

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域消化器外科学教育研究分野 神田大周
<p>Heterogeneity of metabolic adaptive capacity affects the prognosis among pancreatic ductal adenocarcinomas</p> <p>(代謝適応能力の不均一性が膵管腺癌の予後に影響を与える)</p>	
<p><b>【背景】</b></p> <p>膵管腺癌（PDAC）は極めて予後不良な癌であり、予後の改善は世界的課題である。特に、腫瘍マーカーである carbohydrate antigen 19-9（CA19-9）高値膵癌は、遠隔転移と根治手術後の再発が多いため、新規治療戦略の確立が必要である。しかしながら、その背景の分子機構については未だ不明な点が多い。一般に、癌の進展には高いエネルギー需要があり、低酸素状態や低栄養状態でも十分なエネルギー供給を必要とする。このエネルギー獲得のために行われる代謝の適応は代謝リプログラミングと呼ばれ、癌細胞の特徴として知られている。代謝リプログラミングと PDAC の臨床経過との関係は解明に至っていない。本研究では、CA19-9 の多寡による PDAC の代謝適応能力の違いを明らかにすることを目的とした。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>弘前大学医学部附属病院で 2007 年から 2018 年の間に切除可能 PDAC に対して根治的膵切除術を受けた術前化学療法実施例を除く 128 例を対象とした。術前 CA19-9 の値によって、Normal 群（CA19-9：&lt;38 U / mL）、Low 群（CA19-9：38– 100 U / mL）、Intermediate 群（CA19-9：101– 500 U / mL）、High 群（CA19- 9：&gt; 500U / mL）の 4 グループに分類し、臨床学的特徴と手術関連因子について比較した。続いて、プロテオミクス解析のため、外科切除標本から膵実質組織を採取し、Low 群 15 例、High 群 15 例、全グループの非腫瘍部分 33 例において液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC– MS / MS）を行った。プロテオミクスデータからパスウェイ解析（QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis, QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA）を行った。</p> <p><b>【結果】</b></p> <p>128 例のうち、Normal 群 46 例（35.9%）、Low 群 24 例（18.8%）、Intermediate 群 34 例（26.6%）、High 群 24 例（18.8%）であった。グループ全体の臨床学的特徴と手術</p>	

関連因子を比較したところ、CA19-9 以外の腫瘍マーカーにも有意差が認められた。手術関連因子に有意差は認めなかった。術後 CA19-9 値も一貫してグループ間で有意差が認められた。病理学的特徴の比較では、High 群で腫瘍径が有意に大きく、局所浸潤因子の割合が高かった。門脈および動脈浸潤の割合はグループ間で同等であった。術後成績では、短期成績はグループ間で有意差は認めないものの、術後再発の割合が High 群で有意に高く、肝再発が特徴的であった。また、RFS および DSS は High 群で有意に短かった。

続いてプロテオミクスの解析を行った。Low 群 15 例、High 群 15 例、全グループの非腫瘍部分 33 例の LC-MS / MS の結果、1060 種類のタンパクが同定された。非腫瘍群と Low 群の比較を行ったところ、1060 種類のタンパクのうち 358 種類 (33.8%) に有意な発現差が認められた。非腫瘍群と High 群の比較では、1060 種類のタンパクのうち 373 種類 (35.2%) に有意な発現差が認められた。各比較においてのみ特異的に認められたタンパクは、それぞれ、358 種類のうち 60 種類、373 種類のうち 75 種類のタンパクが同定された。

非腫瘍群と High 群の比較において特異的であった 75 種類のタンパクを用いてパスウェイ解析を行ったところ、解糖系が最も有意に濃密なパスウェイであった。種々の癌の予後不良と関連がある解糖系酵素として知られる enolase 2 (ENO2) の発現について、免疫染色により評価を行った。非腫瘍群と Low 群の腺管では、ENO2 は弱い発現を示したが、High 群の腺癌の細胞質および間質では強い発現を示し、Low 群と比較して有意に ENO2 の発現が亢進していた。

解糖系を亢進させる因子について評価を行った。解糖系は低酸素条件下で亢進することが知られているため、低酸素条件下で誘導される hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) の免疫染色を行った。HIF-1 $\alpha$  の発現は Low 群の腺癌の細胞質と間質に認められ、一方で High 群では Low 群より弱い発現を示した。このことから、High 群で認められた解糖系の亢進は低酸素応答に依存していないことが示唆された。

Low 群と High 群におけるパスウェイ解析の結果の違いを体系的に捉えるため、358 種類および 373 種類の全タンパクを用いて評価を行った。Low 群では 92 の有意に濃密なパスウェイが認められ、High 群では 82 の有意に濃密なパスウェイが認められた。それぞれのパスウェイを比較したところ、High 群では、細胞増殖や遊走を含む癌の進展に関連するパスウェイがより濃密であった。さらに、解糖系に加えて、タンパク質合成 (EIF2 signaling) や脂質代謝 (Xenobiotic Metabolism AHR Signaling Pathway) などの代謝に関連する様々なパスウェイが High 群でより顕著であった。

EIF2 signaling はタンパク恒常性において重要であることが知られており、eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) の  $\alpha$  サブユニットのリン酸化は、全般的な翻訳を抑制し、タンパク合成を抑制的に調節する。リン酸化 eIF2 $\alpha$  の発現を評価するため、免疫染色

を行ったところ、非腫瘍群で最も強い発現を示した。High 群では Low 群より有意な発現低下が認められ、タンパク合成の減少がないことが示唆された。

eIF2 $\alpha$  がリン酸化されると、全般的な翻訳抑制の一方で、activating transcription factor 4 (ATF4) の翻訳のみが促進され、ATF4 はアミノ酸代謝関連遺伝子の転写を促進することにより、アミノ酸代謝を調節する。同様に ATF4 の免疫染色を行ったところ、High 群では Low 群より有意な発現低下が認められた。

代謝関連パスウェイの変化をさらに分析した結果、Low 群と High 群の間で、炭水化物、タンパク質、アミノ酸、脂質、核酸などの様々な代謝プロセスの不均一性が認められた。

### 【結語】

本研究では、根治的膵切除術が施行された切除可能 PDAC の膵組織を用いたプロテオミクス解析により、CA19-9 高値 PDAC と CA19-9 低値 PDAC の代謝状態の違いを包括的に捉え、代謝適応の不均一性が PDAC の進展と予後不良に関与することを明らかにした。CA19-9 は PDAC へのエネルギー供給のための代謝適応能力を推定するのに役立つことが示唆され、代謝を標的とする治療戦略の確立には、個々の代謝状態の不均一性が考慮されるべきであることが示唆された。