

Title	Esophageal squamous cell carcinoma with low mitochondrial copy number has mesenchymal and stem-like characteristics, and contributes to poor prognosis
Author(s)	益池, 靖典
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/70666
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 益池 靖典

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授 土岐 祐一
	副 査	大阪大学教授 石井 真一
	副 査	大阪大学教授 猪俣 孝典

論文審査の結果の要旨

ミトコンドリアは細胞質に存在する小器官で、独自のDNA (mtDNA) を持ち、1細胞あたり数百～数千のミトコンドリアが存在する。近年、ミトコンドリアがさまざまな疾患に関わっていることが報告されており、我々は食道扁平上皮癌においてmtDNAコピー数と臨床病理学的特徴、悪性度との関連を検証した。当院で根治的食道切除術を施行した食道扁平上皮癌症例80例のFFPEを用いて、mtDNAコピー数を測定した結果、うち20例の検討で癌部では非癌部よりコピー数が減少しており、癌部80例の検討でコピー数低値群はpT、pStageが進行していた。予後解析では、低値群で有意に5年生存率が不良であり、mtDNAコピー数は、pTと並んで独立予後因子であった。細胞実験 (TE8、TE11) では、sh-RNAによるTFAMのknockdownを行い、mtDNAコピー数減少食道扁平上皮癌細胞 (mtdep細胞) を樹立した。mtdep細胞は増殖速度が低下するものの低酸素環境への耐性を認めており、さらに浸潤能・遊走能・腫瘍形成能が増強していた。以上の結果から、食道扁平上皮癌においてmtDNAコピー数低値は腫瘍の進行に寄与することが示唆された。

上記研究内容について、博士 (医学) の学位授与に値するものと認める。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	益池 靖典
論文題名 Title	Esophageal squamous cell carcinoma with low mitochondrial copy number has mesenchymal and stem-like characteristics, and contributes to poor prognosis (ミトコンドリアDNAコピー数が減少した食道扁平上皮癌は間葉系細胞、幹細胞様の性質を有し、予後を増悪させる)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>食道癌は東アジアで罹患率が高く、組織型としては扁平上皮癌が多い。食道扁平上皮癌は予後不良な癌であり、生物学的悪性度が高いと考えられるが、そのメカニズムについては十分に解明されていない。ミトコンドリアは細胞質に存在する小器官で、独自のDNA (mtDNA) を持ち、1細胞あたり数百～数千のミトコンドリアが存在すると言われているが、近年、ミトコンドリアが老化や神経疾患、癌などさまざまな疾患に関わっていることが報告されている。癌におけるmtDNAコピー数変化や、その生物学的意義に関してはいまだ十分に解明されておらず、我々は食道扁平上皮癌におけるmtDNAコピー数と臨床病理学的特徴、悪性度との関連を検証することとした。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
① 食道扁平上皮癌臨床検体におけるmtDNAコピー数解析と臨床病理学的情報・予後との関係：	
<p>当院で2002年4月～2014年7月に術前未治療で根治術を施行した食道扁平上皮癌80例の切除標本 (FFPE) について、Laser microdissectionにより癌部のDNAを抽出し、リアルタイムPCR法でmtDNA特異的に存在するCO1遺伝子と核DNAの比よりmtDNAコピー数を測定した。うち20例について非癌部食道粘膜のmtDNAコピー数と比較したところ、癌部では56.0% (37.4-234.5%)まで有意に減少していた ($p<0.01$)。癌部80例について、中央値をカットオフ値としてmtDNAコピー数と臨床病理学的情報との関係を検討したところ、mtDNAコピー数低値群で有意に病理学的深達度 (pT, $p=0.045$) 及び病理学的病期 (pStage, $p=0.025$) が進行していた。また、統計学的有意差はないものの、静脈侵襲が多い傾向が見られた ($p=0.076$)。予後解析では、低値群で有意に5年生存率が不良であり (全生存: 31.5% vs 68.4%, $p<0.01$)、mtDNAコピー数は、pTと並んで独立予後因子であった ($p=0.019$)。</p>	
② 食道扁平上皮癌細胞株を用いたmtDNAコピー数と腫瘍悪性度との関連解明 (in vitro)：	
<p>我々は先行報告を参考にしてミトコンドリア転写因子A (TFAM) をshRNAでknockdown (KD) したところ、mtDNAコピー数はコントロール細胞と比較して食道扁平上皮癌細胞株TE8で約40%、TE11で約60%まで有意に減少した。TFAM-KD細胞では、解糖系の亢進により乳酸産生が有意に増加していた。光学顕微鏡による観察では、上皮間葉転換の特徴とされる紡錘状の形態変化をきたしており、透過型電子顕微鏡による観察では、他報告で抗癌剤耐性株の特徴として報告されているミトコンドリアの膨化及びクリステ構造の消失を認めた。このTFAM-KD細胞について、癌の悪性度と関連する低酸素順応、上皮間葉転換、癌幹細胞化を検討することとした。まず、TFAM-KD細胞は通常酸素環境 (20%O₂) 下ではコントロール細胞より増殖速度が緩徐であったが、低酸素環境 (1%O₂) 下においても通常酸素環境下と同程度の速度で増殖していた。続いて、mRNA発現についてRT-PCR法で測定したところ、TFAM-KD細胞では上皮間葉転換を示唆するE-cadherinの低下、N-cadherin / vimentin / zeb-1の上昇が見られた。E-cadherin、N-cadherinの蛋白発現についても同様の変化を認めた (Western blotting)。さらにMatrigel-invasion assay、Scratch-wound healing assayを行ったところ、TFAM-KD細胞は浸潤能、遊走能が有意に亢進していた。一方、癌幹細胞マーカーであるCD44について、mRNA及び蛋白発現をRT-PCRとフローサイトメトリーで測定した結果、TFAM-KD細胞でCD44のmRNA及び蛋白発現の上昇を認めた。Tumor sphere formation assayを行ったところ、TFAM-KD細胞で腫瘍形成能が有意に亢進していた。細胞周期解析では、TFAM-KD細胞はG0/G1期の期間が有意に延長していた。以上の結果よりmtDNAコピー数減少細胞は、癌の悪性度と関連する低酸素順応、上皮間葉転換、癌幹細胞化をきたしていることが示唆された。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>食道扁平上皮癌においてmtDNAコピー数の減少が認められ、mtDNAコピー数減少はpTと並んで独立した予後不良因子であった。mtDNAコピー数減少は低酸素順応、上皮間葉転換、癌幹細胞化と関係しており、腫瘍進展に寄与していることが示唆された。</p>	