

003-2

肝芽腫および肝芽腫細胞株 Huh6 における p53 の細胞質局在機構の解析

山本 英輝¹⁾、尾崎 俊文¹⁾、中西 満¹⁾、菊地 弘展¹⁾、吉田 佳織¹⁾、堀江 弘²⁾、桑野 博行³⁾、中川原 章¹⁾千葉県がんセンター研究局 生化学研究部¹⁾、千葉県こども病院 病理²⁾、群馬大学大学院 病態総合外科³⁾

【背景及び目的】一般的に小児がんにおいては機能喪失を伴う p53 の変異は極めて稀であるが、一部の神経芽腫においては野生型 p53 の細胞質局在が報告されており、p53 の細胞内局在の変化がその機能を制御する重要な分子機構の一つであると考えられている。今回、我々は肝芽腫由来の細胞株である Huh6 細胞において p53 が細胞質で特異的に過剰発現し、過酸化水素処理によるアポトーシスに伴って細胞核に移行することを見出したので報告する。【結果および考察】肝芽腫 8 例の p53 について免疫染色を行ったところ、3 例において核のみならず細胞質にも p53 が陽性であった。そこで、肝芽腫細胞株 Huh6 を細胞質および細胞核画分に分離し、p53 の細胞内局在をウェスタン法を用いて解析したところ、細胞質における p53 の過剰発現が認められた。細胞質に局在する p53 は、恒常的にその Ser-15 がリン酸化を受けていた。Huh6 細胞をシスプラチンで処理すると、p53 の蛋白質レベルでの安定化による核内蓄積が観察され、細胞はアポトーシスに陥った。一方、Huh6 細胞では過酸化水素処理に反応して p53 の核内移行の促進が検出され、アポトーシスの誘導が認められた。p53 は DNA 損傷に反応してそのアミノ末端領域のリン酸化や、カルボキシル末端領域のアセチル化を含む化学修飾を受けることによって安定化し活性化することが知られている。興味深いことに、Huh6 細胞をデアセチラーゼに対する阻害剤で処理すると、酸化ストレスに反応した p53 の核内移行が著しく阻害されるとともに、p53 依存性のアポトーシスの抑制が認められた。最近、神経芽腫において PARC が p53 のカルボキシル末端領域に結合し、p53 を細胞質にアンカーする機能を持つことが報告された。免疫沈降実験から、Huh6 細胞においても p53 と PARC との結合が検出された。さらに、過酸化水素処理に反応した p53 の核内移行に伴って、p53 と PARC との結合が減少することが判明した。従って、p53 のアセチル化による修飾を介した PARC との結合の有無が、肝芽腫における過酸化水素に反応した p53 の核内移行および p53 依存性のアポトーシスの実行に重要な役割を担っていることが示唆された。

003-3

肝芽腫肝移植後の CMV 再活性化リスクとモニタリング

丹羽 明¹⁾、小林 道弘¹⁾、由井 理洋¹⁾、新井 真人¹⁾、梅田 雄嗣¹⁾、平松 英文¹⁾、足立 壮一¹⁾、中畑 龍俊¹⁾、上田 幹子²⁾、江川 裕人²⁾、田中 紘一²⁾京都大学 小児科¹⁾、京都大学 移植外科²⁾

【緒言】治療抵抗性肝芽腫に対する生体肝移植 (LRLT) は近年適応が広がりつつある。LRLT 後の化学療法の意義については意見が分かれており、再発予防効果の一方で通常の LRLT 例以上に肝芽腫症例では免疫抑制状態となり、CMV などウィルス感染のリスクが増強する可能性がある。我々は LRLT 後の化学療法施行例における CMV モニタリングとして、従来の抗原血症に加え MHC テトラマー法を用いた宿主免疫能の解析も行っている。今回、これらのモニタリングの有用性について報告する。

【方法】対象は、当院で肝芽腫に対し LRLT が施行された 16 症例 (年齢中央値 4.6 歳)。抗原血症 (pp65/C7HRP) は通常法で測定し、HLA-A2402/0201 を有する症例については MHC テトラマーを用いて末梢血中の CMV 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CMV-CTL) の頻度を測定した。

【結果】ドナーは全例 CMV 既感染であった。患者の術前 CMV-IgG は 16 例中 8 例陽性、7 例陰性、1 例不明であった。術後 CMV 抗原血症陽性例の年齢中央値は 6.6 歳 (0 ~ 12 歳) だった。術前 CMV-IgG 陽性、陰性例における術後の CMV 抗原血症 (再活性化) は、それぞれ 2 例、3 例で、いずれも免疫抑制剤使用下の化学療法中に発症していた。13 例が血型適合、3 例が不適合移植で、CMV 抗原血症 5 例はいずれも適合移植例に発生していた。テトラマーアッセイを経時的に施行できた 3 例はいずれも術後抗原血症を認めたが、1 例は当初から CMV-CTL 陽性であり、無治療で改善した。2 例は術前の CMV-CTL 陰性で、それぞれ術後 28 日、63 日目に CMV 抗原陽性となり、抗ウィルス剤を投与した。1 例は 2 か月後に CMV-CTL が陽転したが、もう 1 例は 3 か月経過時点でお陰性である。

【結論】生体肝移植の安全性向上に伴い、今後肝芽腫 LRLT 症例は増加すると考えられ、CMV 感染対策は重要である。通常のウィルス量モニタリングに加え、テトラマー法を用いた特異免疫能の把握が有用であることが示された。さらなる症例の集積と検討が必要である。