



Different apoptotic regulation of trail-caspase pathway in hbv- and hcv- related hepatocellular carcinoma

矢野, 嘉彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2745

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002745>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 97 】

氏名・(本籍) 矢野 嘉彦 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博い第1492号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

Different apoptotic regulation of TRAIL-caspase pathway
in HBV-and HCV-related hepatocellular carcinoma
(B型およびC型肝炎における異なったアポトーシス制御機構)

審査委員

主査 教授 横崎 宏

教授 春日 雅人

教授 前田 盛

背景と目的

アポトーシス機構の破綻は、さまざまな腫瘍の発生につながるとされている。TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)は TNF family の1つであり、TRAIL/TRAIL-R は Fas/FasL system と同様にアポトーシスを誘導する major pathway の1つである。FasL や TNF-alpha と違い、TRAIL の受容体は数種類存在することがわかっており、decoy 受容体の存在により TRAIL は正常細胞ではなく腫瘍細胞のみにアポトーシスを選択的に誘導する特徴をもっている。ヒト肝臓でも TRAIL はアポトーシスを誘導することが証明されており、また TRAIL 受容体は HCC cell line にもその発現が確認されている。

B 型肝炎と C 型肝炎には臨床的にもさまざまな違いがあるが、HBV の X 蛋白や HCV の core 蛋白など、その肝発癌に関わる oncogene が異なるため、その発癌メカニズムも異なっているとされている。Apoptosis の側面から B 型 C 型肝炎での発癌メカニズムの違いを検討するため、我々はヒト肝細胞癌症例を用いて caspase-3 活性と TRAIL 受容体の発現を検討した。

対象と方法

1996 年から 2001 年までに神戸大学消化器外科において外科的切除によって得られた肝細胞癌 27 例 (B 型 10 例: 高分化癌 1 例・中分化癌 9 例、C 型 17 例: 高分化癌 6 例・中分化癌 8 例・低分化癌 3 例) を対象とした。各症例とも癌部・非癌部に分けて凍結保存し、解析に使用した。

まず各組織における Caspase-3 活性を測定した。活性は site specific な蛍光基質 (DEVD-AMC) を使い、Fluoromark plate reader (Bio rad) によって測定した。次に各 TRAIL 受容体に対する特定のプライマーを作成し、RT-PCR を行った。その後定量的に評価するために、Sequence Detector (ABI PRISM 7700) を用いて定量的 PCR を行い、 β アクチンの結果をもとに定量値を補正した。またその発現を免疫染色によっても半定量的に評価した。評価を単純化するために、染色結果は 2 段階 (弱発現と強発現) に分類した。

結果は (平均 \pm 偏差) で表記し、統計的解析には T 検定を用いた。Caspase-3 活性と TRAIL 受容体 mRNA の相関は Pearson's correlation coefficient test を使い、 $p < 0.01$ を統計学的有意とした。

結果

① Caspase-3 の活性と発現

肝癌全例において、Caspase-3 活性は癌部 (1.36 ± 0.98) では非癌部 (2.04 ± 1.16) よりも有意に低下していた。B 型肝炎にそれは顕著であり (癌部: 1.07 ± 0.63 、非癌部: 2.96 ± 1.30)、C 型肝炎では有意差は見られなかった (癌部: 1.53 ± 1.12 、非癌部: 1.51 ± 0.65)。また、癌部 Caspase-3 活性と腫瘍の大きさや分化度の間には有意な相関は見られなかった。非癌部 Caspase-3 活性と非癌部組織の Grade, Stage にも明らかな相関は見られなかった。Caspase-3 の免疫染色でも B 型肝炎では 7 例 (70%) で癌部の発現が低下していたのに対して、C 型肝炎では癌部の発現が非癌部よりも低下していたのは 3 例 (18%) のみで、6 例 (35 例) は逆に癌部での発現が亢進していた。

② TRAIL 受容体の発現

次に各 TRAIL 受容体の発現を RT-PCR により確認した。4 種類の TRAIL 受容体の発現は、B 型肝炎では癌部組織においていずれも非癌部よりも低下していたが、C 型肝炎では癌部での明らかな発現低下は見られなかった。また癌部組織における Decoy 受容体 (R3 と R4) の有意な発現低下は見られなかった。これは Real time PCR によっても定量的に確認された。また各受容体の免疫染色では、数例の C 型肝炎例において TRAIL-R1, -R2 は癌部に強い発現を認めたが、B 型肝炎では殆どの症例で癌部での発現低下が認められた。TRAIL-R3, -R4 の発現は、癌部非癌部間に違いは見られなかった。

③ Caspase-3 活性と TRAIL 受容体 mRNA 発現量の相関

最後に Caspase-3 活性と Real-time PCR で得られた TRAIL 受容体 mRNA 発現量の相関を調べた。癌部・非癌部とも Caspase-3 活性と TRAIL-R1, -R2 mRNA 発現量

には有意な相関を認めた。Caspase-3 活性と decoy 受容体には相関は見られなかった。

考 察

近年、HBx 蛋白が細胞内シグナルを活性化するとともに p53 を抑制して apoptosis を抑制することを通じて肝発癌に関連していると言われている。我々の検討では B 型肝炎では有意に癌部の caspase 活性が低下しており、この結果は癌部において HBV そのものが apoptosis を抑制するというこれまでの見解を示唆するものである。一方、C 型肝炎では HCV core 蛋白が肝発癌に関係するとされているが、apoptosis を抑制するか否かは未だ見解が分かっている。今回の結果でも C 型肝炎では癌部の apoptosis は必ずしも抑制されておらず、C 型肝炎では host の免疫反応などさまざまな因子が絡んでいるためではないかと考えられた。

TRAIL は新たに同定された TNF superfamily の一つであり、腫瘍細胞のみに apoptosis を誘導する選択性を有しているとされる。さまざまな腫瘍において、decoy 受容体の欠如が正常細胞の turnover を破綻させ、癌化につながるとされている。しかし今回の結果では明らかには腫瘍細胞に decoy 受容体の発現低下は見られなかった。他の腫瘍と違い、肝細胞癌はほとんどが慢性肝炎をもとに発生しており、非癌部組織もまた何らかの carcinogenic attacks を受けているためではないかと考えられた。今回の結果では、TRAIL-R1,-R2 と caspase 活性に有意な相関を認め、肝癌においては TRAIL-R1,-R2 が apoptosis の重要な regulator であると考えられた。

いくらかの腫瘍では、TRAIL と抗癌剤の combination therapy の有効性が報告されている。今回の結果では、C 型肝炎の中には TRAIL-R1,-R2 の発現が癌部に高い症例があることが示されたが、このような症例では今後 combination therapy が有効となる可能性がある。肝炎ウイルスの感染肝細胞において、decoy 受容体による apoptosis からの回避機構は未だ解明されていない。TRAIL による肝癌治療にむけても、更なる解析が必要と考えられた。

には有意な相関を認めた。Caspase-3 活性と decoy 受容体には相関は見られなかった。

考 察

近年、HBx 蛋白が細胞内シグナルを活性化するとともに p53 を抑制して apoptosis を抑制することを通じて肝発癌に関連していると言われている。我々の検討では B 型肝炎では有意に癌部の caspase 活性が低下しており、この結果は癌部において HBV そのものが apoptosis を抑制するというこれまでの見解を示唆するものである。一方、C 型肝炎では HCV core 蛋白が肝発癌に関係するとされているが、apoptosis を抑制するか否かは未だ見解が分かっている。今回の結果でも C 型肝炎では癌部の apoptosis は必ずしも抑制されておらず、C 型肝炎では host の免疫反応などさまざまな因子が絡んでいるためではないかと考えられた。

TRAIL は新たに同定された TNF superfamily の一つであり、腫瘍細胞のみに apoptosis を誘導する選択性を有しているとされる。さまざまな腫瘍において、decoy 受容体の欠如が正常細胞の turnover を破綻させ、癌化につながるとされている。しかし今回の結果では明らかには腫瘍細胞に decoy 受容体の発現低下は見られなかった。他の腫瘍と違い、肝細胞癌はほとんどが慢性肝炎をもとに発生しており、非癌部組織もまた何らかの carcinogenic attacks を受けているためではないかと考えられた。今回の結果では、TRAIL-R1,-R2 と caspase 活性に有意な相関を認め、肝癌においては TRAIL-R1,-R2 が apoptosis の重要な regulator であると考えられた。

いくらかの腫瘍では、TRAIL と抗癌剤の combination therapy の有効性が報告されている。今回の結果では、C 型肝炎の中には TRAIL-R1,-R2 の発現が癌部に高い症例があることが示されたが、このような症例では今後 combination therapy が有効となる可能性がある。肝炎ウイルスの感染肝細胞において、decoy 受容体による apoptosis からの回避機構は未だ解明されていない。TRAIL による肝癌治療にむけても、更なる解析が必要と考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1508号	氏名	矢野 嘉彦
論文題目	Different apoptotic regulation of TRAIL-caspase pathway in HBV-and HCV-related hepatocellular carcinoma B型およびC型肝炎における異なったアポトーシス制御機構		
審査委員	主 査 横 崎 宏 副 査 春 日 推 人 副 査 前 田 盛		
審査終了日	平成 15 年 2 月 2 / 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

論文審査の結果の要旨

本研究は神戸大学消化器外科において外科的切除によって得られた肝細胞癌 27例(B型10例:高分化癌1例・中分化癌9例、C型17例:高分化癌6例・中分化癌8例・低分化癌3例)を対象とした in vivo study である。

ヒト肝細胞癌において、その背景にある HBV と HCV には大きな違いがあり、その発癌メカニズムも大きく異なっているとされている。本研究では、腫瘍発生につながるアポトーシス制御機構のうち、TNF family の1つである TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) 受容体に焦点をあてている。TRAIL/TRAIL-R は Fas/FasL system と同様にアポトーシスを誘導する major pathway の1つであるが、TRAIL 受容体は数種類存在し、decoy 受容体の存在により TRAIL は正常細胞ではなく腫瘍細胞のみにアポトーシスを選択的に誘導する特徴をもっている。ヒト肝臓でも TRAIL はアポトーシスを誘導することが証明されており、また TRAIL 受容体は 肝細胞癌細胞株 にもその発現が確認されている。本研究では、ヒト肝細胞癌症例を用いて caspase-3 活性と TRAIL 受容体の発現を検討するとともに、定量的に解析した。

肝癌全例において、Caspase-3 活性は癌部では非癌部よりも有意に低下していたが、B型肝炎にそれは顕著であり、C型肝炎では有意差は見られなかった。Caspase-3 の免疫染色でも B型肝炎では殆どの例で癌部の発現が低下していたのに対して、C型肝炎では癌部の発現が非癌部よりも亢進する例が比較的多く見られた。RT-PCR では、4種類の TRAIL 受容体の発現は、B型肝炎では癌部組織においていずれも非癌部よりも低下していたが、C型肝炎では癌部での明らかな発現低下は見られなかった。また癌部組織における Decoy 受容体 (R3 と R4) の有意な発現低下は見られなかった。これは Real time PCR によっても定量的に確認された。また各受容体の免疫染色では、数例の C型肝炎例において TRAIL-R1,-R2 は癌部に強い発現を認めたが、B型肝炎では殆どの症例で癌部での発現低下が認められた。

TRAIL-R3,-R4 の発現は、癌部非癌部間に違いは見られなかった。最終的に、癌部・非癌部とも Caspase-3 活性と TRAIL-R1,-R2 mRNA 発現量には有意な相関を認めたと、Caspase-3 活性と decoy 受容体には相関は見られなかった。

このことから、ヒト肝細胞癌において、Caspase-3 活性すなわちアポトーシスと TRAIL 受容体 (TRAIL-R1,-R2) が有意な相関を持つことが明らかとなった。また背景肝の側面から、このアポトーシスは B 型肝癌では有意に癌部で低下しており、これには TRAIL-R1,-R2 の発現低下が関与していることが示唆された。逆に C 型肝癌では癌部のアポトーシスが亢進している例が見られ、そのような例では TRAIL 受容体の発現が亢進していることも明らかとなった。

本研究は、肝細胞癌のヒト臨床検体を用いて、その背景肝 (B 型肝炎および C 型肝炎) の違いに基づいてアポトーシスの違いを検討したものであるが、従来ほとんど行われなかった TNF family 受容体に属する TRAIL 受容体の発現を検討することによって、TRAIL 受容体発現と B 型 C 型肝癌のアポトーシスの関係についての重要な知見を得たものとして価値のある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。