受けた患者群にもかかわらず、全生存率 (Overall survival; OS) が 1 年以下の予後不良群と、3 年以上の予後良好群の 2 群間で同分子の遺伝子発現を評価した。術中採取された凍結検体を用いて抽出された mRNA を用いて遺伝子発現を 2 群間で比較した。続いて米国のデータベースである The Cancer Genome Atlas (TCGA) を利用し、同分子の遺伝子発現が明らかになっている患者間の OS を含む臨床情報を用いて予後を解析した。

【結果】HIF-1 α に関しては、FMISO PET の集積を反映したのは遺伝子発現より、むしろ免疫染色による蛋白発現だった。免疫組織学的染色による HIF-1 α の核の染色の割合をスコア化し評価したところ、病変部の FMISO 集積の LNR と有意に相関していた (P=0.004)。続いて病変部の FDG 集積と糖代謝関連分子の遺伝子発現に関して評価したところ、FDG の

LNR は糖代謝に関与する HK2, G6PC3 の発現と正に相関した。(HK2: P=0.03, G6PC3: P=0.021) また、病変部の FMISO 高集積群(≥ 2.0)において、G6PC3 と GLUT1 の mRNA が低集積群 (< 2.0) と比較して多く発現していた(GLUT1 : P=0.04, G6PC3 : P=0.01)。これらの結果から、低酸素下で糖代謝が亢進している組織に G6PC3 の mRNA 発現が高いことが示唆された。これは①低酸素下で糖代謝亢進したことから G6PC3 の mRNA 発現が亢進する可能性と②G6PC3 の mRNA 発現により低酸素下の糖代謝が亢進する可能性が考えられた。この検証として膠芽腫細胞株を用いて通常環境下培養と低酸素下培養のそれぞれの遺伝子発現を比較した。低酸素暴露の妥当性は前述の通り抗 HIF-1 α 抗体を用いた免疫染色により確認した。その結果、低酸素環境下培養の方が、通常環境下培養に比べ G6PC3 が mRNA 高発現した。このことより、膠芽腫細胞においては、低酸素環境下にさらされることが G6PC3 の発現が亢進を惹起することが推測された。上記検討から膠芽腫組織内での G6PC3 発現亢進が低酸素内糖代謝亢進における重要分子である可能性が示唆された。そこでこの G6PC3 の発現亢進が膠芽腫におけるバイオマーカーとなりうるかに関して検証した。まず当施設の膠芽腫症例を用い、予後不良群と予後良好群で G6PC3 の mRNA 発現について比較したところ予後不良群で有意に G6PC3 の遺伝子発現が亢進していた(予後良好群: 中間値 0.88, n=8; 予後不良群: 中間値 1.40, n=9; P<0.05)。TCGA のデータ解析を行い、G6PC3 mRNA 発現について中間値をカットオフに高発現群と低発現群で OS について log-rank 検定し、G6PC3 高発現群(n=84) は低発現群(n=83)に比べ有意に OS が短縮していた(P=0.008)。

【考察】 FMISO PET の半定量値と低酸素関連の遺伝子発現の定量評価による相関を解析したところ、蛋白発現がより正確な評価となり得ることが示された。続いて膠芽腫では FDG 集積亢進する組織、FMISO 集積亢進する組織のそれぞれで G6PC3 の発現が亢進していた。また膠芽腫細胞株においては低酸素下培養で G6PC3 の遺伝子発現が亢進することが示された。これらから G6PC3 が、膠芽腫において低酸素下で糖代謝が亢進した部分で高く発現していることが示唆された。G6PC3 は Glucose 6 phosphatase(G6Pase)のサブアイソフォームであり低酸素との関連はこれまで報告が少ない。低酸素では解糖系が亢進する一方、糖新生は抑制されるという報告もあるが、本研究では解糖系の亢進とともに糖新生が亢進している可能性を示唆した。最後に G6PC3 高発現の予後との関連について、自施設例のみならず米国のビッグデータでも有意差を持って OS との関連が確認され、予後不良因子のバイオマーカーとなる可能性があった。本研究の問題点として腫瘍の不均一性により組織内の mRNA 発現が一定しない可能性がある。腫瘍検体の採取部位の検証が不十分であること、核医学評価部位との不一致の可能性やサンプル数が少ないことも挙げられた。最後に低酸素による G6PC3 誘導が治療抵抗性に関してどのように関与しているかどうかに関して、追加機能解析をもって実証されるべきで本研究ではその解明に至っていない点が考えられた。

【結論】本研究では膠芽腫における FDG/FMISO PET の集積と G6PC3 の遺伝子発現の関連が示唆され、細胞株培養において低酸素環境下で GLUT1 とともに G6PC3 の遺伝子発現が亢進したことから G6PC3 の遺伝子発現は低酸素下糖代謝の重要分子である可能性が示された。また、膠芽腫において G6PC3 発現が全生存率と有意に関連していたことから、予後予測因子になる可能性も示された。