



| | |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title | 肝細胞癌における癌微小環境を構成する癌関連線維芽細胞に関する研究 [論文内容及び審査の要旨] |
| Author(s) | 加藤, 紘一 |
| Description | 配架番号 : 2754 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第15436号 |
| Issue Date | 2023-03-23 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/89883 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | KATO_Koichi_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 加 藤 絃 一

| | | | |
|-------|----|-----|-------|
| | 主査 | 教授 | 谷口 浩二 |
| 審査担当者 | 副査 | 准教授 | 加藤 徳雄 |
| | 副査 | 准教授 | 七戸 俊明 |

学位論文題名

肝細胞癌における癌微小環境を構成する癌関連線維芽細胞に関する研究
(Studies on cancer-associated fibroblasts that constitute the tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma)

申請者は、肝細胞癌の癌微小環境における癌関連線維芽細胞 (CAFs) が癌悪性化の関与について、初代培養細胞を作製して検討した。初めに、肝細胞癌切除検体より CAFs と NFs を初代培養し、馴化培地 (CM) を作製した。それらを肝癌細胞株と培養すると、NFs の CM に比べて CAFs の CM で有意に増殖・遊走・浸潤能を亢進することを示した。続いて、同一患者から作製した CAFs と NFs を用いて、網羅的プロテオーム解析 (LC-MS/MS) を行い、CAFs に Versican が高発現していることを明らかにした。また Versican の免疫染色を行い、癌部の上皮と間質をそれぞれ評価すると、間質 Versican 高発現群では低分化・脈管侵襲陽性例が有意に多いことを示した。間質 Versican 高発現群では有意に全生存期間・無再発生存率も低く予後不良であり、独立した予後予測因子であることを見出した。さらに CAFs の Versican の発現は未分化肝癌細胞株との共培養では発現が上昇するが、高分化肝癌細胞株との共培養では変化がないことを確認した。最後に siRNA を用いて Versican をノックダウンすることで、肝癌細胞株の遊走・浸潤能が抑制されることを確認し、肝細胞癌の新たな治療につながる可能性を示した。

審査にあたりまず副査の加藤准教授より、組織免疫染色のスコアリングが二人で異なった場合について質問があり、申請者はスコアリングが一致しなかった症例については二人で相談した結果を採用したと回答した。次に、組織免疫染色でのカットオフ値の算出法について質問があり、申請者は全ての値で計算し最も有意差のついた値にしたことを回答した。次に、組織免疫染色では傾向スコアマッチングは実施したかについて質問があり、本研究では検討しておらず今後の検討課題であると回答した。次に、多変量解析において上皮 Versican は多変量解析の項目に含めていないので、上皮 Versican は独立した予後規定因子ではないと言えるのかについて質問があり、申請者は予後規定因子ではないとは言えず、該当する箇所を修正すると回答した。次に、 Kaplan-Meier 曲線の図に Number at Risk が表記されていない点、5 年生存率と 5 年無再発生存率の数値が記載されていない点について質問があり、申請者は修正すると回答した。次に、CAFs を標的にした治療は現段階で報告があるのかについて質問があり、申請者はヒトに対する報告はなく動物実験レベルのみであると回答した。最後に、進行した肝細胞癌の場合は組織が取れない

ことが多く、Versican を標的とした治療をどのように選択するかについて質問があり、申請者は血液中の Versican の濃度を測定することができる可能性があるとして回答した。

次に副査の七戸准教授より、CAFs を初代培養の際に癌細胞などはどのように取り除いたかについて質問があり、申請者は細胞混濁液をそのまま継代することで癌細胞などは死滅していき線維芽細胞のみになったと回答した。次に、CAFs の起源は解っていないが元々肝臓にあった線維芽細胞であるのかについて質問があり、申請者は骨髄細胞がリクルートされたもの、癌細胞や血管内皮細胞が間葉転換されたものであるという報告があると回答した。移植患者の CAFs を調べることで起源につながるのではないかと助言があった。次に、共培養の実験で差が出る原因となる癌細胞から分泌されるものについて質問があり、申請者は報告では線維芽細胞の活性化に関与する TGF- β があるが、それ以外のサイトカインについても可能性はあると回答した。最後に、上皮と間質の定義がわかりにくいと指摘があり、全て修正すると回答した。

最後に主査の谷口教授より、肝細胞癌の場合、背景肝自体が慢性炎症を起こしているが非癌部の線維芽細胞が正常な線維芽細胞であるかについて質問があり、細胞免疫染色でも FAP 陽性の線維芽細胞が確認されたことから非癌部の線維芽細胞も正常ではなく活性化している可能性があるとして回答した。次に、Versican を治療標的とした場合、今後どのような方法があるのかについて質問があり、Versican は正常組織には発現が少なく十分な治療標的になるが、中和抗体など作製し動物実験などが必要であると回答した。次に、スプライスバイアランスで分子量の違いからウェスタンブロットで検出できるのかについて質問があり、本研究ではターゲットのバンドのみ確認したが、それ以外の分子量でもバンドは検出されていたが検討していないと回答した。次に、siRNA で mRNA レベルでは発現低下しているがタンパク質レベルでの低下していないことについて質問があり、Versican は分子量が大きいので mRNA レベルが低下してもタンパク質の分解がされていない可能性について回答した。次に、Versican は Kupffer 細胞で発現しているが今回検討しているのかについて質問があり、非癌部での発現は確認できたがマクロファージの染色をしておらず癌組織内では確認できなかったと回答した。次に、血液中の Versican の測定について、血中濃度で判断すると上皮か間質の Versican 由来かがわからないのではないかと助言があった。次に、ヘテロな CAFs な集団について質問があり、今回の初代培養方法では増殖能が高い CAFs のみがセレクションされてしまっているため、今後シングルセル解析をすることで精査できると回答した。次に、細胞免疫染色で Hep-Par1 のポジティブコントロールについて質問があり、本研究ではポジティブコントロールが無かったと回答した。最後に、学位論文中の考察で、今後の実験において癌微小環境での細胞間相互作用を検討するためにオルガノイドを使用すると記載があるが、この実験では不適であると助言があり、修正すると回答した。また学位論文に関する誤字・図について指摘があり、全て修正すると回答した。

この論文は肝細胞癌検体より CAFs と NFs を初代培養し、LC-MS/MS で CAFs に Versican が高い発現していることを示し、CAFs から分泌される Versican は肝癌細胞の遊走・浸潤能の亢進などの癌悪性化に関与している可能性を示した点において高く評価され、今後の肝細胞癌における新たな治療法への発展に寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院博士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。