

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19790491
 研究課題名 (和文) 肝細胞癌の進展における酸化ストレスの関与およびその分子生物学的メカニズムの解明
 研究課題名 (英文) the association of oxidative stress in the clinical state of hepatocellular carcinoma and the molecular mechanism of that.
 研究代表者
 西川 太一郎 (NISHIKAWA TAICHIRO)
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：90433250

研究成果の概要：ヒト肝細胞癌組織において酸化ストレスの増加にともない肝癌細胞のテロメア長が短縮し、PTEN・Akt シグナルに依存してテロメラーゼ活性の増加と細胞増殖の活性化・アポトーシス耐性の傾向があることが明らかとなった。また Akt シグナルの活性化に関連して、肝細胞癌組織における酸化ストレスは VEGF、VEGF receptor2 の発現増加を介した血管新生にも関与していることが明らかとなった。以上より本研究は、肝細胞癌において酸化ストレスがテロメラーゼの活性化、血管新生の増加を介して、癌病態の悪性化に寄与していることを明らかにし、肝細胞癌の新たな治療として抗酸化療法の有用性について示した点で意義があったと考える。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝細胞癌、酸化ストレス、テロメラーゼ、AKT、VEGF

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性肝疾患の病態の進展および発癌に酸化ストレスが密接に関与する事が報告されている。その機序として、慢性炎症下での酸化ストレスが肝細胞のテロメア短縮を促進し、それが慢性肝疾患の病態の進展に寄与している可能性があることをこれまでに我々は報告した。しかし肝細胞癌の病態における酸化ストレスの意義については、これま

でに十分な検討がなされていない。

2. 研究の目的

我々は、肝細胞癌の病態における酸化ストレスの役割について明らかにするため、肝細胞癌組織における酸化ストレスの程度とテロメア長・テロメラーゼ活性を中心とした病理学的因子との関連について検討を行うこととした。また肝細胞癌において酸化ストレ

スが生じる機序、どのような点で病態の悪性化に寄与しているのか、抗酸化剤による酸化ストレスの除去が病態の改善に役立つのかについても併せて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝細胞癌組織での検討

I. 肝細胞癌における酸化ストレスと病理学的因子との関連についての解析

肝細胞癌検体のパラフィンブロックから切片を作成し、次の項目について検討する。

①酸化ストレスマーカーとして

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)、4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) の免疫染色を行い、その染色性・分布から肝癌組織における酸化ストレスの程度を分類する。

②テロメラーゼ活性のマーカーとしてhuman telomerase reverse transcriptase (hTERT) の免疫染色を行い、その染色性・分布よりテロメラーゼ活性の有無を分類する。

③テロメアPNAプローブを用いて組織FISHを行い、その蛍光量から肝癌細胞特異的なテロメア長を測定する。(“IP labo” softにて解析を行う)

④HE染色を行い、組織学的分化度などを検討する。

⑤Ki67の免疫染色を行い、その染色性・分布より肝癌細胞の増殖活性を検討する。

⑥TUNEL法により、その染色性・分布よりアポトーシスの頻度を検討する。

凍結組織が利用できる検体については telomere repeat amplification protocol (TRAP) assay を行い、肝癌組織におけるテロメラーゼ活性の程度を検討する。

上記の実験で得られた結果を統計学的に解析し、肝細胞癌における酸化ストレスの程度とテロメア長、テロメラーゼ活性との関連性、また増殖活性やアポトーシスの頻度、癌組織の分化度などとの関連性について検討する。

II. 肝細胞癌における酸化ストレスによるテロメラーゼ活性増強の機序および抗酸化系酵素の発現状態についての解析

肝細胞癌検体パラフィンブロックから切片を作成し、

①テロメラーゼ活性制御因子 (Akt、p53、c-myc、SIP1、Mad1、TGF- β 、Rak、BRIT1)

②抗酸化系酵素 (SOD、GSH、TRX、GSH peroxidase、GSH-S-transferase、

TRX peroxidase、catalase)

③増殖刺激およびアポトーシス制御因子 (cyclin A、cyclin D、cyclin E、p21、p27、bcl-2、bcl-x1、bax、bad etc.)

④③のシグナル伝達系 (ERK1/2、JNK、p38、P65)

の各々に対する特異的オリゴDNAプローブを用いてin situ hybridization (ISH) を行い、各因子の発現状態を検討する。

その結果を統計学的に解析し、酸化ストレス・テロメラーゼ活性に関連して発現に有意差が認められる因子を検討する。

ISHにより発現に有意差のあった因子については、特異的抗体を用いて免疫染色を行い、各グループ間で発現に有意差がないかさらに検討する。

またAkt、ERK1/2、JNK等のシグナル伝達系については発現量だけでなく、リン酸化検出抗体を用いて免疫染色を行い、活性化状態について検討する。

III. 肝細胞癌における酸化ストレスと血管新生との関連についての解析

肝細胞癌検体のパラフィンブロックから切片を作成し、次の項目について検討する。

①CD31の免疫染色を行い、陽性部位を画像解析することにより、腫瘍組織における新生血管の面積を評価する。(“NIH imaging” softにて解析を行う)

②vascular endothelial growth factor (VEGF)、vascular endothelial growth factor receptor2 (VEGF-R2) の免疫染色を行い、腫瘍における血管新生因子の発現について評価する。

上記の実験で得られた結果を統計学的に解析し、肝細胞癌における酸化ストレスの程度と腫瘍における新生血管の程度および血管新生因子の発現との関連性について検討する。

(2) 肝癌細胞株での検討

I. In vitroでの酸化ストレスによる細胞形質の変化についての解析

肝癌細胞株HLEをcontrol培地およびH2O2投与下にて培養し、次の手順で癌細胞への影響を調べる。

①癌細胞株を上記の処置後、細胞数の変化につきMTT assayを用いて評価する。

②肝癌細胞株を上記の処置後、RNAを抽出し、

cDNAを合成後にリアルタイムRT-PCR法によりhTERTの発現量を測定し、酸化ストレスによりhTERTの発現が抑制されるか検討する。また同時にDNA・蛋白抽出も行い、FACSを用いてテロメア長への影響、TRAPassayにてテロメラーゼ活性への影響も検討する。

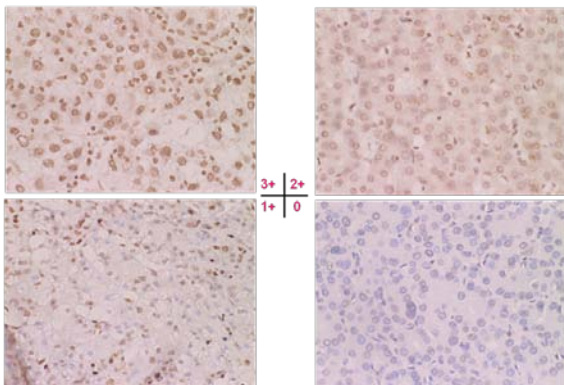
③ヒト肝細胞癌組織での検討により、酸化ストレスによって発現の変化が認められた遺伝子について、上記の処置後の肝細胞株でも同様に発現の変化があるか、リアルタイムRT-PCR法を用いて検討する。

4. 研究成果

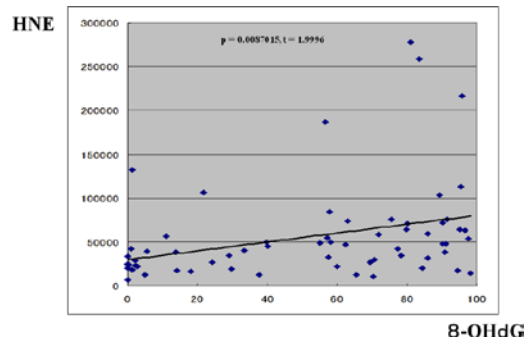
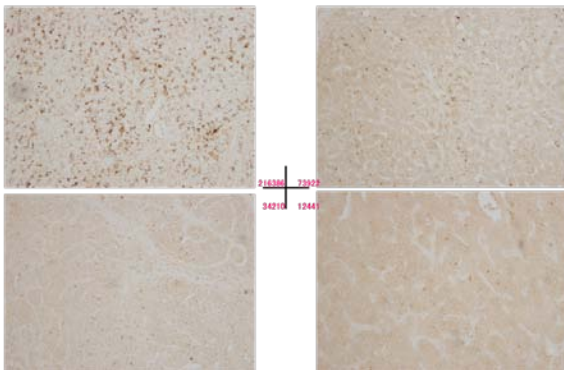
(1) 肝細胞癌組織における酸化ストレスの解析

肝細胞癌組織68検体で8-OHdGと4-HNEの免疫染色を行い、8-OHdGは核の染色陽性率、4-HNEは細胞質での染色顆粒の総面積で肝細胞癌組織における酸化ストレスの程度を評価した。その結果、両者の間には有意な正の相関関係が認められた。(P<0.05)

8-OHdG免疫組織染色



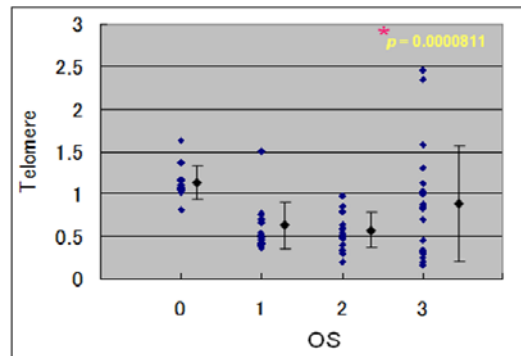
4-HNE免疫組織染色



8-OHdGの核の染色陽性率により、肝細胞癌組織における酸化ストレスの程度をOS0 (<10%)、OS1 (10%-50%)、OS2 (50%-90%)、OS3 (90%<)の4段階 (grade0-3) に分類した。全体の77%でgrade1以上の酸化ストレスの増加を認めた。

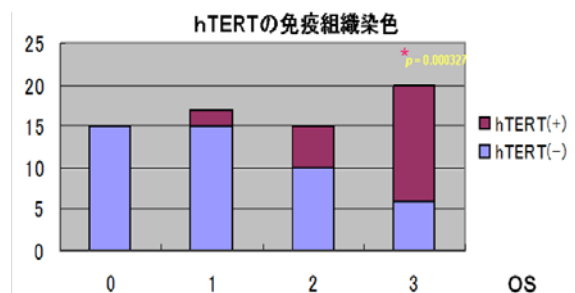
(2) 肝細胞癌組織における酸化ストレスのテロメア長への影響

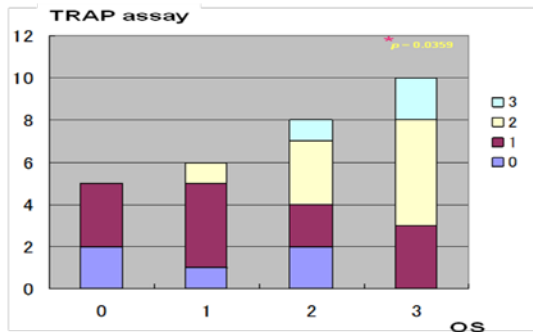
テロメア PNA プローブを用いて組織 FISH を行い、肝細胞癌のテロメア長を測定した。テロメア長と酸化ストレスの程度とを検討した結果、酸化ストレスの増加にともない有意に (P<0.001) テロメア長の短縮を認めた。



(3) 肝細胞癌組織における酸化ストレスのテロメラーゼ活性への影響

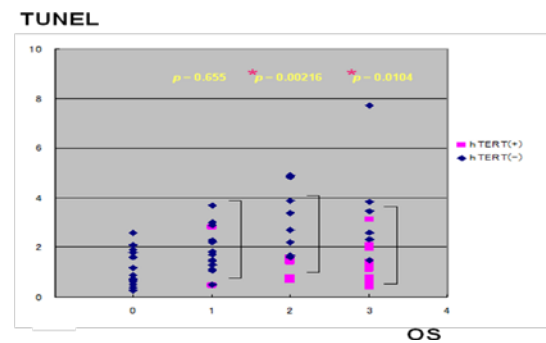
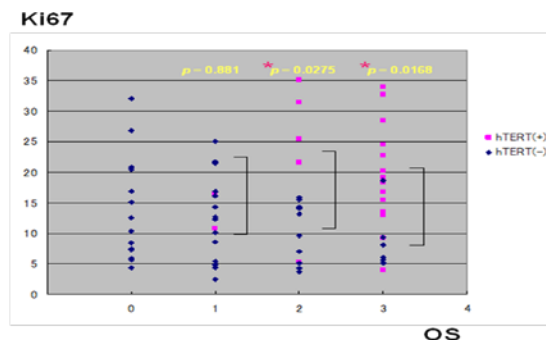
肝細胞癌組織を用いてhTERTの免疫染色およびTRAPassayを行い、肝細胞癌のテロメラーゼ活性の程度を評価した。テロメラーゼ活性と酸化ストレスの程度とを検討した結果、酸化ストレスの増加にともない有意に (P<0.001) テロメラーゼ活性の増加を認めた。





(4) 肝細胞癌組織における酸化ストレスおよびテロメラーゼ活性の癌病態への影響

肝細胞癌組織における酸化ストレスの程度と組織学的分化度との間には有意な関連を認めなかった。Ki67免疫染色で増殖活性、TUNEL法でアポトーシスを評価したところ、酸化ストレスの程度が強い組織 (OS2-3) ではテロメラーゼ活性の程度により増殖活性・アポトーシスの頻度に有意差 ($P < 0.05$) を認めた。



(5) 肝細胞癌組織におけるテロメラーゼ活性制御因子・抗酸化系酵素の解析

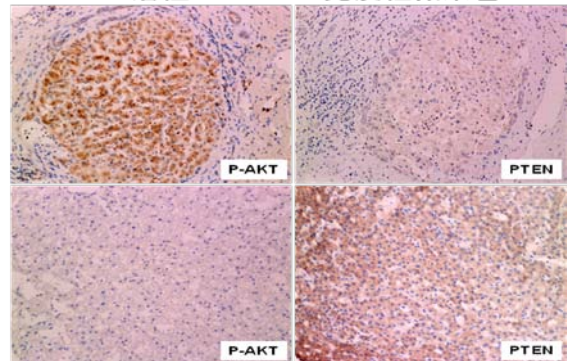
Akt, p53, c-myc, SIP1, Mad1, TGF- β 等のテロメラーゼ活性制御因子、SOD, GSH, TRX, GSH peroxidase, TRX peroxidase, catalase 等の抗酸化系酵素の発現をISHで解析した。これらの因子の発現の有無と h TERT の発現の有無、テロメラーゼ活性の程度、酸化ストレスの程度との関連を統計学的に解析したが、有意な因子は認めなかった。結果、この検討では、肝細胞癌組織においてテロメラーゼ活性の増加および酸化ストレスが生じる

機序については不明であった。

(6) 肝細胞癌組織におけるテロメラーゼ活性制御シグナルの解析

Akt, ERK1/2, JNK等のテロメラーゼ活性の増加に関わるシグナルについて、免疫組織染色を行い、その活性について検討した。結果、酸化ストレスの程度の増加に伴い、肝細胞癌組織においてAkt活性が有意に増加していた ($P < 0.005$)。またAkt活性化の抑制因子であるPTENの発現も有意に低下していることが明らかとなった ($P < 0.005$)。

AKT活性とPTENの免疫組織染色

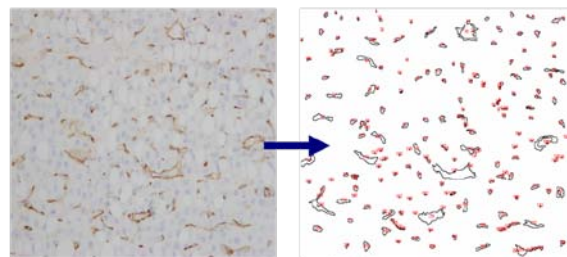


	OS 0	OS 1	OS 2	OS 3	P-value
PTEN (N / P)	3 / 12	4 / 13	8 / 7	15 / 6	0.00435 *
P-AKT (N / P)	14 / 1	13 / 4	10 / 5	6 / 15	0.00013 *

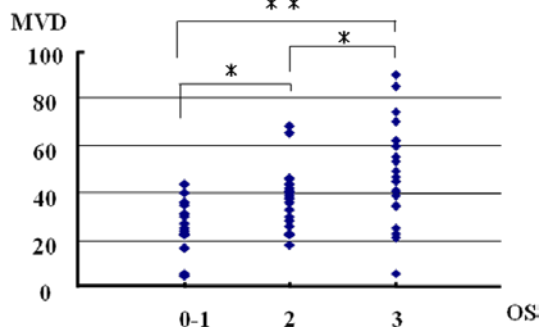
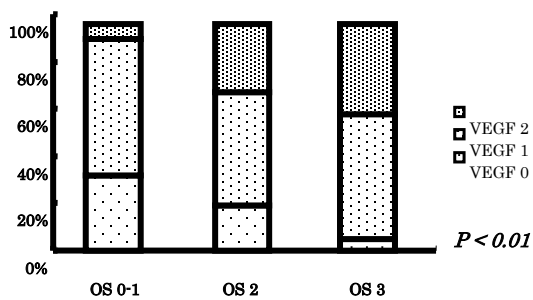
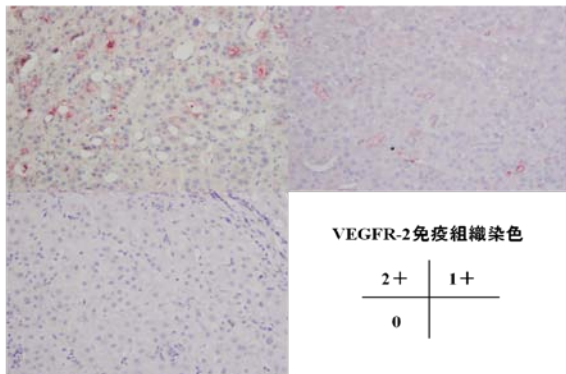
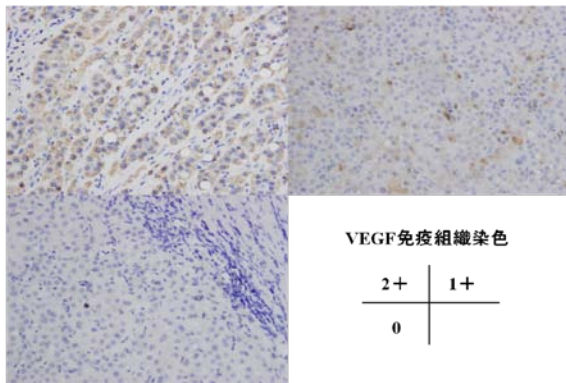
(7) 肝細胞癌組織における酸化ストレスの血管新生への影響

Akt の下流のシグナルには血管新生因子 VEGF が報告されており、次に肝細胞癌組織における酸化ストレスと血管新生の関連について検討を行った。新生血管については CD31 の免疫組織染色を行い、画像解析により評価した。また VEGF、VEGF receptor2 の発現も免疫組織染色により評価した (染色の程度により 3 段階に分類した)。結果、肝細胞癌組織において酸化ストレスの程度が強くなるのに伴って VEGF の発現が増加し、また新生血管の数も増加することが判明した。

CD31免疫組織染色



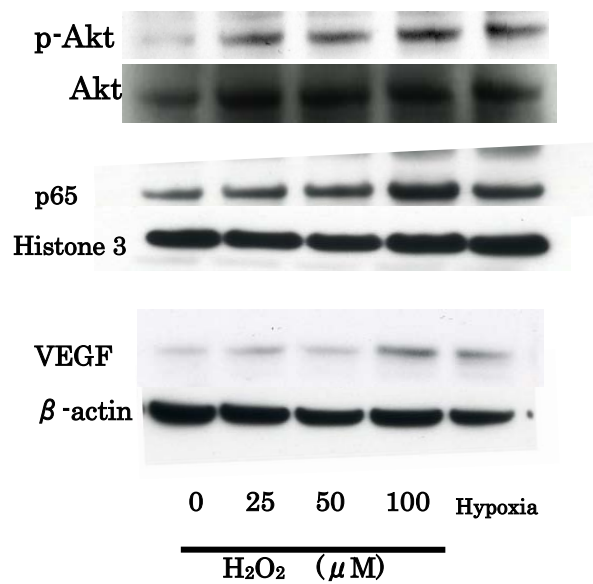
Microvessel density (MVD)=221



(8) ヒト肝癌細胞株での酸化ストレスと血管新生についての検討

ヒト肝癌細胞株HLEをH2O2添加下にて培養し、酸化ストレスがAKTの活性化、およびその下流の因子にどのように影響を与えるかについて検討した。結果、H2O2の添加量に対して濃度依存性にAKTの活性化、NF-κB活性化、VEGFの発現増加が認められ、ヒト肝癌

組織での解析結果と一致するものであった。



以上の結果より、本研究は、肝細胞癌組織において酸化ストレスは高い頻度で存在し、AKTの慢性的な活性化を介して、テロメラーゼ活性化や血管新生因子の増加を引き起こし、癌病態の悪性化に寄与していることを明らかにした。肝細胞癌の悪性化因子としての酸化ストレスの意義を明らかにしたのに加え、肝細胞癌に対する新たな治療法として抗酸化療法の有用性について、その可能性を示した点で意義があったと考える。

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2件)

- ① 西川 太一郎、肝細胞癌における酸化ストレスとテロメア・テロメラーゼの検討、Frontiers in Gastroenterology、13:90-94、2008、査読あり
- ② Nishikawa T、Nakajima T、Katagishi T、Okada Y、Jo M、Okanoue T、Kagawa K、Yoshikawa T、Oxidative stress may enhance the malignant potential of human hepatocellular carcinoma by telomerase activation、Liver International、in press、2009、査読あり

[学会発表] (計3件)

- ① 西川 太一郎、中島 智樹、片岸 達夫、岡田 頼久、城 正泰、森口 理久、安

居 幸一郎、南 祐仁、伊藤 義人、香川 恵造、岡上 武、肝細胞癌における酸化ストレスとテロメラーゼ活性の検討、第43回日本肝臓学会総会、平成19年5月31日、東京

② 城 正泰、西川 太一郎、中島 智樹、岡田 頼久、安居 幸一郎、南 祐仁、伊藤 義人、香川 恵造、岡上 武、肝細胞癌における酸化ストレスと腫瘍血管新生の関連の検討、第15回日本消化器関連学会週間、平成19年10月19日、神戸

③ 西川 太一郎、中島 智樹、城 正泰、岡田 頼久、奥田 隆史、杉山 祐介、半田 修、高木 智久、伊藤 義人、吉川 敏一、肝細胞癌における酸化ストレスとテロメア・テロメラーゼの検討、第61回日本酸化ストレス学会学術集会、2008年6月20日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 太一郎 (NISHIKAWA TAICHIRO)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：90433250