

非アルコール性脂肪肝炎関連肝細胞がんにおける活性型p70S6キナーゼの解析

松田 康伸¹⁾*・若井 俊文²⁾・廣瀬 雄己²⁾・坂田 純²⁾・小林 隆²⁾
大澤 まみ³⁾・藤巻 隼⁴⁾・窪田 正幸³⁾

Key words : 非アルコール性脂肪肝炎, 肝がん, p70S6キナーゼ

要旨 【目的】非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、近年急速に増加している原因不明の肝疾患である。本研究では、肝がん治療に有効とされる分子標的薬ラパマイシンの標的シグナルp70S6キナーゼが、NASH肝がんの病態に関与している可能性について検討した。

【方法】根治的外科手術療法を施行したNASH肝がん22例の病変組織に対して、リン酸化型 (活性型) p70S6キナーゼの免疫組織化学染色を行い、臨床因子・予後の比較検討を行った。

【結果】NASH肝がん22例中12例 (54.5%) がリン酸化型p70S6キナーゼを高発現しており、組織未分化度と相関した ($p = 0.047$)。リン酸化型P70S6キナーゼ高発現群は、外科切除後3年以内再発率が有意に増加していた ($p = 0.045$)。

【総括】p70S6キナーゼを高発現しているNASH肝がんは、再発頻度が高い傾向がある。同シグナルを阻害する分子標的薬ラパマイシンは、本疾患の再発防止に有効である可能性が示唆された。

緒言

肝細胞がん (肝がん) は、肺がん・胃がんに次いで世界で3番目の死亡率を呈する、予後不良な悪性疾患である¹⁾。肝がんは、他の固形がんとは大きく異なる疫学的特徴を有しており、患者の半数以上がB型肝炎ウイルス・C型肝炎ウイルスによる肝硬変に罹患している²⁾。肝硬変と肝発癌の密接な関係に関する研究は数多く報告されており、いまや肝硬変は前がん病変と同義ともみなされている¹⁾²⁾。

最近、非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) という原因不明の肝疾患が肝硬変の要因として増加しつつあり、消化器領域の大きな課題になっている。NASHは1980年にLudwig³⁾らに提唱された比較的新しい概念の肝疾患であり、i) ウイルス肝炎・自己免疫性肝炎や代謝性肝疾患の除外が可能であり、ii) アルコール飲酒歴 (20g/日以下) がな

いにも関わらず、iii) 肝細胞における脂肪蓄積および風船様腫大・肝小葉内の好中球とリンパ球浸潤・肝線維化など、アルコール性肝炎に類似した組織像を呈する疾患である。わが国では、成人の約1%がNASHに罹患していることが推定されており、NASH診断10年後における発癌率は10%程度とされる⁴⁾。本疾患の最大の課題は、有効な血清診断マーカーがないことである。NASH診断時には既に進行した肝硬変に陥っている場合が殆どであり、治療不能な進行がんを併発しているケースも少なくない。Ratziuら⁵⁾は、根治的な外科切除が可能なNASH肝がんは総患者数の1%以下に過ぎないと報告している。わが国においても、根治的治療が可能なNASH肝がん症例の報告は限定的であり、本疾患の臨床学的特徴・予後因子に関する報告は極めて少ない^{4) 5)}。

近年、分子薬理学の発展により、細胞増殖・生存に関わるシグナル経路を阻害する分子標的薬の臨床応用

- 1) 新潟大学医学部保健学科検査技術科学専攻
- 2) 新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・一般外科学分野
- 3) 新潟大学大学院医歯学総合研究科小児外科学
- 4) 新潟大学医歯学総合病院検査部

平成26年2月24日受理

が可能となってきた。肝がんにおいてもチロシンキナーゼ阻害剤sorafenib（ソラフェニブ）が既に医療現場で使用されており、一定の効果が報告されている⁶⁾。さらに最近では、新規分子標的薬rapamycin（ラパマイシン）が肝がんの有効である可能性が報告されており、各国多施設で臨床試験が施行されている⁷⁾。Rapamycinは1970年代に発見されたマクロライド系物質であり、元来は免疫抑制剤として臓器移植の際に用いられてきた。しかしながら同剤はがん細胞の生存に中心的な役割を示すセリンスレオニンキナーゼmTOR（mammalian target of rapamycin）および下流シグナル因子p70S6キナーゼの活性を阻害する作用を持つため、抗がん剤としても注目を集めている⁷⁾。NASH肝がんに対するrapamycinの有効性を確認するためには、同剤の標的シグナル（mTORやp70S6キナーゼ）が本疾患の病態にどの程度関与しているのかを解析することが重要である。

現在、NASH肝がんにおけるmTOR/p70S6キナーゼ経路に関する解析報告はない。免疫組織化学染色は病態メカニズムを組織レベルで解析できる優れた手法だが、驚くべきことに、本疾患の免疫組織染色に関する研究報告は、調べた限り僅か7論文しかない（Pubmed, Google Scholar, ProQuest Health & Medical complet）。これらNASH肝がんに関する研究では、各々サイトケラチン, PTEN, p53, survivin, 8-OHdGなどの免疫染色解析を報告しているが、その対象例は2-22例以内と極めて少なく、本疾患の臨床病理研究がいかに困難であるかを示している⁸⁾⁻¹⁴⁾。

ところで新潟県内においては、NASHの概念が臨床医家に比較的広く周知されており、2013年までに新潟大学医歯学総合病院で20例以上のNASH肝がん患者が外科切除可能な状態で受診している。本研究では、NASH肝がん22例から得られたがん組織におけるp70S6キナーゼのリン酸化（活性）レベルを免疫組織化学染色で解析し、臨床病理因子と比較することによって、rapamycinの標的シグナルがどの程度に本疾患に関与しているのか検討した。解析対象が限定されているため統計処理が困難ではあるが、根治的治療を施行し得たNASH肝がんの解析としては、過去報告と比較して最大数に匹敵するものであり、新潟県内外における本疾患に関する知識を向上させるためにも、その成果を報告する価値あるものと考えた。

方法

臨床検体

研究対象は、新潟大学医歯学総合病院で根治的外科切除を施行され、同意を得られたNASH肝がん22例である。NASHの診断は日本肝臓学会指針¹⁵⁾に則り、i) 飲酒歴がなく（エタノール 20g/日以下）、ii) 肝組織内の脂肪化（steatosis）・炎症・肝細胞膨化（ballooning）、および肝線維化、iii) 他原因の肝疾患が除外可能であることを満たす場合を確診とした。肝がんの診断は、UICC TNM分類（第7版）および肝がん取扱い規約（2009年）を参考にした。本研究はヘルシンキ宣言および臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省）に則り行った（新潟大学医学部倫理委員会・承認No.323）。解析対象の内訳は以下の通りである：男性12例、女性10例；平均年齢71±7歳；腫瘍サイズ5 cm以上7例；血管浸潤陽性5例；腫瘍分化度Edmondson-Steiner I度6例、II度16例；腫瘍病期分類UICC TNM分類第7版pT1 14例、pT2 5例、pT3 3例。術後観察期間は1.5-154月（平均36.5月）で、22例中8例（36.3%）に肝内再発が認められた。

免疫組織染色

組織標本の免疫染色はABC法（Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA）を用いて、以下の通りに行った。ホルマリン固定・パラフィン包埋・薄切した組織標本を脱パラフィン処理後、10 mM クエン酸ナトリウム（pH 6.0）で抗原賦活して、3%過酸化水素を用いてペルオキシダーゼ活性を不活化した。免疫反応は、界面活性剤含有トリス緩衝液（Tris Buffered Saline with Tween 20）/5%正常ヤギ血清で100倍希釈した抗リン酸化型p70S6キナーゼ（Thr389）ポリクローナル抗体（LifeSpan Biosciences, Seattle, WA）を一次抗体に用いて18時間4℃反応させた。Diaminobenzidineを基質に用いて発色後、ヘマトキシレン核染色してキシレン封入を行った。

免疫染色標本の観察は、3名の肝臓専門医が、標本に関する臨床因子を匿名化して行った。鏡検下で100個の腫瘍細胞を異なる5視野で各々計測し、既報を参考にして^{16) 17)}、リン酸化p70S6キナーゼ陽性細胞が50%未満の症例を”低発現”、50%以上を”高発現”群の2グループに群分けした。

統計学的解析

免疫染色データと臨床病理因子の相関は、Fisherの

直接確率法で解析した。染色データ別にみた術後早期（3年）のがん再発率・生存率は、Kaplan-Meier法を用いて描出し、Log-rank testで検定した。P70S6キナーゼによるがん再発への影響は、単変量および多変量Cox比例ハザードモデルを用いて解析した。解析はSPSSソフトウェア(Statistical Product and Service Solutions ver. 20; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差とした。

結果

1. リン酸化型（活性型）p70S6免疫組織染色

既に報告されている通り¹⁷⁾、リン酸化型p70S6は主にリンパ球やがん細胞の核内に発現していた。全症例において、非癌部組織の肝細胞はリン酸化p70S6の発現頻度は0-8%と少なく、正常肝細胞ではp70S6シグナルが活性化していないことが示唆された。癌部においては、22例中12例（54.5%）が高発現群に区別され、これら症例のリン酸化p70S6発現細胞の出現率は、平均 $77.5 \pm 8\%$ （65-90%）であった。一方、リン酸化

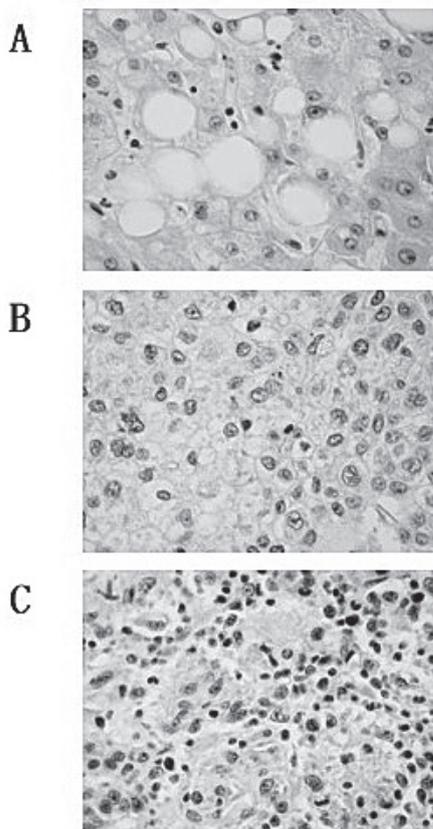


図1. リン酸化型p70S6キナーゼ免疫染色

A NASH1非癌部組織, B リン酸化型p70低発現例, C リン酸化型p70S6高発現例 (x40倍)

p70S6低発現群での陽性細胞は、平均 $12.8 \pm 9\%$ （2-25%）であった（図1）。

2. p70S6と臨床病理学的因子の相関関係

リン酸化型p70S6の高発現群は、腫瘍サイズ、血管浸潤、腫瘍病期分類と明らかな相関関係はなかったが、組織分化度と有意な逆相関関係を示した（ $p = 0.047$ ）（表1）。具体的には、リン酸化型p70S6キナーゼ低発現群はEdmondson-Steiner I度6例・II度4例であり、高発現群はI度2例・II度10例だった。未分化癌でp70S6シグナルが活性化傾向にあることが示唆された。

表1. リン酸化p70S6発現レベルと臨床病理学的因子の相関関係

	リン酸化		P
	p70S6K low	high	
腫瘍径			
≤ 5 cm	7	7	
> 5 cm	3	5	0.453
血管浸潤			
—	8	9	
+	2	3	0.593
組織分化度			
I	6	2	
II	4	10	0.047
ステージ分類			
pT1	8	6	
pT2-3	2	6	0.156

3. リン酸化p70S6とがん再発・予後との相関解析

リン酸化p70S6高発現群は、低発現群に比べて、術後再発が有意に上昇していた（ $p = 0.045$ ）（図2A）。生存率については、リン酸化p70S6発現レベルによる

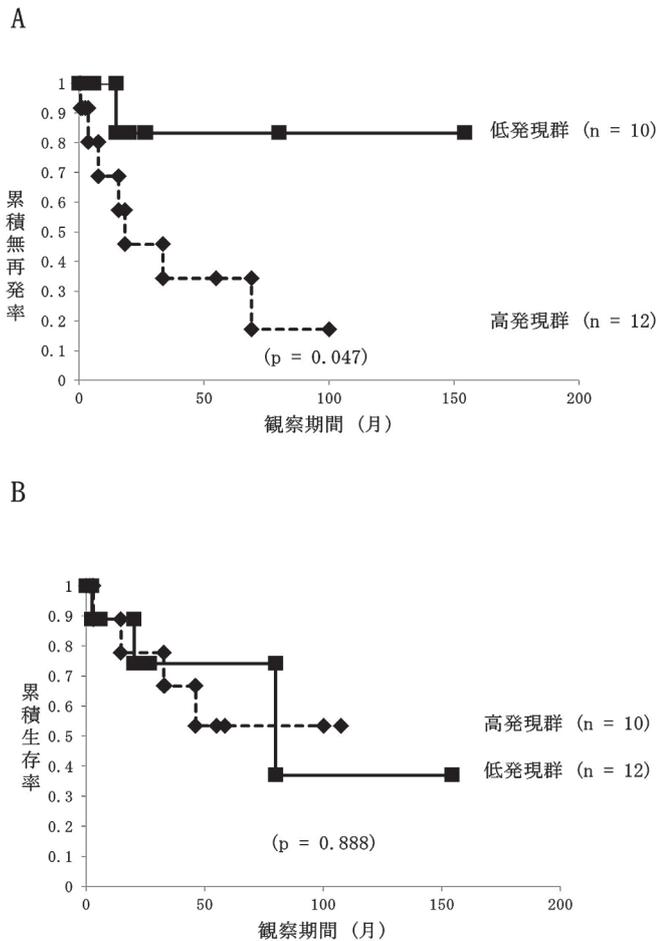


図2. p70S6活性化レベルと再発・予後の相関解析
 A リン酸化p70S6と術後再発率
 B リン酸化p70S6と術後生存率

有意差は認められなかった ($p = 0.888$) (図2B)。Cox 回帰モデルに関しては、解析数が不足していたため、単変量・多変量解析共に計算が収束しなかった。

考察

p70S6キナーゼは、細胞増殖・生存に中心的な役割を果たすAkt-mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル経路の下流因子であり、複数のがん組織でリン酸化 (活性化) されていることから、近年では抗腫瘍薬の標的として注目されている¹⁸⁾。p70S6キナーゼは40S リボゾームの構成ユニットである S6 蛋白質をリン酸化する事によりタンパク翻訳に寄与する重要な酵素であり、がん細胞における過剰な活性化が細胞の異常増殖に直結する可能性があることは容易に推測できる。一方、rapamycinは、最近になり臨床使用されつつあるmTOR阻害剤であり、p70S6キナーゼのリン

酸化 (活性化) を抑制し、細胞増殖の抑制・細胞死を誘導できる薬剤である⁷⁾。既にわが国では、腎細胞がんに対する抗がん剤として承認されており、他の固形がんや肉腫に対しても多くの臨床試験が施行中である。

本研究では、22例のNASH肝がんを対象に、活性型 (リン酸化) p70S6キナーゼの発現レベルを免疫染色で解析した。解析数が不足していたためにCox回帰モデル解析は困難であったが、少なくとも、本研究結果は以下の2点を提起できるものとする。すなわち、i) NASH肝がんにおいては、p70S6キナーゼの活性化が術後再発と相関しており、rapamycinあるいは類似のp70S6キナーゼ阻害薬が本疾患の再発防止に有用であるかもしれないこと、ii) 一方、残りの約半数の症例はリン酸化p70S6キナーゼの活性化は乏しく、rapamycin投与の意義が乏しい可能性が強く考えられる。本研究結果は、p70S6キナーゼなどの治療薬に關与するシグナル因子の詳細な検討は、テーラーメイド医療の可能性を高めるものであり、効率的で安全性の高いがん治療を行うためにも、さらに詳細な検討が必要と思われる。

結論

NASH肝がんの約半数でp70S6キナーゼが活性化しており、がん再発と相関している。本疾患におけるp70S6活性について、今後、さらに症例数を増やして検討すべきである。

謝辞

組織標本作成にご指導・助力を頂いた、新潟大学医学部保健学科検査技術科学専攻 岩淵三哉教授に深謝致します。

利益相反

本研究にあたり、開示すべき利益相反はない。

引用文献

1. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2011; 365:1118-27.
2. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2012; 379:1245-55.
3. Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. Review: Nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 1997;12:398-403.
4. Hashimoto E, Tokushige K. Prevalence, gender, ethnic variations, and prognosis of NASH. *J Gastroenterol.* 2011;Suppl1:63-9.
5. Ratziu V, Poynard T. Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders; edited by Farrel GC et al., 2007, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, p263-75.
6. Matsuda Y, Ichida T, Fukumoto M. Hepatocellular carcinoma and liver transplantation: clinical perspective on molecular targeted strategies. *Med Mol Morphol* 2011;44:117-24.
7. Zhu AX, Abrams TA, Miksad R et al. Phase 1/2 study of everolimus in advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2011;117:5094-102.
8. Cotler SJ, Hay N, Xie H et al. Immunohistochemical expression of components of the Akt-mTORC1 pathway is associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Dig Dis Sci.* 2008;53:844-9.
9. Oliva J, French BA, Qing X et al. The identification of stem cells in human liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2010;88:331-40.
10. Martínez-López N, Varela-Rey M, Fernández-Ramos D et al. Activation of LKB1-Akt pathway independent of phosphoinositide 3-kinase plays a critical role in the proliferation of hepatocellular carcinoma from nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2010;52:1621-31.
11. Salomao M, Yu WM, Brown RS Jr. et al. Steatohepatic hepatocellular carcinoma (SH-HCC): a distinctive histological variant of HCC in hepatitis C virus-related cirrhosis with associated NAFLD/NASH. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:1630-6.
12. Sharma D, Wang J, Fu PP, Sharma S et al. Adiponectin antagonizes the oncogenic actions of leptin in hepatocellular carcinogenesis. *Hepatology.* 2010;52:1713-22.
13. Stefano JT, de Oliveira CP, Corrêa-Giannella ML et al. Decreased immunoeexpression of survivin could be a potential marker in human non-alcoholic fatty liver disease progression? *Liver Int.* 2011;31:377-85.
14. Tanaka S, Miyanishi K, Kobune M. Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2013;48:1249-58.
15. 日本肝臓学会 : NASH・NAFLDの診療ガイド2010. 文光堂, 2010, 東京.
16. Baba HA, Wohlschlaeger J, Cicinnati VR, et al. Phosphorylation of p70S6 kinase predicts overall survival in patients with clear margin-resected hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2009;29:399-405.
17. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol.* 2010 ;177:1647-56.
18. Smolewski P. Recent developments in targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase pathway. *Anticancer Drugs.* 2006;17:487-94.

p70S6 kinase is activated in non-alcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma

Yasunobu MATSUDA^{1)*}, Toshifumi WAKAI²⁾, Yuki HIROSE²⁾, Jun SAKATA²⁾
Takashi KOBAYASHI²⁾, Mami OSAWA³⁾, Shun FUJIMAKI⁴⁾, Masayuki KUBOTA³⁾

- 1) Department of Medical Technology, Niigata University School of Health Sciences, Faculty of Medicine Graduate School of Health Sciences
- 2) Division of Digestive and General Surgery, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
- 3) Division of Pediatric Surgery, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
- 4) Division of Laboratory Medicine, Niigata University Medical and Dental Hospital

Key words : non-alcoholic steatohepatitis, hepatocellular carcinoma, p70S6 kinase

Abstract Objective: Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a recently identified liver disease which causes hepatocellular carcinoma (HCC). In this study, we addressed whether p70S6 kinase (p70S6K), a main target of the anti-cancer agent rapamycin, is involved in the clinicopathological factors in NASH-related HCC.

Methods: HCC tissue samples were obtained from 22 NASH patients with radical surgical treatment. Phosphorylation level of p70S6K was analyzed by immunohistochemical analysis, and the correlation with the clinicopathological factors were examined.

Results: Phosphorylated p70S6K was detected in 54.5% (12/22) of NASH-related HCCs. The levels of phospho-p70S6K were correlated with histological grade of HCC ($p = 0.047$), but not with clinical factors. Phosphorylation of p70S6K was correlated with increased cancer recurrence after 3 years of the treatment ($p = 0.045$).

Conclusion: Phosphorylation level of p70S6K was correlated with cancer recurrence of NASH-related HCC. Rapamycin might be a useful agent for treating NASH-associated HCC.

Accepted : 2014.2.24