The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Fructose-bisphosphate aldolase A is a key regulator of hypoxic adaptation in colorectal cancer cells and involved in treatment resistance and poor prognosis
Author(s)	河合, 賢二
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/70665
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）河合　賢二

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	森　正樹
	副　査	大阪大学教授	小川和彦
	副　査	大阪大学教授	竹原徹郎

論文審査の結果の要旨

本研究では、癌の微小環境において悪性度を司る特徴の一つである低酸素に注目して確立した、大腸癌肝転移巣を用いた大腸癌のin vivoにおける低酸素モデルを用いたMicroarrayの結果から、癌においてその意義が重要であることが知られる解糖系に関与する遺伝子としてFructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA)に着目した。

大腸癌患者の予後解析において、ALDOAの高発現群は低発現群に比して優位に予後が不良であった。また、ALDOAをノックダウンさせた大腸癌細胞株では細胞増殖性・治療抵抗性・細胞浸潤能の低下が見られ、ALDOAの強制発現株では全て逆の結果が得られた。さらに、低酸素培養を使用した細胞実験の結果、ALDOAの発現は上皮間葉転換・解糖系活性・アポトーシス・細胞周期と関連していることが示唆された。

ALDOAが大腸癌の新規予後因子となり得ることを示し、その悪性度と関与する機序の一部を明らかにした本研究は、ALDOAが有用な新規治療標的となる可能性が示唆するもので、学位の授与に値すると考えられる。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	河合　賢二
論文題名 Title	Fructose-bisphosphate aldolase A is a key regulator of hypoxic adaptation in colorectal cancer cells and involved in treatment resistance and poor prognosis　(ALDOAは大腸癌細胞の低酸素応答の重要な制御因子であり、治療抵抗性や予後不良に関与する)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

低酸素は、癌の微小環境において悪性度を司る重要で基本的な特徴の一つであり、癌の治療抵抗性や予後などと関与することが知られている。癌と低酸素に関してはこれまでも様々な研究がなされているが、未だに癌の悪性度と低酸素の関係について分子レベルでの詳細なメカニズムは解明されるに至っていない。その原因の一つとして、通常行われるin vitro実験系では低酸素の度合い、低酸素暴露の期間、pH、さらに複雑な細胞間相互作用などin vivoでの状況を完全に再現できないことが考えられる。そこでわれわれはin vivoにおける低酸素モデルとして腫瘍辺縁部から内部にかけて段階的に整然と血管密度の低下する大腸癌肝転移巣に着目し、中心部低酸素領域と辺縁部非低酸素領域とを低酸素マーカーとしてCarbonic anhydrase 9 (CA9)を利用した免疫染色結果を指標にLaser Capture Microdissectionにてそれぞれ採取し、mRNAの発現をMicroarrayにて比較した。同モデルを大腸癌新規予後関連因子の検索モデルとして確立し、その有用性を報告してきた(Uemura M, Clin Cancer Res.2010)。一方で癌は、Werburg効果と呼ばれる正常細胞より解糖系に強く依存した特異的な糖代謝を営んでおり、癌の治療標的として解糖系酵素が注目されている。本研究では、低酸素モデルから解糖系に関与するFructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA)に着目し、大腸癌における臨床学的意義および機能を明らかにすることを目的とした。

〔方　法(Methods)〕

低酸素モデルにおいて中心部低酸素領域にて発現が亢進していたALDOAを癌の悪性度に関与する低酸素誘導遺伝子の候補として選択した。まず、大腸癌切除検体6例から癌部と非癌部(正常粘膜)を採取し、ウェスタンブロットでALDOAの発現量を測定した。次に、別の大腸癌切除検体（n=222）を用いて、SCGB2A1のmRNA発現レベル（高発現群 n=111、低発現群 n=111）と、臨床病理学的因子、disease-free survival (DFS) および overall survival (OS)との関係を検討した。in vitro実験では大腸癌細胞株（DLD-1, HT29, KM12SM）を用いて低酸素培養によるALDOAの発現変化を検討した。また、siRNAを用いたRNA干渉によりALDOAをノックダウンし（KD群）、増殖性・治療抵抗性・浸潤能についてコントロール群（NC群）と比較した。治療抵抗性の評価には化学療法としては大腸癌のkey drugである5-fluorouracil (5-FU)とoxaliplatin (L-OHP)を用い、放射線治療は8Gyの1回照射とした。さらに、ALDOAの機能解析のため、通常酸素・低酸素の両条件下で、両群で乳酸産生試験、上皮間葉転換（EMT）タンパクの評価（ウェスタンブロット・PCR）、アポトーシス・ROS産生・細胞周期解析（FACS）を行なった。

〔成　績(Results)〕

ALDOAは6症例中5症例において、癌部において非癌部よりタンパクレベルでの発現が亢進していた。DFSおよびOSに関しては単変量解析の結果、ALDOA高発現群は有意に予後不良であり（P =0.0008 and P =0.0072, respectively）、多変量解析においてALDOAは独立予後因子であることがわかった（RR=2.01, P =0.0013, and RR=2.71, P =0.0124, respectively）。In vitro実験では、大腸癌細胞下部では、低酸素培養によりALDOAの発現が有意に上昇した。また、KD群で増殖性が有意に低く、5-FUおよびL-OHPの投与、または放射線照射に対する細胞生存率は、KD群で有意に低下していた。次に、浸潤能はKD群で有意に低下していることが示された。またKD群は、乳酸の産生が低下しており、解糖系の活性が抑制されていた。さらに、通常酸素・低酸素のいずれの条件下においても、E-cadherinの発現は上昇し、Vimentinの発現が低下していた。加えて、KD群ではアポトーシス細胞、ROS陽性細胞、細胞周期のG0/G1比がそれぞれNC群より増加していた。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究により、ALDOAは大腸癌の新規予後因子となり得ることが示唆された。また、ALDOAは解糖系の活性・EMT・細胞周期と密接に関係しており、癌細胞の増殖性・治療抵抗性・浸潤能に関与していることが示された。以上より、ALDOAが有用な新規治療標的となる可能性が示唆された。