

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08647

研究課題名(和文) 肝細胞癌の発育進展に於けるオートファジー・ミトファジーの役割と分子機序の解明

研究課題名(英文) Autophagy and mitophagy in advanced hepatocellular carcinoma

研究代表者

池上 徹 (Ikegami, Toru)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：80432938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌症例のLC3免疫組織染色では腫瘍部にてBeclin-1、LC3-II、Atg5の高発現とp62の低発現を認めた。オートファジーKOにてBrdU取り込み率の低下、p62蛋白質の蓄積を認めた。肝細胞癌症例においてミトファジーのマーカーであるミトフシンによる免疫組織染色を行ったところ、ミトフシン陽性群では有意に腫瘍サイズが大きいことが明らかとなった。また肝切除後の無再発生存率はミトフシン陽性群は陰性群に比し有意に不良であることが明らかとなった。一方ミトファジーのもうひとつの定量的マーカーであるパーキンを用いて免疫組織染色では肝切除後の無再発生存率に有意差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の肝細胞癌研究に於いては、肝細胞癌のゲノム解析や免疫学的側面からその発育・浸潤・転移を明らかにするようなアプローチが殆どであり、細胞のエネルギー代謝・エネルギー産生やミトコンドリアサイクルからのアプローチは殆どされてこなかった。細胞内エネルギー状態の維持を行うオートファジー、障害ミトコンドリアの選択的排除により健常ミトコンドリアによるエネルギー産生を維持するミトファジーの2つの生体機構が肝細胞癌の発育進展に於いてどのように作用し、またどのような分子機構により関与しているのか、従来と異なるアプローチから肝細胞癌の増殖進展のメカニズムを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Immuno-histochemical staining for LC3 in hepatocellular carcinoma showed increased Beclin-1, LC3-II, Atg5 and decreased expression of p62. Knock out of autophagy resulted in decreased BrdU uptake and collection of p62. Immuno-histochemical staining for mitophcin in hepatocellular carcinoma showed positive staining in large and advanced ones. Recurrence free survival rate after hepatectomy for hepatocellular carcinoma was significantly worse in positive mitophcin cases. However, perkin was not a useful biomarker for survival rate.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝細胞癌 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(肝癌)は我が国に於いて主要な消化器癌の一つであり、年間約3万人が同疾患により死亡している。そのような肝細胞癌の重要な特徴の一つが、しばしば巨大化する膨張性発育とそれに伴う分化度の低下および浸潤転移能の獲得である。オートファジーはオートライゾソームにより障害された蛋白質の自己消化を介して細胞内エネルギーの維持あるいはタンパク質の供給によって細胞内器官を再構成することで細胞のホメオスタシスを維持する生体機構である。癌に於けるオートファジーの役割に関しては、未だ明らかにされていない部分が多い。一方エネルギー産生を行う上で最も重要な細胞内器官はATPサイクルを有するミトコンドリアであるが、エネルギー産生と同時に有害活性酸素を産生することにより障害ミトコンドリアが蓄積することが知られている。障害ミトコンドリアは健常ミトコンドリアに癒合し悪影響を及ぼすため、効率的に排除されることが細胞恒常性に重要である。マイトファジーとは障害されたミトコンドリアを特異的選択的に分解して細胞内浄化を行う特異的オートファジーであり、細胞内燃器官であるミトコンドリア環境の維持に必須のメカニズムであることが知られている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞内オルガネラの自己消化によるはアミノ酸の供給を介して細胞内エネルギー状態の維持を行うオートファジー、そして障害ミトコンドリアの選択的排除により健常ミトコンドリアによるエネルギー産生を維持するマイトファジーの2つの生体機構が肝細胞癌の発育進展に於いてどのように作用し、またどのような分子機構により関与しているのかを明らかにすることである。従来の肝細胞癌研究に於いては、肝細胞癌のゲノム解析や免疫学的側面からその発育・浸潤・転移を明らかにするようなアプローチが殆どであり、細胞のエネルギー代謝・エネルギー産生やミトコンドリアサイクルからのアプローチは殆どされてこなかった。本研究の学術的独自性と創造性は、オートファジー・マイトファジーという来と異なるアプローチから肝細胞癌の増殖進展のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

肝細胞癌臨床検体を用いて、オートファジー・マイトファジーの存在をそれぞれLC-3およびミトフシンを用いて免疫組織染色を行い、臨床病理学的因子の相関を解析する。前述の如く、プレリミナリーではあるが3cm以上の肝細胞癌に於いてLC3陽性症例は有意に予後不良である傾向を示した。症例を追加し、腫瘍分化度・腫瘍による血管侵襲・肝内転移との関係を明らかにする。マイトファジーの指標としてミトフシンの他、PINK-1、パーキン、P62等のマイトファジー関連蛋白と腫瘍因子の臨床病理学的指標との関係の有無を明らかにする。またヒト肝細胞癌株であるHuh7を低酸素環境(0.1%O₂)下に培養し、GFP-LC3にて免疫組織学的染色を行うことでオートファジー活性を評価する。既に同培養系に於いて電子顕微鏡によるオートファゴソームの観察を行う。オートファジー関連タンパク質の発現を評価するために、低酸素培養0、0.5、1、2、4時間後の培養肝細胞癌細胞を回収し、ウェスタンブロットにてBeclin-1、LC3-1/2、Atg5、p62蛋白の発現を評価する。

4. 研究成果

細胞内オルガネラの自己消化によるはアミノ酸の供給を介して細胞内エネルギー状態の維持を行うオートファジー、そして障害ミトコンドリアの選択的排除により健常ミトコンドリアによるエネルギー産生を維持するマイトファジーの2つの生体機構が肝細胞癌の発育進展に於いてどのように作用し、またどのような分子機構により関与しているのかを明らかにすることである。従来の肝細胞癌研究に於いては、肝細胞癌のゲノム解析や免疫学的側面からその発育・浸潤・転移を明らかにするようなアプローチが殆どであり、細胞のエネルギー代謝・エネルギー産生やミトコンドリアサイクルからのアプローチは殆どされてこなかった。本研究の学術的独自性と創造性は、オートファジー・マイトファジーという来と異なるアプローチから肝細胞癌の増殖進展のメカニズムを明らかにする。肝細胞癌症例のLC3免疫組織染色を行ったところ、腫瘍部にてBeclin-1、LC3-II、Atg5の高発現とp62の低発現を認め、オートファジーが活性化している肝細胞癌症例と非活性化症例が存在することが明らかとなった。オートファジーKOにて核の増殖能の低下(BrdU取り込み率の低下)、障害蛋白質の蓄積(p62蛋白質の蓄積)を認めた。その一因としては、p21蛋白質に起因する細胞周期の遅延(細胞周期G2やS期の減少、CyclinDの低発現)や、肝組織中ATPの低下、細胞老化の促進が考えられた。また、肝細胞癌臨床検体を用いてLC3の免疫組織染色を行ったところ、3cm以上の中大型肝細胞癌に於いてLC3陽性肝癌は陰性症例に比し有意に予後不良であった。すなわち非比較的径の大きい肝細胞癌に於いてはオートファジー活性化を示すものは自己細胞器官のリサイクルによるマテリアルの供給あるいはエネルギー産生により癌細胞の発育進展に関与している可能性が示唆された。さらに52例の肝細胞癌症例においてマイトファジーのマーカーであるミトフシンによる免疫組織染色を行ったところ、ミトフシン陽性群では有意に腫瘍サイズが大きいことが明らかとなった。また肝切除後の無再発生存率はミトフシン陽性群は陰性群に比し有意に不良であることが明らかとなった。一方マイトファジーのもうひとつの定量的マーカーであるパーキンをを用いて免疫組織染色を行ったところ、こちらは肝切除後の無再発生存率に有意差は認めなかった。多変量解析ではプロトンピン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

時間、血管侵襲陽性、輸血あり、ミトフシン陽性 (ハザード比 3.86、 $p=0.01$) はそれぞれ肝細胞癌に対する肝切除後の再発危険因子であった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mano Y, Yoshizumi T, Yugawa K, Ohira M, Motomura T, Toshima T, Itoh S, Harada N, Ikegami T, Soejima Y, Maehara Y.	4. 巻 24
2. 論文標題 Lymphocyte-to-Monocyte Ratio Is a Predictor of Survival After Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Liver Transpl.	6. 最初と最後の頁 1603-1611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lt.25204.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeishi K, Kawanaka H, Itoh S, Harimoto N, Ikegami T, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y.	4. 巻 42
2. 論文標題 Impact of Splenic Volume and Splenectomy on Prognosis of Hepatocellular Carcinoma Within Milan Criteria After Curative Hepatectomy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World J Surg.	6. 最初と最後の頁 1120-1128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00268-017-4232-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Itoh S, Yoshizumi T, Tomino T, Nagatsu A, Motomura T, Harada N, Harimoto N, Ikegami T, Soejima Y, Maehara Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 Associations between antibody to hepatitis B core antigen positivity and outcomes in hepatocellular carcinoma patients undergoing hepatic resection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 E155-E161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.12939	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Yoshihiro, Yoshizumi Tomoharu, Toshima Takeo, Takeishi Kazuki, Fukuhara Takasuke, Itoh Shinji, Ikegami Toru, Soejima Yuji, Mori Masaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Ectopic localization of autophagosome in fatty liver is a key factor for liver regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organogenesis	6. 最初と最後の頁 24~34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15476278.2019.1633872	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imai Daisuke, Yoshizumi Tomoharu, Okano Shinji, Itoh Shinji, Ikegami Toru, Harada Noboru, Aishima Shinichi, Oda Yoshinao, Maehara Yoshihiko	4. 巻 240
2. 論文標題 IFN- Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and the Expression of PD-L1 in Pancreatic Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 115 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2019.02.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimokawa Masahiro, Yoshizumi Tomoharu, Itoh Shinji, Iseda Norifumi, Sakata Kazuhito, Yugawa Kyohei, Toshima Takeo, Harada Noboru, Ikegami Toru, Mori Masaki	4. 巻 111
2. 論文標題 Modulation of Nqo1 activity intercepts anoikis resistance and reduces metastatic potential of hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1228 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Shinji, Yoshizumi Tomoharu, Yugawa Kyohei, Imai Daisuke, Yoshiya Shohei, Takeishi Kazuki, Toshima Takeo, Harada Noboru, Ikegami Toru, Soejima Yuji, Kohashi Kenichi, Oda Yoshinao, Mori Masaki	4. 巻 72
2. 論文標題 Impact of Immune Response on Outcomes in Hepatocellular Carcinoma: Association With Vascular Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1987 ~ 1999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inokuchi Shoichi, Itoh Shinji, Yoshizumi Tomoharu, Yugawa Kyohei, Yoshiya Shohei, Toshima Takeo, Takeishi Kazuki, Iguchi Tomohiro, Sanefuji Kensaku, Harada Noboru, Sugimachi Keishi, Ikegami Toru, Kohashi Kenichi, Taguchi Kenichi, Yonemasu Hirotohi, Fukuzawa Kengo, Oda Yoshinao, Mori Masaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Mitochondrial expression of the DNA repair enzyme OGG1 improves the prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 1175 ~ 1182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2020.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lai Quirino, Ikegami Toru, Lerut Jan, et al	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of an Upper Limit of Tumor Burden for Downstaging in Candidates with Hepatocellular Cancer Waiting for Liver Transplantation: A West?East Collaborative Effort	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 452 ~ 452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12020452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井口 諤一, 吉住 朋晴, 戸島 剛男, 伊勢田 憲史, 富山 貴央, 森永 哲成, 湯川 恭平, 小斉 侑希子, 吉屋 匠平, 武石 一樹, 伊藤 心二, 原田 昇, 池上 徹, 森 正樹
2. 発表標題 肝癌増殖におけるオートファジーアダプター蛋白質optineurin発現の意義
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸島 剛男, 吉住 朋晴, 井口 諤一, 小斉 侑希子, 吉屋 匠平, 武石 一樹, 伊藤 心二, 原田 昇, 池上 徹, 森 正樹.
2. 発表標題 骨密度低下(オステオペニア)が生体肝移植後の予後に与える影響について
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳垣 充, 春木 孝一郎, 谷合 智彦, 羽村 凌雅, 堀内 堯, 白井 祥睦, 安田 淳吾, 古川 賢英, 塩崎 弘憲, 恩田 真二, 後町 武志, 池上 徹
2. 発表標題 肝細胞癌術後予後予測因子としてのrapid turnover protein(RTP)スコアの有用性
3. 学会等名 第82回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 湯川 恭平, 吉住 朋晴, 吉屋 匠平, 間野 洋平, 武石 一樹, 伊藤 心二, 原田 昇, 池上 徹, 副島 雄二, 森 正樹
2. 発表標題 肝細胞癌におけるDNA修復酵素OGG1発現の意義
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井口 詔一, 吉住 朋晴, 栗原 健, 吉屋 匠平, 間野 洋平, 武石 一樹, 伊藤 心二, 原田 昇, 池上 徹, 森 正樹
2. 発表標題 肝癌増殖におけるオートファジーアダプター蛋白optineurinの意義
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川崎 淳司, 吉住 朋晴, 泉 琢磨, 井口 詔一, 湯川 恭平, 藤本 侑希子, 下川 雅弘, 坂田 一仁, 富野 高広, 大平 将史, 間野 洋平, 本村 貴志, 戸島 剛男, 伊藤 心二, 原田 昇, 播本 憲史, 池上 徹, 副島 雄二, 前原 喜彦
2. 発表標題 類洞様血管構造をもつ肝細胞癌と生体肝移植後肝癌再発に関する研究
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池上 徹, 吉住 朋晴, 前原 喜彦
2. 発表標題 C型肝炎治療: 現状と展望 DAAを用いた肝移植後C型肝炎治療に於ける特殊性と問題点
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	間野 洋平 (Mano Yohei) (10792244)	独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・肝胆膵外科医師 (87102)	
研究分担者	副島 雄二 (Soejima Yuji) (30325526)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究分担者	戸島 剛男 (Toshima Takeo) (40608965)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	本村 貴志 (Motomura Takashi) (50719507)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	吉住 朋晴 (Yoshizumi Tomoharu) (80363373)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	原田 昇 (Harada Noboru) (80419580)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	伊藤 心二 (Itoh Shinji) (90382423)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	後町 武志 (Gocho Takeshi) (40338893)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	
研究分担者	古川 賢英 (Furukawa Kenei) (80624973)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	
研究分担者	白井 祥睦 (Shirai Yoshihiro) (10785364)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	
研究分担者	恩田 真二 (Onda Shinji) (10459620)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関