

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790277

研究課題名（和文）肝細胞癌発生過程における細胞老化の関与とその意義に関する分子病理学的研究

研究課題名（英文）Research of cellular senescence in hepatocarcinogenesis

研究代表者

池田 博子（IKEDA HIROKO）

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：10447675

研究成果の概要（和文）：細胞老化は不可逆的な細胞周期の停止として定義されており、前癌病変におけるセネッセンス細胞の出現およびセネッセンスからの回避機序は腫瘍発生初期段階での重要なステップであると考えられている。分子病理学的に検討の結果、ヒト肝組織では肝硬変でセネッセンス関連マーカー発現細胞が出現し、肝ディスプラジア結節では消失していた。肝硬変は肝細胞癌の前癌病変である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cellular senescence is defined as the irreversible arrest of cell cycle. Senescence in premalignant lesion and escape from senescence are thought to be important the early stage of tumorigenesis. Senescence-associated markers are observed in cirrhotic liver and the markers disappear in dysplastic nodules. The results imply that the cirrhotic state already might to be premalignancy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：肝病理

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：癌、病理学、細胞老化、肝ステム細胞

1. 研究開始当初の背景

セネッセンス（細胞老化 cellular senescence）は不可逆的な細胞周期 cell cycle の停止として定義されており、細胞周期抑制制御因子である p16 や p21 が作用分子として、senescence-associated β -galactosidase (SA β -gal) が特異的マーカー

ーとして知られている。テロメア長の短縮がその重要な発生機序であると考えられているが、それ以外に癌遺伝子の活性化、酸化ストレス、DNA 損傷などがその誘導刺激因子として提唱されている。近年、発癌過程におけるセネッセンスの関与が注目されている。正常細胞に癌遺伝子発現などの発癌因子が作用すると、自己防衛機序として前癌細胞がセ

ネッセンスの状態に陥る。セネッセンスをバイパスあるいはエスケープした細胞が形質転換細胞であり、癌細胞へと進展する。従って、前癌病変におけるセネッセンス細胞の出現およびセネッセンスからの回避機序は腫瘍発生初期段階での重要なステップであると考えられている。

一方、肝細胞癌は慢性肝疾患、特に肝硬変を背景に多段階的に発生することが知られており、その前癌病変として肝ディスプラジア結節が注目されている。慢性肝疾患におけるセネッセンス細胞の同定およびセネッセンス誘導因子の解析により、肝発癌機構の解明に寄与する研究になりうると着想するに至った。

2. 研究の目的

ヒト肝発癌過程におけるセネッセンス細胞の同定により、肝癌発癌過程における細胞老化の関与を検討する。また、これまでの検討により、セネッセンス細胞では線維性隔壁（門脈域）辺縁部での局在、胆管細胞への分化能、肝細胞癌発生母地などの観点から類似点が見いだされる。肝stem細胞でのセネッセンス表現型について検討し、セネッセンス細胞との相互関係を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト肝外科的切除材料を用いて検討した。検討症例は附属病院および関連病院の患者で同意が得られた症例に限る。

セネッセンス細胞はセネッセンス特異的マーカーである senescence-associated β -galactosidase (SA β -gal) を Dimri らの方法で組織化学的に、セネッセンス関連分子である p21, p16, cyclin D1 を免疫組織学的に検索することで同定を試みた。

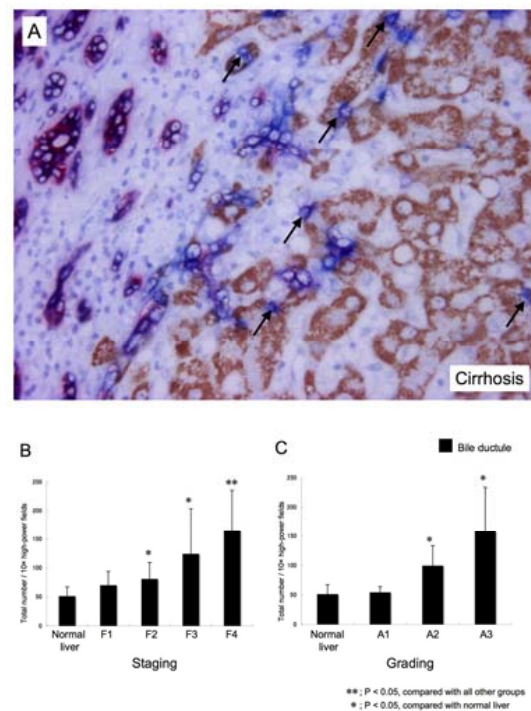
肝硬変および肝ディスプラジア結節の線維性隔壁または門脈域辺縁領域は‘血管新生’や‘間質浸潤’の観点から、肝細胞の悪性化研究において注目されている。セネッセンス関連分子と血管新生関連分子 (CD34) または肝細胞癌関連分子 (Ki-67, cyclin A) の二重免疫染色を行い、その関連性を検討した。

肝stem細胞の同定は組織学的に小型個在性細胞のうち、CK7(+)細胞として検出した。CK7 とセネッセンス関連分子との二重あるいは三重免疫染色、SA β -gal 染色との併用により、肝stem細胞マーカーとセネッセンス関連分子の関連性を検討した。

4. 研究成果

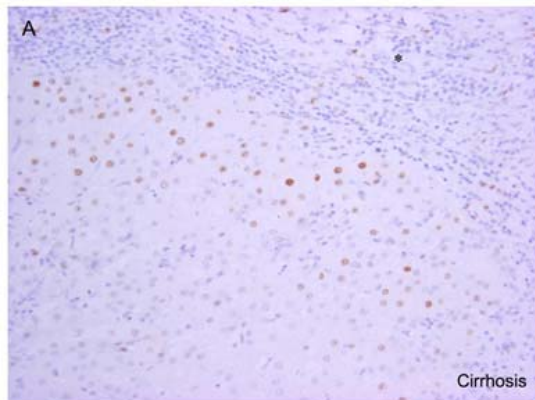
ヒト肝ホルマリン固定パラフィン包埋切片で肝細胞マーカーである HepPar I (DAB 発色)、胆管細胞マーカーである CK19 (Vector red 発色)、CK7 (Vector blue 発色) の 3 重免疫染色にて、推定上の肝stem細胞を同定した。肝stem細胞は門脈域辺縁部に存在し、慢性肝炎の進行度、活動性増加に伴い、stem細胞数は増加していた (図 1)。

Fig. 1

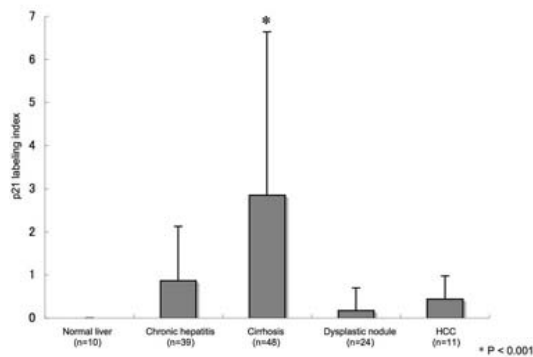


セネッセンス関連分子 (p21, p16, cyclin D1, SA β -gal) は正常肝ではほとんど認められないが、肝硬変では門脈域辺縁部の肝細胞に発現が認められた。肝ディスプラジア結節ではセネッセンス関連分子(+)細胞は肝硬変に比べて著減していた。肝発癌過程においては肝ディスプラジア結節が前癌病変とされている。腫瘍発生過程でセネッセンスは前癌病変に現れる現象とされており、肝ディスプラジア結節でのセネッセンス細胞の出現が予想されたが、肝癌発生過程においては肝硬変の肝細胞にセネッセンス関連分子の発現が最もよく認められ、肝硬変はすでに前癌病変である可能性が示唆された。また、形質転換をおこしてセネッセンス状態から脱出した細胞が悪性細胞と考えられている。この理論からは肝ディスプラジア結節は前癌病変ではなく、悪性腫瘍に相当する病変であることが示唆された (図 2)。

Fig. 2



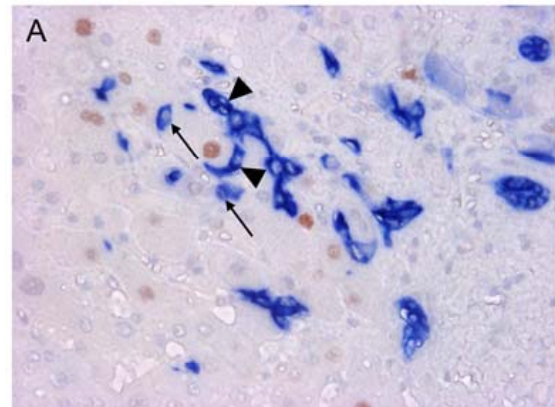
B



肝硬変において、セネッセンス関連分子発現肝細胞は隔壁辺縁部に局在していた。一方、肝ステム細胞も隔壁辺縁部に分布しており、p21 (DAB 発色) と CK7 (Vector blue 発色) の 2 重免疫染色では肝ステム細胞とセネッセンス関連肝細胞はごく近傍に位置していることがわかった。また、両者には正の相関性が認められた (図 3)。凍結切片を用いた検討でもセネッセンス関連分子である SA β -gal は隔壁辺縁部肝細胞に染色性を認めた。一方、ディスプラジア結節では SA β -gal (+) 細胞が消失した門脈域辺縁部で CK7 (+) 小型細胞が領域性に増生しており、これらの細胞はステム細胞マーカーである c-kit や CD56 が陽性である症例が認められた (図 4)。

以上より、肝硬変では前癌細胞の可能性が示唆されるセネッセンス肝細胞が肝ステム細胞と密接に関連している可能性があり、一方、肝ディスプラジア結節では肝細胞はセネッセンス状態から脱出していると思われた。肝ディスプラジア結節の一部では腫瘍内に残存する門脈域辺縁部にステム細胞類似の表現形を示す細胞集団を認め、肝ステム細胞由来の肝細胞癌が存在する可能性があるかと推察された。

Fig. 3



B

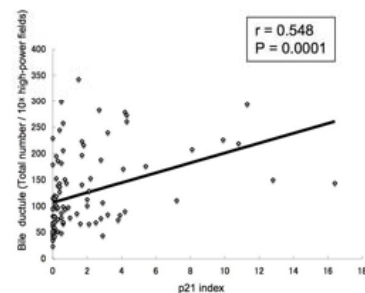
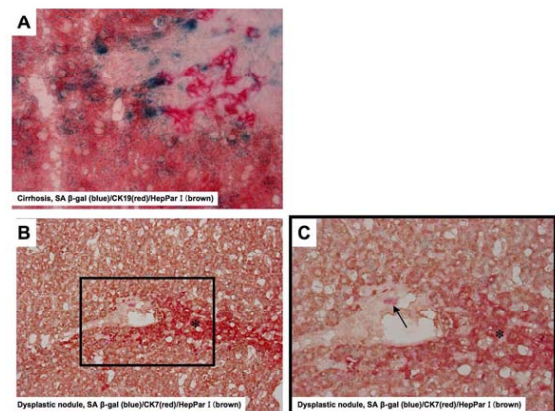


Fig. 4



以上より、本研究からは肝硬変の特に隔壁辺縁部肝細胞に premalignant potential をもつ細胞があることが推察され、さらにこれらの細胞は肝ステム細胞と深い関連がある可能性が示唆された。近年、肝ステム細胞由来の肝癌や癌ステム細胞の存在が報告されつつあり、肝ステム細胞は将来的に肝癌治療の標的となる可能性が指摘されている。今後はセネッセンス形質をもつ肝ステム細胞に

着目し、培養系を用いた動的实验で肝癌発生機構をさらに詳しく検討し、セネッセンす誘導因子や解除因子の同定・解析により、肝癌機構を明らかにしたい。

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. Ikeda H, Sasaki M, Sato Y, Harada K, Zen Y, Mitsui T, Nakanuma Y, Large cell change of hepatocytes in chronic viral hepatitis represents a senescent-related lesion, Hum Pathol, 40(2009), 1774-1782, 査読有
2. Ikeda H, Sasaki M, Sato Y, Harada K, Zen Y, Mitsui T, Nakanuma Y, Bile ductular cell reaction with senescent hepatocytes in chronic viral hepatitis is lost in hepatocarcinogenesis, Pathol Int 59(2009), 471-478, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Ikeda H, et al, Feature of the cellular senescence in large cell change of hepatocytes (liver cell dysplasia) in hepatitis B virus-related cirrhotic liver, AASLD (American Association for the Study of Liver Disease), 2008. 11. 3, Moscone West Convention Center (USA)
2. Ikeda H, et al, Involvement of escape mechanism from cellular senescence associated with activated hepatic progenitor cells in hepatocarcinogenesis, AASLD (American Association for the Study of Liver Disease), 2008. 11. 3, Moscone West Convention Center (USA)
3. 池田博子, 他, 肝細胞癌発生過程における Hepatic progenitor cell と細胞老化回避機構の関与, 第 12 回日本肝臓学会大会, 2008 年 10 月 1 日, グランドブリンズホテル新高輪 (東京)
4. 池田博子, 他, 肝細胞癌発生過程における細胞老化 cellular senescence の関与 -肝ディスプラジア結節における細胞老化回避肝細胞の局在と stem cell feature についての検討-, 第 44 回日本肝臓学会, 2008 年 6 月 5 日, 愛媛県民文化会館 (愛媛県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 博子 (IKEDA HIROKO)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号: 10447675