



学位論文題目 Title	Apoptosis, necroptosis and autophagy in colorectal cancer: Associations with tumor aggressiveness and p53 status(大腸癌におけるアポトーシス、ネクロトーシス、オートファジー：腫瘍の病理学的悪性度とp53タンパク発現状態との関連性について)
氏名 Author	Sakanashi, Fuminori
専攻分野 Degree	博士（保健学）
学位授与の日付 Date of Degree	2020-03-25
資源タイプ Resource Type	Thesis or Dissertation / 学位論文
報告番号 Report Number	甲第7745号
権利 Rights	
JaLDOI	
URL	http://www.lib.kobe-u.ac.jp/handle_kernel/D1007745

※当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

(様式3)

論文内容の要旨

専攻領域 病態解析学領域

専攻分野 細胞機能・構造科学分野

氏名 坂梨 史典

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を()を付して併記すること。)

Apoptosis, necroptosis and autophagy in colorectal cancer: Associations with tumor aggressiveness and p53 status

(大腸癌におけるアポトーシス、ネクロトーシス、オートファジー：腫瘍の病理学的悪性度とp53タンパク発現状態との関連性について)

論文内容の要旨 (1,000字~2,000字でまとめること。)

Cleaved caspase-3 (以下、CC3)、phosphorylated-mixed-lineage kinase domain-like protein (以下、p-MLKL)、microtubule-associated protein-1 light chain-3B (以下、LC3B)は、それぞれ細胞死経路のアポトーシス、ネクロトーシス、オートファジーにおいて重要な役割を果たしている。

In vitro 研究によると、これら細胞死関連蛋白の相互作用は複雑であり、癌における細胞死関連蛋白の役割は多くの因子(組

織・細胞の種類、腫瘍の悪性度、遺伝子変異、酸素・栄養状態など)の影響を受けることが示されている。しかし、ヒト癌組織を対象とした検討は十分になされていない。そこで本研究では、ヒト大腸癌組織における CC3、p-MLKL および LC3B の発現を免疫組織化学的に明らかにし、臨床病理学的因子、p53 タンパクの発現状態および *K-RAS* 遺伝子変異の有無との関連性を検討した。

術前に化学療法あるいは放射線療法を実施していない大腸癌 113 例の手術切除標本を対象とした。代表的なホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを選出し、薄切切片を作製した。免疫組織化学染色を用いて CC3、p-MLKL、LC3B および p53 の発現を評価した。CC3 は細胞質あるいは核と細胞質、p-MLKL および LC3B は細胞質、p53 は核が染色されている腫瘍細胞を陽性と判断した。CC3、p-MLKL および LC3B については、ホットスポットにおける陽性腫瘍細胞率が 10% を超える場合を高発現、10% 以下の場合を低発現に分類した。また、p53 については、腫瘍細胞率が 70% を超える場合または完全に陰性の場合を変異型発現パターン、それ以外を野生型発現パターンと定義した。*K-RAS* 遺伝子変異の有無の確認には、Scorpion-amplification refractory mutation system 法を用いた。

対象とした 113 例中 43 例(38%)が CC3 高発現(以下、CC3^{High})、39 例(35%)が LC3B 高発現(以下、LC3B^{High})を示

したが、p-MLKL については、すべての症例で陰性あるいは数個の細胞が陽性を示すのみであった。CC3、LC3B 発現と臨床病理学的因子の関連性を解析すると、CC3^{High}は深達度、脈管侵襲および病理学的ステージと有意に相関しており（それぞれ $P = 0.03$ 、 $P = 0.03$ 、 $P = 0.04$ ）、また CC3^{High}とリンパ節転移、遠隔転移との間には有意傾向が認められた（ともに $P = 0.06$ ）。LC3B^{High}は深達度およびリンパ管侵襲と有意な相関を示し（それぞれ $P = 0.02$ 、 $P = 0.002$ ）、神経叢浸潤との間に有意傾向がみられた（ $P = 0.06$ ）。CC3 と LC3B を組み合わせると、CC3、LC3B 単独よりも強い統計学的有意性をもって病理学的悪性度と関連していた。すなわち、両者ともに低発現（CC3^{Low}/LC3B^{Low}）の症例群と比較して、一方が高発現あるいは両者が高発現（either CC3^{High}, LC3B^{High}, or both）を示す症例群は有意に深達度が高く（ $P = 0.0007$ ）、リンパ管侵襲（ $P = 0.03$ ）、脈管侵襲（ $P = 0.003$ ）、遠隔転移（ $P = 0.04$ ）を認め、病理学的ステージが高かった（ $P = 0.04$ ）。一方、LC3B^{High}は p53 タンパクの変異型発現パターンと有意に関連していたが（ $P = 0.003$ ）、CC3、LC3B 発現と *K-RAS* 遺伝子変異との関連性は見出されなかった。

本研究では初めて、ヒト大腸癌の病理組織検体における CC3 と LC3B の組み合わせおよび p-MLKL の発現を検討し、臨床病理学的因子、*KRAS* 遺伝子変異および p53 発現パターン

との関連性を解析した。上記の結果から、1) ヒト大腸癌における細胞死経路としてネクローシスは稀であること、2) アポトーシスとオートファジーが相互に関連し大腸癌の進展に関与していること、3) p53 の変異がオートファジーの upregulation につながる可能性があることが示唆された。

指導教員氏名：鴨志田 伸吾

(別紙1)

論文審査の結果の要旨

氏名	坂梨 史典		
論文題目	Apoptosis, necroptosis and autophagy in colorectal cancer: Associations with tumor aggressiveness and p53 status (大腸癌におけるアポトーシス、ネクロトーシス、オートファジー、腫瘍の病理学的悪性度とp53タンパク発現状態との関連性について)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	鴨志田 伸吾
	副査	教授	堀 裕一
	副査		印
	副査		印
要 旨			
<p>細胞死関連マーカー cleaved caspase-3 (CC3)、phosphorylated-mixed-lineage kinase domain-like protein (p-MLKL)、microtubule-associated protein-1 light chain-3B (LC3B)は、それぞれapoptosis、necroptosis、autophagyにおいて中心的な働きを担う。しかし、ヒト癌組織における上記マーカーの相互関係や影響を与える因子については不明な点が多い。そこで本研究では、ヒト大腸癌組織におけるCC3、p-MLKLおよびLC3Bの発現を明らかにし、臨床病理学的所見、p53蛋白の発現状態、KRAS遺伝子変異との関連性を解析した。手術切除で得られた大腸癌の組織切片を対象に、免疫染色を用いて上記3マーカーとp53蛋白の発現を評価した。また、Scorpion-ARMS法を用いて、KRAS遺伝子変異の有無を確認した。CC3高発現は深達度、脈管侵襲、病期と有意に相関しており、リンパ節転移、遠隔転移と有意傾向を示した。LC3B高発現は深達度、リンパ管侵襲と有意な相関を、また神経叢浸潤と有意傾向を示した。CC3とLC3Bを組み合わせると、両者ともに低発現の症例群と比較して、少なくともどちらかが高発現を示す症例群は深達度、リンパ管侵襲、血管侵襲、遠隔転移及び病期と有意に相関していた。一方、LC3B高発現はp53蛋白の変異型発現パターンと有意に関連していた。なお、p-MLKLはすべての症例で低発現であった。以上から、本研究によって1) apoptosisとautophagyは悪性度の高い大腸癌で活性化されていること、2) p53の変異がautophagyのupregulationにつながること、および3) ヒト大腸癌ではnecroptosisによる細胞死は稀であることを示唆する重要知見が得られたものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の坂梨史典氏は、博士(保健学)の学位を得る資格があると認める。</p>			
掲載論文名・著者名・掲載(予定)誌名・巻(号)、頁、発行(予定)年を記入してください。 Apoptosis, necroptosis and autophagy in colorectal cancer: Associations with tumor aggressiveness and p53 status. Sakanashi F, Shintani M, Tsuneyoshi M, Ohsaki H, Kamoshida S. Pathology - Research and Practice 215(7):152425, 2019.			