

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	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では1年目に引き続き、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おける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等を行い検討した。 昨年度までに、① 高悪性度肝細胞癌では、p38MAPK、MAPK/ERK、Akt/S6K、JAK2/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ること、また、② Wnt/β-catenin活性化型でKi-67index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いことを認めていたが、今年度も計6例においてリン酸化プロテインアレイ解析を追加し、同様の傾向が認められた。③リンパ球浸潤の多い肝細胞癌では、IFN-γ経路の活性化を反映して、STAT1のリン酸化が認められた。 次に、①複数のシグナル経路が活性化している高悪性度の肝細胞癌、ならびに③STAT1リン酸化が見られる肝細胞癌において、pAkt, pERK, pSTAT1の免疫染色を行い局在の解析を試みたが、FFPE標本上ではこれらの局在を検出することが困難であった。ERKとSTAT1は活性化後に核内移行することから免疫染色を行った所、ERK活性化群ではERKの核内移行が認められ、STAT1活性化群では、リンパ球に接するマクロファージや腫瘍細胞においてSTAT1の発現増強と核内移行が見られた。今後は、リン酸化プロテインアレイの結果をタンパク質定量 (Jess) を行い確認するとともに、凍結検体のある残りの肝細胞癌コホートについてリン酸化タンパク質定量を行い評価する予定である。 最後に、本研究の過程で新たに興味を持たれた、胎児型の肝芽腫に類似した組織所見を呈し、リンパ球浸潤が低く、血管増生が目立ち、外科切除後の予後が著しく不良な一群 (3例) についてwhole exome sequencing解析を行った。結果、3例ともCTNNB1あるいはAxin1に変異が認められ、Wnt/β-catenin経路変異型の肝細胞癌の一亜型であると考えられた。 In FY2023, we have further expanded our study performed in FY2022 to reveal the activation patterns of intracellular signaling cascade that may be associated with the development of characteristic tumor microenvironment. In FY2023, we have performed additional phospho-protein array study in 6 hepatocellular carcinomas (HCCs), and confirmed that (1) p38 MAPK, MAPK/ERK, Akt/S6K, JAK2/STAT3 pathways were simultaneously activated in high-grade HCCs, (2) Wnt/β-catenin-activated type HCC showed relatively low-level of phosphorylation in these pathways, and (3) in HCCs with increased lymphocytic infiltration, STAT1 phosphorylation was observed in addition to the varied activation of above signaling pathways. Next, we have performed immunohistochemical (IHC) study for phospho-Akt, phosphor-ERK, and phosphor-STAT1; however, these phosphorylated epitopes were hard to be detected through IHC using FFPE samples. Since ERK and STAT1 become accumulated in nucleus upon activation, we evaluated the intracellular localization of pan-ERK and pan-STAT1 through IHC, and found that nuclear localization of ERK was observed in ERK-activated tumors, while increased expression and nuclear localization of STAT1 was observed in lymphocyte-rich tumors. We are planning to confirm the results of phospho-protein array by quantifying phosphor-proteins using Jess, and analyze in the whole cohort of HCC with frozen samples. Finally, we found a rare, but clinically important subset of HCC that were characterized by their focal morphology similar to fetal-type hepatoblastoma, lower lymphocytic infiltration, higher vascularization, and highly aggressive behavior after surgical resection. We submitted 3 cases of these HCCs to whole exome sequencing and found that these tumors harbored Wnt/β-catenin pathway-related gene mutations (CTNNB1 and/or Axin1), indicating that these tumors are important variant in Wnt/β-catenin-activated HCCs with highly aggressive clinical course.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000010-20230275

保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2023年度 学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

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	500千円 （特B）
	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1年目に引き続き、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おける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等を行い検討した。 昨年度までに、① 高悪性度肝細胞癌では、p38 MAPK、MAPK/ERK、Akt/S6K、JAK2/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ること、また、② 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いことを認めていたが、今年度も計6例においてリン酸化プロテインアレイ解析を追加し、同様の傾向が認められた。③リンパ球浸潤の多い肝細胞癌では、IFN-γ経路の活性化を反映して、STAT1のリン酸化が認められた。 次に、①複数のシグナル経路が活性化している高悪性度の肝細胞癌、ならびに③STAT1リン酸化が見られる肝細胞癌において、pAkt, pERK, pSTAT1の免疫染色を行い局在の解析を試みたが、FFPE標本上ではこれらの局在を検出することが困難であった。ERKとSTAT1は活性化後に核内移行することから免疫染色を行った所、ERK活性化群ではERKの核内移行が認められ、STAT1活性化群では、リンパ球に接するマクロファージや腫瘍細胞においてSTAT1の発現増強と核内移行が見られた。今後は、リン酸化プロテインアレイの結果をタンパク質定量（Jess）を行い確認するとともに、凍結検体のある残りの肝細胞癌コホートについてリン酸化タンパク質定量を行い評価する予定である。最後に、本研究の過程で新たに興味を持たれた、胎児型の肝芽腫に類似した組織所見を呈し、リンパ球浸潤が低く、血管増生が目立ち、外科切除後の予後が著しく不良な一群（3例）についてwhole exome sequencing解析を行った。結果、3例ともCTNNB1あるいはAxin1に変異が認められ、Wnt/β-catenin経路変異型の肝細胞癌の一亜型であると考えられた。						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
In FY2023, we have further expanded our study performed in FY2022 to reveal the activation patterns of intracellular signaling cascade that may be associated with the development of characteristic tumor microenvironment. In FY2023, we have performed additional phospho-protein array study in 6 hepatocellular carcinomas (HCCs), and confirmed that (1) p38 MAPK, MAPK/ERK, Akt/S6K, JAK2/STAT3 pathways were simultaneously activated in high-grade HCCs, (2) Wnt/β-catenin-activated type HCC showed relatively low-level of phosphorylation in these pathways, and (3) in HCCs with increased lymphocytic infiltration, STAT1 phosphorylation was observed in addition to the varied activation of above signaling pathways. Next, we have performed immunohistochemical (IHC) study for phospho-Akt, phosphor-ERK, and phosphor-STAT1; however, these phosphorylated epitopes were hard to be detected through IHC using FFPE samples. Since ERK and STAT1 become accumulated in nucleus upon activation, we evaluated the intracellular localization of pan-ERK and pan-STAT1 through IHC, and found that nuclear localization of ERK was observed in ERK-activated tumors, while increased expression and nuclear localization of STAT1 was observed in lymphocyte-rich tumors. We are planning to confirm the results of phospho-protein array by quantifying phosphor-proteins using Jess, and analyze in the whole cohort of HCC with frozen samples. Finally, we found a rare, but clinically important subset of HCC that were characterized by their focal morphology similar to fetal-type hepatoblastoma, lower lymphocytic infiltration, higher vascularization, and highly aggressive behavior after surgical resection. We submitted 3 cases of these HCCs to whole exome sequencing and found that these tumors harbored Wnt/β-catenin pathway-related gene mutations (CTNNB1 and/or Axin1), indicating that these tumors are important variant in Wnt/β-catenin-activated HCCs with highly aggressive clinical course.						
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）			
紅林 泰	肝細胞癌における抗腫瘍免疫応答の形質・空間的全体像の解明	第113回日本病理学会総会	2023/3/28			

紅林 泰	肝細胞癌における免疫微小環境の発達・疲弊過程の時空間的解析と原発巣・転移巣間多様性	第59回日本肝癌研究会	2023/7/27
------	---	-------------	-----------