

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861178

研究課題名(和文) Na⁺,K⁺-ATPaseの発現上昇に着目した肝細胞癌の新規分子標的の探索的研究研究課題名(英文) Study of searching of the new molecular target of the hepatocellular carcinoma overexpression of Na⁺,K⁺-ATPase

研究代表者

渋谷 和人 (Shibuya, Kazuto)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：50636248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：当教室で肝細胞癌(HCC)と診断され肝切除が施行された症例の切除標本から肝細胞癌組織を採取して、癌細胞株の樹立を試みてきた。現在までに継代に至った細胞株はない。一方で、我々はこれまでにNa⁺,K⁺-ATPase 3サブユニット(3NaK)が、HCCにおいて発現上昇していることを報告した。肝細胞癌組織アレイを用いて3NaKの免疫染色を行い、染色結果をスコアリング化してHCCの臨床データベースと比較、統計学的解析を行った結果、a3NaKの発現はその悪性度、予後に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We gathered specimens of hepatocellular carcinoma(HCC) from the cases diagnosed HCC, who had performed hepatectomy in our department. Informed consent was obtained from all patients. We aimed establishment of novel cell line of HCC, but to this day, We can not reach the establishment it. On the other hand, we previously reported over expression of Na⁺,K⁺-ATPase 3-isoform(3NaK) in HCC, in comparison with the normal liver. We immunostained tissue array of HCC using an antibody of 3NaK, and scored each intensity of expression. As a result, it suggested that the expression of a3NaK was related the differentiation and prognosis of HCC.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：肝細胞癌 Na⁺,K⁺-ATPase 3-サブユニット 組織アレイ

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (HCC) は肝に発生する悪性腫瘍の 94.5% を占める疾患で、近年著しい増加がみられ現在年間 3 万人を超える死亡数が続いている。肝細胞癌のほとんどが B 型肝炎ウイルス (HBV) および C 型肝炎ウイルス (HCV) の持続感染による慢性肝疾患を発生母地としており、ウイルス感染に伴う長期間にわたる肝細胞の壊死、炎症、再生を繰り返す課程で細胞内にジェネティック、エピジェネティックな遺伝子異常が集積されて発症すると考えられている。しかしウイルス感染に関与しない発癌課程を含め、その詳細については不明な点が残されている。

Na^+, K^+ -ATPase は細胞の原形質膜に存在する膜タンパク質である。ほとんどの細胞に存在し、細胞内外の Na^+ 、 K^+ の濃度勾配や膜電位の形成に寄与しており、細胞の恒常性を保つ重要なタンパク質である。 α -サブユニットと β -サブユニットから構成され (Am J Physiol Ren Physiol; 1998; 275: F633-F650) 触媒作用を持つ α -サブユニットには少なくとも $\alpha 1$ ($\alpha 1\text{NaK}$)、 $\alpha 2$ ($\alpha 2\text{NaK}$)、 $\alpha 3$ ($\alpha 3\text{NaK}$)、 $\alpha 4$ ($\alpha 4\text{NaK}$) の 4 つのアイソフォームがある。さらにそれぞれのアイソフォームは分布に組織特異性があることが報告されており、 $\alpha 1\text{NaK}$ はほぼすべての細胞に発現し、 $\alpha 2\text{NaK}$ は脂肪細胞、骨格筋、心臓、脳に、 $\alpha 3\text{NaK}$ は神経組織に、 $\alpha 4\text{NaK}$ は精巣に存在することが知られている (Am J Physiol Ren Physiol; 1998; 275: F633-F650)。近年、膠芽腫 (Neurosurgery; 2008; 62: 211-222)、肺非小細胞癌 (J Pathol; 2007; 212: 170-179) では $\alpha 1\text{NaK}$ の発現が上昇すること、腎明細胞癌では $\alpha 1\text{NaK}$ の発現低下の程度と腫瘍の悪性度との相関 (J Uro; 2008; 179: 338-345) また大腸癌では $\alpha 1\text{NaK}$ の発現が減少する一方で $\alpha 3\text{NaK}$ の発現は上昇し、かつ Na^+, K^+ -ATPase 活性が減少する (FEBS Lett; 2004; 563: 151-154) など、種々の癌との関連が報告されている。さらに $\alpha 1\text{NaK}$ が発現上昇するグリオブラストーマや肺非小細胞癌においては Na^+, K^+ -ATPase のリガンドとなる新規の強心配当体によって癌細胞の増殖や遊走が阻害され、 $\alpha 1\text{NaK}$ が癌治療のターゲットタンパク質になり得るとする報告もある。

このように Na^+, K^+ -ATPase は単に原形質膜を介した Na^+ と K^+ の輸送だけを担うのではなく、癌の生物学的動態に関与することが示唆されているタンパク質であり、肝細胞癌との関連の解析も臨床的に重要なものと考えられ、本研究を立案した。

2. 研究の目的

前述のように、 Na^+, K^+ -ATPase α -サブユ

ニットには 4 つのアイソフォームがある。我々はこれまでに、このうち $\alpha 3\text{NaK}$ は HCC において、正常肝よりも高発現し、かつ HCC における Na^+, K^+ -ATPase の活性は正常肝よりも統計学的に有意に上昇していることを見出し、報告した (Eur J Pharmacol; 2010; 638: 42-46)。この活性の上昇は、ひとえに $\alpha 3\text{NaK}$ の発現上昇によるものと考えられる。

本研究はこのサブユニットの高発現および活性の上昇が発癌機構とどのように関連しているか、また臨床病理学的因子や予後とどの程度関連するかを探索し、さらに $\alpha 3\text{NaK}$ が新たな分子標的となりうることを示すことが目的である。これが分子標的となることを示せば、 $\alpha 3\text{NaK}$ 自体が癌組織特異的に発現することを利用することにより、より正常細胞へのダメージの少ない新規の分子標的薬の開発の足がかりとなると確信している。

3. 研究の方法

(1) HCC 組織、肝組織の採取と臨床データの蓄積

当教室では過去に 150 例を超える HCC の手術症例があり、現在も日常的に HCC 手術は行われている。当教室で HCC と臨床的に診断され、肝切除が行われた症例の切除標本から、HCC 組織と非癌部肝組織を採取し、-80 freezer で保存する。得られた組織は匿名化し、術前術後の採血結果 (血小板数、GOT、GPT、術前 stage、child-pugh 分類、ICG、LDH、T-Bil、D-Bil、AFP、PIVKA) 手術術式、切除病理結果、術後 stage、手術日、再発日、再発形式、死亡日を随時調査記録した。

(2) HCC 培養細胞の樹立

これまでに当教室では、手術切除標本から胆嚢癌、胆管癌、膵癌、GIST の培養細胞株の樹立に成功している。

HCC の新規培養細胞株の樹立も目指した。方法としては、清潔操作で採取した HCC 組織をリスペーゼで分解し、遠心。その後の沈殿から癌細胞成分を分離して、10% FCS を添加した medium を用いて、37℃、5% CO_2 存在下で培養を行った。

(3) 肝細胞癌組織アレイの免疫染色

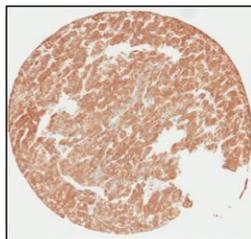
組織アレイはひとつのプレパラート上に多数の症例の組織がセットされることで、一度の染色でプレパラート上に存在する多数の症例の染色結果を得ることのできるツールであり、比較的新しい研究技術である。当教室ではこれまでに胆管癌、胆嚢癌、乳頭癌、胃癌、大腸癌、膵癌、肝転移の組織アレイを作成しておりそれぞれの分野での研究に用いている。HCC でも過去のパラフィン包埋組織から組織アレイを作成している。

過去に当教室で肝切除を施行した肝細胞癌症例 190 例中、組織アレイに搭載され評価が可能であったのは 129 例であった。そのうち術前治療のない初回肝切除症例 85 例 (stage1 : 10 例、2 : 46 例、3 : 25 例、4 : 4 例) を対象とした。

α 3NaK の抗体を用いて、この組織アレイの免疫染色を行い、各スポットを染色強度 (0 : 染色なし、1 : 弱染色、2 : 中染色、3 : 強染色) 染色分布 (0 : なし、1 : 50% 未満、2 : 50% 以上) で評価 (図 1) し、両者の和の 5 段階でスコアリングし、各臨床病理学的因子との関連を解析した。代表例を、図 2 図 3 に示した。

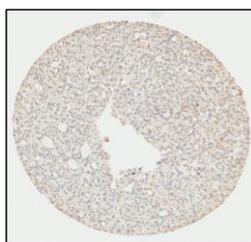


(図 1)



強度:3 分布:2
スコア:5

(図 2)



強度:1 分布:2
スコア:3

(図 3)

4. 研究成果

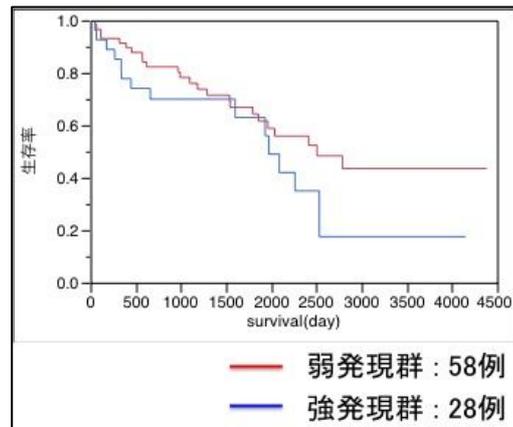
(1) HCC の培養細胞株はウイルス感染の問題から容易ではない。しかし近年はアルコール性肝障害や NASH を背景とした HCC の手術症例が増えており、そのような症例からのサンプルを対象として HCC の培養細胞株の作成をすすめた。これまでに合計 4 症例のサンプルから、初代培養を行ったが、継代まで至ったサンプルはなかった。限られた症例数のなかでサンプルが思うように増えなかったことや培地が適正でなかったことなどが要因として挙げられるが、今後も新規培養細胞株の樹立は継続していく。

(2) HCC 組織アレイの免疫染色後、各スポットをスコアリングして、 α 3NaK の発現スコアは 0 : 5 例、2 : 5 例、3 : 47 例、4 : 18 例、5 : 10 例であった。

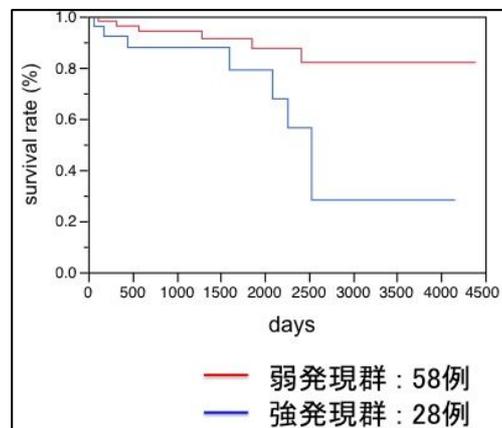
発現スコア 0-3 群を弱発現群、4-5 群を強発現群に分けて各臨床病理学的因子との比較検討を行った。

すると、強発現群では有意差を持って低分化型が多かった ($p=0.0198$)。

また、生存率の比較を各群間で行ったところ、overall survival では有意差はなかった (図 4) もの、disease-specific survival では、高発現群が有意差を持って低い結果 (図 5) となった。



(図 4)



(図 5)

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)

[学会発表] (計 1 件)

肝細胞癌における Na⁺, K⁺-ATPase 発現の臨床的意義の検討

渋谷和人、松井恒志、森山亮仁、大澤宗土、橋本伊佐也、神山公希、北條莊三、吉岡伊作、奥村知之、澤田成朗、吉田 徹、長田拓哉、塚田一博

第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014 年
4 月 3 日～4 月 5 日 京都

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 和人 (SHIBUYA, Kazuto)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号 : 50636248