Title	肝細胞癌の特徴的な腫瘍免疫･血管微小環境に係る細胞内シグナル活性化パターンの検討
Sub Title	Relationship between the activation of intracellular signaling cascades and characteristic immuno-vascular microenvironment in hepatocellular carcinoma.
Author	紅林, 泰(Kurebayashi, Yutaka)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2023
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、２年計画の１年目として、特徴的な腫瘍微小環境や組織病理学的所見を示す肝細胞癌について、その細胞内シグナル経路活性化パターンの全体像を把握するためにリン酸化プロテインアレイ解析を行い検討した。 CK19、SALL4陽性あるいはKi-67 index高値を示す高悪性度肝細胞癌４例、免疫組織化学的にβ-catenin核陽性像またはGS陽性像を示すWnt/β-catenin活性化型で、Ki-67 indexが比較的低値である肝細胞癌２例、ならびに中等度～高度のリンパ球浸潤を示す肝細胞癌２例の未固定凍結保存検体から、プロテアーゼ/ホスファターゼ阻害剤存在下にタンパク質を抽出してリン酸化プロテインアレイ解析を行い検討した所、下記結果が得られた。 ① 高悪性度肝細胞癌では、p38 MAPK、MAPK/ERK、Akt/S6K、JSK2/STAT3経路を始めとする複数のシグナル経路が重複して活性化していた。 ② 一方で、Wnt/β-catenin活性化型でKi-67 indexが比較的低値である肝細胞癌では、全体的にシグナルタンパク質のリン酸化の程度が低かった。 ③ 抗腫瘍免疫応答を伴い、中等度～高度のリンパ球浸潤が見られる肝細胞癌では、p38 MAPK、MAPK/ERK、Akt/S6K経路の活性化を認めたが、腫瘍のKi-67 index自体は低いことから、これらのシグナル活性化は免疫細胞における活性を示している可能性があると考えられた。また、抗腫瘍応答が見られることに一致して、IFNにより活性化されるSTAT1のリン酸化が認められた。 上記結果から、腫瘍細胞、あるいは間質構成細胞のどちらにおいてどのようなシグナルが活性化しているか、空間的な解析が必要と考えられた。今後は、今回得られた結果をウエスタンブロッティングを行い確認したうえで、リン酸化アレイ解析症例数を増やすとともに、組織病理学的にシグナル活性化の空間像をマッピングしてその詳細な全体像を検討する予定である。 In this study, I performed phospho-protein array to grasp the activation patterns of intracellular signaling cascades using hepatocellular carcinoma (HCC) with characteristic microenvironmental and histopathological features. I selected non-fixed frozen HCC samples with following features: SALL4 and/or CK19-positive and/or Ki-67 index-high high-grade HCC (4 cases), Wnt/beta-catenin activated HCC with lower Ki-67 index (2 cases), and HCC with moderate to high infiltration of lymphocytes (2 cases). Whole cell lysate was extracted from these samples and phospho-protein array was performed. As a result, I observed that (1) In high-grade HCC, co-activation of multiple signaling cascades including p38 MAPK, MEPK/ERK, Akt/S6K, JAK2/STAT3 were observed. (2) On the other hand, in Wnt/beta-catenin-activated HCC with lower proliferation index, the phosphorylation level was generally lower than those observed in high-grade HCCs. (3) In HCCs with moderate to high lymphocytic infiltration, the activation of p38 MAPK, MAPK/ERK, and Akt/S6K was also observed. In addition, STAT1 phosphorylation was observed in these cases. Studies separating tumoral and stromal signaling features may be required in the future especially in this group. These results indicated that detailed spatial analysis is required to dissect where each signaling cascade is activated in tumoral and/or stromal components. As a next step, I am planning to confirm above results by Western blotting, to increase the sample size analyzed by phospho-protein array, and to map the spatial distribution of signaling activation through (multiplex) immunohistochemical studies.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2022000010-20220261

2022年度　学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

2023年4月8日

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	専任講師（有期・医学部）	補助額	500 （特B）千円
	氏名	紅林 泰	氏名（英語）	Yutaka Kurebayashi		

研究課題（日本語）

肝細胞癌の特徴的な腫瘍免疫・血管微小環境に係る細胞内シグナル活性化パターンの検討

研究課題（英訳）

Relationship between the activation of intracellular signaling cascades and characteristic immuno-vascular microenvironment in hepatocellular carcinoma.

1．研究成果実績の概要

本研究では、2年計画の1年目として、特徴的な腫瘍微小環境や組織病理学的所見を示す肝細胞癌について、その細胞内シグナル経路活性化パターンの全体像を把握するためにリン酸化プロテインアレイ解析を行い検討した。

CK19、SALL4 陽性あるいは Ki-67 index 高値を示す高悪性度肝細胞癌4例、免疫組織化学的に β-catenin 核陽性像または GS 陽性像を示す Wnt/β-catenin 活性化型で、Ki-67 index が比較的低値である肝細胞癌2例、ならびに中等度～高度のリンパ球浸潤を示す肝細胞癌2例の未固定凍結保存検体から、プロテアーゼ/ホスファターゼ阻害剤存在下にタンパク質を抽出してリン酸化プロテインアレイ解析を行い検討した所、下記結果が得られた。

① 高悪性度肝細胞癌では、p38 MAPK、MAPK/ERK、Akt/S6K、JSK2/STAT3 経路を始めとする複数のシグナル経路が重複して活性化していた。

② 一方で、Wnt/β-catenin 活性化型で Ki-67 index が比較的低値である肝細胞癌では、全体的にシグナルタンパク質のリン酸化の程度が低かった。

③ 抗腫瘍免疫応答を伴い、中等度～高度のリンパ球浸潤が見られる肝細胞癌では、p38 MAPK、MAPK/ERK、Akt/S6K 経路の活性化を認めたが、腫瘍の Ki-67 index 自体は低いことから、これらのシグナル活性化は免疫細胞における活性を示している可能性があると考えられた。また、抗腫瘍応答が見られることに一致して、IFN により活性化される STAT1 のリン酸化が認められた。

上記結果から、腫瘍細胞、あるいは間質構成細胞のどちらにおいてどのようなシグナルが活性化しているか、空間的な解析が必要と考えられた。今後は、今回得られた結果をウエスタンブロッティングを行い確認したうえで、リン酸化アレイ解析症例数を増やすとともに、組織病理学的にシグナル活性化の空間像をマッピングしてその詳細な全体像を検討する予定である。

2．研究成果実績の概要（英訳）

In this study, I performed phospho-protein array to grasp the activation patterns of intracellular signaling cascades using hepatocellular carcinoma (HCC) with characteristic microenvironmental and histopathological features. I selected non-fixed frozen HCC samples with following features: SALL4 and/or CK19-positive and/or Ki-67 index-high high-grade HCC (4 cases), Wnt/beta-catenin activated HCC with lower Ki-67 index (2 cases), and HCC with moderate to high infiltration of lymphocytes (2 cases). Whole cell lysate was extracted from these samples and phospho-protein array was performed.

As a result, I observed that

(1) In high-grade HCC, co-activation of multiple signaling cascades including p38 MAPK, MEPK/ERK, Akt/S6K, JAK2/STAT3 were observed.

(2) On the other hand, in Wnt/beta-catenin-activated HCC with lower proliferation index, the phosphorylation level was generally lower than those observed in high-grade HCCs.

(3) In HCCs with moderate to high lymphocytic infiltration, the activation of p38 MAPK, MAPK/ERK, and Akt/S6K was also observed. In addition, STAT1 phosphorylation was observed in these cases. Studies separating tumoral and stromal signaling features may be required in the future especially in this group.

These results indicated that detailed spatial analysis is required to dissect where each signaling cascade is activated in tumoral and/or stromal components. As a next step, I am planning to confirm above results by Western blotting, to increase the sample size analyzed by phospho-protein array, and to map the spatial distribution of signaling activation through (multiplex) immunohistochemical studies.

3．本研究課題に関する発表

発表者氏名（著者・講演者）	発表課題名（著書名・演題）	発表学術誌名（著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月（著書発行年月・講演年月）
2年計画の初年度であり、本課題に関する発表はなし。			