

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591502

研究課題名（和文） 肝細胞癌組織中治療抵抗性細胞集団の同定とその特徴

研究課題名（英文） Identification of treatment-refractory cancer cells in hepatocellular carcinoma tissues

研究代表者

坂口 孝宣（SAKAGUCHI TAKANORI）

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70313955

研究成果の概要（和文）：本研究は肝細胞癌の治療抵抗性細胞集団を同定するため、各種抗酸化ストレス酵素群の主な転写因子である Nrf2（NF-E2-related factor 2）をターゲットとして肝切除検体を用いた研究を進めた。しかし、癌非癌部境界に存在する Nrf2 陽性細胞集団に特異的分布を示す分子種は同定されなかった。よって、Nrf2 による解析では治療抵抗細胞の同定は困難と考え、抗がん剤の汲入及び排出を司る transporter の解析を行った。新鮮凍結組織から抽出した蛋白を用いて Western blot（WB）法にて解析した。Western blot 法および免疫染色法により、微細胆管側へ排出する transporter である Multidrug resistance protein（MDR）3 の発現が低下している患者群の予後が有意に不良であることが判明した。また、MDR3 多寡によって細胞の脂質である Phosphatidylcholine（PC）の組成が変わることも判明した。治療抵抗性細胞集団の同定という本来の目的は達成できなかったが、予後と関連する蛋白として MDR3 を同定でき、その発現が脂質分布に影響を及ぼすことが判明した。

研究成果の概要（英文）：The initial purpose of this study was to identify the hepatocellular carcinoma cells which are refractory to several therapies, by examining the expression levels of NF-E3-related factor 2 (Nrf2), the main transcription factor for anti-oxidative stress-related genes. We identified Nfr2-rich cells around the cancer-non cancer border region in the resected specimens, although the molecules specifically located in these cells were not observed under mass-spectrometry microscope analysis. Therefore, we examined the expression levels of transporters which are responsible for anti-cancer agent excretion. Western blot and immunohistochemical analysis demonstrated that the posthepatectomic prognosis of patients whose HCC showed low levels of multidrug resistant protein (MDR) 3 was significantly worse. Furthermore, the composition of membranous and cytosolic lipid, phosphatidylcholine, was significantly altered by the intratumor MDR3 levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学

1. 研究開始当初の背景

癌組織には癌幹細胞 (cancer stem cells)、原発上皮類似の分化癌細胞、より幼弱な未分化癌細胞、それらを支持する間質様癌細胞などが同一組織内に混在している。癌幹細胞は細胞分裂能が低く、低酸素刺激や酸化ストレスに抵抗性を有するために放射線治療や抗癌剤への強い治療抵抗性を示す。今回の研究対象である肝細胞癌においても、肝動脈塞栓術などへの治療抵抗性が临床上の大きな課題である。

我々は、肝細胞癌の治療抵抗性獲得過程には転写因子 Nrf2 (NF-E2-related factor 2) が重要な役割を演じていると考えた。すなわち、各種抗酸化ストレス酵素群を誘導することで内在性防御機構の中心的役割を担うはずの Nrf2 システムを、癌細胞集団が治療抵抗性獲得のために乗っ取って利用しているのではないかと、この仮説を立てた。

現在まで、抗酸化ストレス防御機構調節転写因子 Nrf2 と治療抵抗性癌細胞集団の関連を調べた研究はない。本研究はその関連性に着目したものである。

2. 研究の目的

肝細胞癌に対する種々の治療では、治療に抵抗性を示す細胞集団が存在することで治療後の再発を来すと考えられる。そのような細胞集団は癌幹細胞に類似し、酸化ストレスに抵抗するための内在性防御機構を乗っ取ることによって治療抵抗性を獲得している可能性がある。

本研究は肝細胞癌切除検体を用い、抗酸化ス

トレス酵素群及びその中枢的転写因子 Nrf2 の発現を基に、治療抵抗性細胞集団を同定、選別し、それらの特徴を調べることで臨床的な治療に応用しようとするものである。

3. 研究の方法

肝細胞癌切除検体を用いて、

- ①Nrf2 免疫組織染色を行うことで Nrf2 陽性細胞集団を同定
- ②質量顕微鏡解析法を用い、Nrf2 陽性細胞集団に特異的に増加もしくは減少する分子種 (タンパク質、脂質など) を同定
- ③それら分子種の変動をもたらす酵素を調べ、それらの発現を検索する。

4. 研究成果

最初に Nrf2 免疫染色を行ったところ、癌・非癌部境界の癌細胞に Nrf2 が強く発現することがわかった (図 1)。

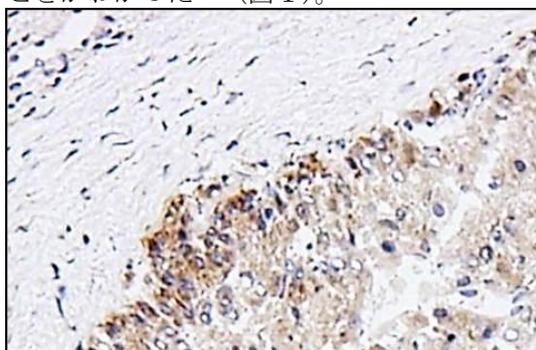


図 1：新鮮凍結切片 Nrf2 免疫染色。右下が肝細胞癌

しかし、Nrf2 陽性細胞集団に一致するような特異的分布を示す分子種は同定されなかった。ある種の Phosphatidylcholine (PC) は肝細胞癌に多量に蓄積していることが判明し、このことについては別研究として発展させ、この PC 蓄積の原因となる酵素 Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) を同定、LPCAT1 強発現が肝細胞癌悪性化につながることを確認した (図 2、学会報告済、論文投稿中)。

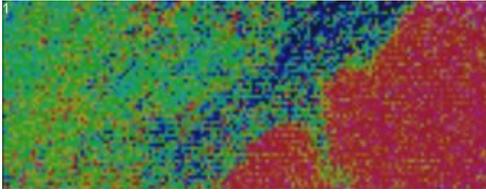


図 2: 図 1 と同じ切片、PC (16:0/18:1)を質量顕微鏡観察。青〜赤の変化に従い、量が増加。

よって、Nrf2 による解析では治療抵抗細胞の同定は困難と考え、抗がん剤の汲入及び排出を司る transporter の解析を行った。当初、新鮮凍結組織から抽出した蛋白を用いて Western blot (WB)法にて解析した。予想外に、微細胆管側へ排出する transporter である Multidrug resistance protein (MDR) 3 低発現群が有意に予後不良であった (図 3)。

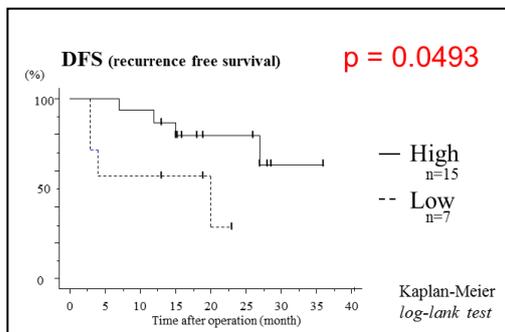


図 3: MDR3 発現多寡による肝切除後無病生存率の差

また、WB 法と免疫染色には強い相関関係があり、免疫染色の陽性・陰性での群分でも予後の差を検出できた。現時点では何故 MDR3 発現の差が肝切除後の予後に影響を与えるかは確認できていない。しかし、質量顕微鏡解析からは、前述した PC などの組成の差が MDR3 多寡によって観察されている (図 4)。

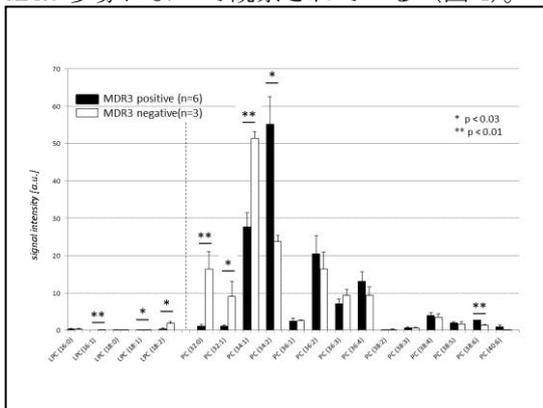


図 4: 脂質解析 黒、白は各々 MDR3 陽性、陰性

ここまでの結果をふまえ、現在論文作成中で、数か月以内に英文原著として論文投稿する予定である。

また、膜脂質の変化が癌細胞の挙動に変化を及ぼしていることを想定し、次の研究に発

展させることを考えている

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

現在、英文雑誌に投稿準備中

[学会発表] (計 4 件)

①柴崎泰、坂口孝宣他: 肝細胞癌における EOB, ICG の取り込みメカニズム

第 24 回日本肝胆膵外科学会学術集会
2012/5/31

②森田剛文、坂口孝宣他: 質量顕微鏡法によるバイオマーカー探索と臨床応用に向けた取り組み 第 67 回日本消化器外科学会総会
2012/7/20

③Sakaguchi T., et al.: Are clinicopathologic factors predictable from status of EOB or ICG accumulation in hepatocellular carcinoma? 71th annual meeting of the Japanese Cancer Association, 2012/9/20

④ Morita Y., Sakaguchi T., et al.: Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and promoted hepatoma progression. 71th annual meeting of the Japanese Cancer Association, 2012/9/20

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口 孝宣 (SAKAGUCHI TAKANORI)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70313955

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし