

論文の内容の要旨

論文題目 肝細胞増殖における α -taxilin の発現
—正常および悪性増殖細胞における意義の検討—

指導教員 小俣政男教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

大友夏子

背景)

肝臓は高い再生能力をもち、機能的・量的減少に応じて静止期にある成熟肝細胞が増殖を開始する。肝臓の再生は臨床的にもきわめて重要である。

細胞増殖は近年、小胞輸送との関連が注目されている。小胞輸送は細胞内物質輸送機構の一つであり、内容物を移動させることにとどまらず、細胞増大、細胞内小器官の恒常性維持、細胞運動などにも関与するとされる。増殖においては細胞質分裂に関与するとされ、発癌との関連も示唆されている。

近年、小胞輸送機構の主要な構成要素である syntaxin に結合する分子として新たな蛋白が発見され taxilin と命名された。機能は不明だが、アイソフォームの一つである α -taxilin は、胎生期ラット中枢神経組織での強発現が認められ、神経幹細胞/前駆細胞への局在が示された。またヒト神経膠腫での mRNA 増加が報告され、細胞増殖に何らかの役割を有する可能性が示唆される。

本研究は α -taxilin 発現の意義を正常および悪性の肝細胞増殖との関連において明らかにすることを目的とする。

方法)

1. 抗体

抗ラット α -taxilin 抗体、抗ヒト α -taxilin 抗体は獨協医科大学分子細胞生物学教室白瀧博通教授から供与を受けた。

2. 正常肝細胞増殖における α -taxilin の発現

2-1. ラット初代培養肝細胞での検討

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット(6週令)よりコラゲナーゼ灌流法によって肝細胞を単離し、低密度(2.5×10^4 cells/cm²)および高密度(1.0×10^5 cells/cm²)で単層培養した。播種直前、3、12、24、36時間後に回収し、肝細胞中の α -taxilin 発現量を Western blotting (WB) により解析した。

同様に低密度、高密度で肝細胞を単層培養し、播種 15 時間後 HGF 20 ng/ml を添加した。さらに 12 時間および 24 時間培養した後に回収して肝細胞中の α -taxilin 発現量を WB により解析した。また HGF 添加 21 時間後に 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) を添加して 6 時間培養し、肝細胞への BrdU 取り込みを ELISA 法で測定した。

2-2. ラット 2/3 部分切除肝での検討

SD 系雄性ラット(5週令)に 2/3 部分肝切除術を行い、0~7 日後に肝臓を採取し、 α -taxilin 発現量の経時的变化を WB により解析した。

また、2/3 部分肝切除術 0、12、24、48 時間後、およびシャム手術 24 時間後、肝臓を経門脈的に灌流固定してパラフィン包埋切片を作成した。 α -taxilin および細胞増殖マーカーである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の肝小葉内局在の経時的变化を免疫組織染色で検討した。

3. 悪性肝細胞増殖における α -taxilin の発現

3-1. 患者背景

2003 年 5 月から 2008 年 10 月に東京大学医学部附属病院肝胆膵外科において肝細胞癌に対し肝切除術を行った患者から、術前治療歴がない症例および診断目的でのリピオドール注入のみを行った症例を対象として 29 人を抽出した。男

性 24 人、女性 5 人、年齢の中央値 68.0 歳（範囲 45～76 歳）、腫瘍分化度は優勢な成分に従って「原発性肝癌取り扱い規約（第 5 版）」に基づいて分類し、高分化 8 例、中分化 11 例、低分化 10 例であった。

3-2. 免疫組織染色による検討

多発例は最大の結節を対象とし、29 結節についてパラフィン包埋切片を用いて α -taxilin および PCNA の免疫組織染色を行った。 α -taxilin の染色強度を 4 段階に分類して半定量的に評価した。 α -taxilin の染色強度と PCNA labeling index (PCNA-LI)、臨床的および病理学的因子の関連を統計学的に検定した。

3-3. Western blotting による検討

代表的な症例の腫瘍部および近傍の非腫瘍部から肝切除後ただちに組織片を採取し凍結保存し、 α -taxilin 発現量を WB により解析した。

3-4. ヒト肝癌由来株化細胞での検討

PLC/PRF/5、HuH-6、HepG2 を血清存在下で培養し、増殖期に回収して α -taxilin 発現量を WB により解析した。また MTT アッセイ変法によってこれら細胞株の増殖曲線を作成し、 α -taxilin 発現量と細胞増殖速度の関連を検討した。

結果と考察)

1. ラット初代培養肝細胞での検討

低密度培養では、播種後、時間経過とともに α -taxilin 発現量が増加し、HGF 添加によってさらなる増加と DNA 合成促進を認めた。高密度培養では経時的増加はわずかで、HGF による変化は認めなかった。

肝細胞は単離によって G0 期から G1 期に移行し、増殖因子のない条件では G1 期にとどまり、S 期への移行には増殖因子を必要とする。増殖因子への反応は播種密度に影響され、低密度では DNA 合成が促進されるが、高密度では DNA 合成促進が認められず、cell-cell contact による増殖抑制機構が推定される。

低密度培養において HGF 添加前から経時的な α -taxilin の増加が認められたことから、増殖に向かっている肝細胞で、DNA 合成に先行する α -taxilin 増加が

示唆された。

2. ラット 2/3 部分切除肝での検討

部分肝切除 4 時間後には肝の α -taxilin 量はすでに増加し、肝細胞の DNA 合成のピークである 24 時間後にピークに達し、5~7 日後には術前レベルまで減少した。肝再生初期から上昇を開始していると思われ、初代培養肝細胞での検討と合致した。

免疫組織染色において、 α -taxilin の肝小葉内局在は、肝切除 24 時間後には門脈周囲のほぼすべての肝細胞で陽性であったが、中心静脈周囲にはほとんど認められなかった。48 時間後には陽性細胞数は減少したものの、分布は小葉全体に拡大した。PCNA 染色との対比では、術後約 24 時間では分布がほぼ一致した。術後 48 時間では PCNA 陽性細胞は小葉全体に広がった。

部分肝切除後の肝細胞増殖は門脈周囲から始まり、約 36~48 時間後には中心静脈周辺へと広がるとされる。 α -taxilin は肝細胞の細胞質に発現し、さらに肝小葉内分布とその経時的変化、PCNA 発現との対比から、 α -taxilin が増殖肝細胞に発現していることを確認できた。

細胞増殖における α -taxilin の役割が小胞輸送に関連して細胞質分裂に関与するものであれば発現のピークは M 期以降と予想されたが、初期からすでに発現増加が始まっており、主体は G1 期から S 期と考えられた。

3. 肝細胞癌における α -taxilin の発現

免疫組織染色では腫瘍部に α -taxilin の発現を認め、その染色強度は PCNA-LI と相関し、染色細胞分布も PCNA と類似していた。 α -taxilin 染色強度は腫瘍分化度、腫瘍の侵襲性とも有意に相関し、 α -taxilin の染色強度が高い腫瘍はより分化度が低く、侵襲性の高い傾向が示された。Kaplan-Meier 法による無再発生存期間の解析では、 α -taxilin の染色強度が高い腫瘍で比較的早期の再発が多い傾向がみられた。

WB では低分化肝細胞癌の腫瘍部でも α -taxilin が高発現していた。

肝癌由来株化細胞を用いた検討では、 α -taxilin の発現量の多い細胞株ほど増殖速度が速いという結果が得られた。

種々の悪性腫瘍で腫瘍の増殖能と病理組織学的特徴、再発や生命予後との関連が検討されている。肝細胞癌では増殖能の指標として BrdU 取り込み率、Ki-67 陽性率、PCNA-LI が用いられ、より分化度の低い腫瘍が高い増殖能を示すとされる。増殖能が高い腫瘍は侵襲性、すなわち肝内転移および脈管侵襲の陽性率が高いことが報告されており、術後再発の独立した予測因子とされる。

α -taxilin の高発現がある肝細胞癌は、より増殖能が高く悪性度が高いと考えられ、 α -taxilin がこれらの指標となりうる可能性が示された。

4. 背景肝における α -taxilin の発現

免疫組織染色で、非腫瘍部に淡い α -taxilin の染色性を認める症例が存在した。PCNA も腫瘍部より明らかに少数だが陽性細胞の散在を認め、両者の数および分布は同様の傾向を示した。WB でも背景肝に α -taxilin の発現を認める症例があった。

慢性肝炎・肝硬変においては、肝細胞壊死と再生の反復による持続的な増殖刺激が発癌の一因と考えられており、背景肝の PCNA-LI と発癌リスクの関連が検討されている。本研究において背景肝にみられた α -taxilin の染色性も PCNA との対比から肝細胞増殖を反映していると考えられる。組織学的、臨床的因子との関係に一定の傾向を見出すことはできなかったが、より多い症例数で検討することにより、背景肝の肝細胞増殖のマーカーとして臨床応用の可能性がある。

結論)

1. 正常の肝細胞増殖において α -taxilin の発現亢進を認めた。 α -taxilin の発現は初期に始まり、主体は G1 期から S 期であった。
2. 悪性の肝細胞増殖においても α -taxilin の発現が亢進しており、増殖能および腫瘍分化度と相関していた。
3. α -taxilin は、肝細胞増殖に関連した因子であると推定された。