

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591921

研究課題名(和文) 乳癌組織におけるSHAP-HA複合体による酸化ストレス防御機構の解明

研究課題名(英文) The evaluation of SHAP-HA complex on the protection for oxidative stress in the breast cancer tissues

研究代表者

藤井 公人 (Fujii, Kimihito)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：00524331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌組織間質に存在するSHAP-HA複合体が、癌の微小環境形成に関与する可能性が考えられた。また、腫瘍の伸展と共にその血中濃度が変化する結果もあり、これらよりマーカーとしての活用も可能と示唆された。SHAP-HA複合体とグルタチオンとの関係性は認められず、抗酸化ストレス機構を通しての腫瘍の微小環境形成への関与は否定された。またSHAP-HA複合体の血中濃度は乳癌患者の病期の進行に一致して増加し、健常人では定値であるため、腫瘍マーカーとしての臨床応用も可能と示唆された。

研究成果の概要(英文)：As it was considered that SHAP-HA complex might correlate with cancer micro-environment through the anti-oxidative stress system, we assessed the presence of glutathione in the breast cancer tissues. However, we failed to confirm the glutathione reaction concomitant with SHAP-HA complex. This indicates that SHAP-HA complex may play a role for creating cancer micro-environment through the other pass way. The serum concentration of SHAP-HA complex increased with the progress of the breast cancer, indicating that SHAP-HA complex could be applied as the tumor marker demonstrating the cancer stage.

研究分野：乳腺・内分泌外科

キーワード：SHAP-HA複合体 腫瘍微小環境 腫瘍マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

乳癌組織間質に存在する SHAP-HA 複合体が、癌の微小環境形成に關与する可能性が考えられた。また、腫瘍の伸展共にその血中濃度が増加する結果もあり、これらよりマーカーとしての活用も可能と示唆された。

### 2. 研究の目的

乳癌組織間質に存在する SHAP-HA 複合体の、微小環境形成に対する役割を解明する。乳癌組織周囲には、HA および CD44 によって形成された微小環境が見られるが、その裏打ちとして SHAP-HA 複合体が機能していると思われる。

これら 3 者の關係性を解明し、癌細胞の生存維持のための微小環境の形成について解析する。また、癌の進行とともに上昇する血中 SHAP-HA 複合体の、腫瘍マーカーとしての使用法を確立する。乳癌の sub-group との臨床的關係を、予後を含めて解析することによる。

### 3. 研究の方法

HA と CD44 による微小環境形成は自明のものであるが、それらと SHAP-HA 複合体との關係は未だ明らかにされていない。SHAP-HA 複合体は、非常に強固な共有結合により形成され安定した構造のため、これらを微小環境形成の裏打ちとしておくことは、悪性腫瘍細胞自身の生存環境維持にとって非常に有用である。図 1 の左側には、浸潤性乳管癌の浸潤先行部周囲に強発現している SHAP-HA 複合体が確認される。

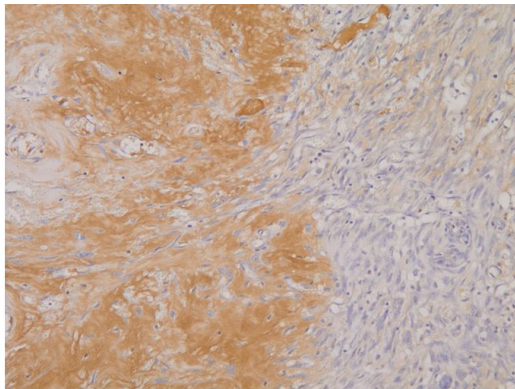


図 1

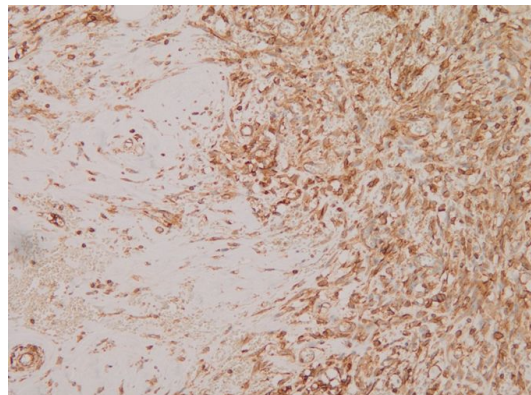


図 2

そして図 2 は、図 1 の連続切片であり、右側の腫瘍部分に CD44 が強発現している。HA と CD44 により形成された微小環境に対する SHAP-HA 複合体の 2 次元的配置を表示した。

HA と CD44 による酸化ストレス回避の作用は重要であるが、癌細胞の酸化ストレスに対抗するシステムとして、細胞内還元型グルタチオンの存在が重要である。これらは、CD44 を介して細胞内に貯留されている。それをさらに安定化させるために、SHAP-HA 複合体が存在している可能性が高い。この領域でのシステインの代謝を介した、細胞内グルタチオン濃度の変化を明らかにすることで、SHAP-HA 複合体の酸化ストレスと微小環境形成の關係が明らかになると予想される。

細胞内還元型グルタチオンを合成するステップとして、グルタミルシステイン合成酵素、グルタチオン合成酵素が重要であり、これらの酵素活性が SHAP-HA 複合体の発現する領域で増加している可能性が示唆される。まず免疫染色にてグルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase: GPx) を確認する。GPx はグルタチオン (GSH) の存在下で過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を水に還元するほか、過酸化脂質 (LOOH) を還元する機能を有し、酸化ストレスに対する防御機構として重要な役割を果たしている。乳癌組織において SHAP-HA 複合体に一致してこれらの発現が確認されるか確認する。

次の課題として、乳癌患者の血清から得られた SHAP-HA 複合体の濃度と Stage との關係を解析する。SHAP-HA 複合体は sandwich ELISA 法にて血清より測定可能である。これらを Stage 毎に分けて比較検討し、乳癌進行度との關係を検討する。同時に、健常人との比較も行う。

### 4. 研究成果

GPx の免疫染色を提示する。

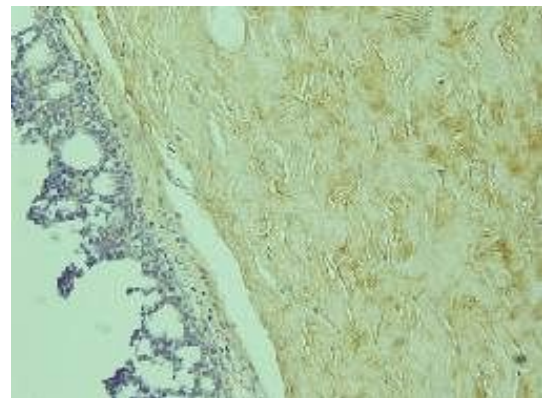


図 3

図 3 および 4 は、共に非浸潤性乳管癌組織である。図 3 では、腫瘍周囲の間質での SHAP-HA 複合体を免疫染色にて確認したものであるが、褐色の強い部分がそれらの発現部位である。その連続切片の図 4 では、間質の GPx に対する免疫染色の反応細胞は確認できてい

ない。非浸潤性乳管癌においては、転移再発を起こさない性質の腫瘍であることより、腫瘍と間質との相互関係は少ないものと考えられた。そのため GPx の発現を確認することは出来なかった。

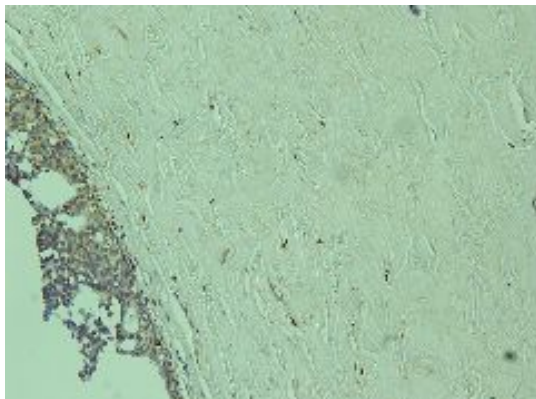


図 4

次に、浸潤性乳管癌における SHAP-HA 複合体と間質との関係を検討した。

腫瘍が周囲脂肪や正常乳腺に浸潤する部位で、特に間質内での GPx 陽性細胞の発現を免疫染色で評価した。

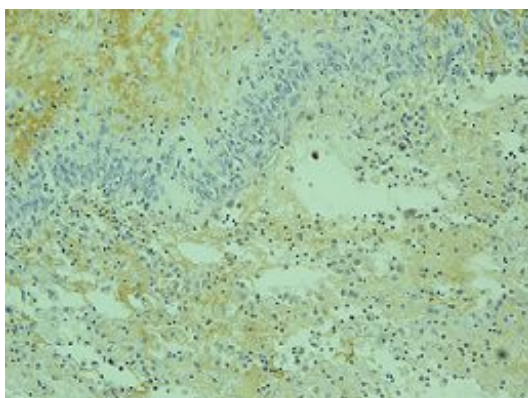


図 5

図 5 の左上の部分に SHAP-HA 複合体が濃い褐色として確認されるが、図 6 においてはそこに一致した GPx の発現は確認されなかった (図 5 および 6 は連続切片である)。GPx が本来、細胞質内に存在することが多いこともあり、間質においてはその発現確認が困難であったと思われる。

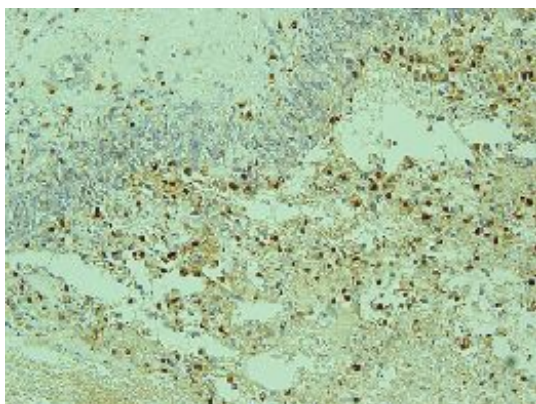


図 6

この結果からは、SHAP-HA 複合体が、抗酸化ストレス機構を介して腫瘍の微小環境形

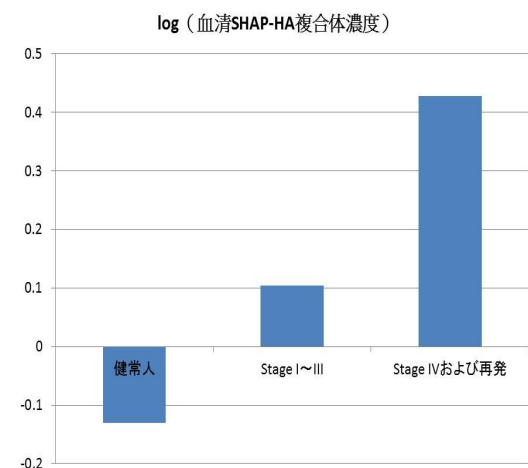
成に関与することは難しいことが示唆された。

一般的には腫瘍内部には CD44 が発現し、それを介して腫瘍内には GPx が取り込まれ、抗酸化ストレス機構を形成している。SHAP-HA 複合体は、その腫瘍の外側 (間質) に CD44 を裏打ちするかのよう存在するが、GPx のその部位での存在が確認されなかったことより、SHAP-HA 複合体が抗酸化ストレス機構に関与する可能性は低いことが結論として得られた。この点においては研究立案段階とは異なる結果であったが、SHAP-HA 複合体と乳癌腫瘍細胞との別の関係を模索する契機が得られたと考えられる。あるいは、逆説的ではあるが、SHAP-HA 複合体の存在する領域は血管造成が少ないことより、腫瘍にとっては低酸素状態となる。すなわち、SHAP-HA 複合体は生体の腫瘍に対する攻撃的反応 (防御機構) である可能性も否定できない。

次に、SHAP-HA 複合体の血中濃度の結果を Stage 別にまとめる。

	n	Log 値
健常人	16	-0.131 ± 0.085
Stage I ~ III	39	0.104 ± 0.184
Stage IV, 再発	34	0.428 ± 0.369

SHAP-HA 複合体の血清濃度は非常に微量であるので、log に換算して表記した。



Stage I ~ III 群における換算値は、健常人のそれより有意に高かった。また、Stage IV および再発の群も同様にその他 2 群のそれより有意に高い値を示した。これらより、SHAP-HA 複合体は、腫瘍の進行度を反映する腫瘍マーカーとしての活用が可能と考えられた。

SHAP-HA 複合体は、乳癌細胞の微小環境形成に寄与する可能性は高いが、抗酸化ストレス機構に関しては、GPx との関係が証明されなかったことより、そこへの介入は無いものと結論づけられた。また、血中の SHAP-HA 複合体は、乳癌患者においては健常人より有意

に高い状態であり、腫瘍進行度に一致して上昇することが確認され、腫瘍マーカーとしての臨床応用が可能と考えられた。さらに、悪性腫瘍が無い状態の健常人では殆ど血中濃度の差が見られず、ごく低値であることから、人における悪性腫瘍の存在の有無を評価する簡便なツールとしても活用可能と示唆された。

今後の課題は、腫瘍微小環境形成に対してSHAP-HA 複合体が如何に関与しているかを解明すること、そして症例の蓄積によりSHAP-HA 複合体血清濃度の安定した回帰曲線を算出し、それをを用いて測定法をキット化することである。

<引用文献>

無し

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

藤井 公人 (FUJII, Kimihito)

愛知医科大学 医学部 講師

研究者番号：00524331

### (2)研究分担者

福富 隆志 (FUKUTOMI, Takashi)

愛知医科大学 医学部 教授

研究者番号：30165302

中野 正吾 (NAKANO, Shogo)

愛知医科大学 医学部 准教授

研究者番号：20351108

吉田 美和 (YOSHIDA, Miwa)

昭和大学 医学部 講師

研究者番号：30556098

高阪 絢子 (KOUSAKA, Jyunko)

愛知医科大学 医学部 助手

研究者番号：50440748

### (3)連携研究者

無

### (4)研究協力者

無