

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790252
 研究課題名（和文） 組織マイクロアレイを用いた肝細胞癌の免疫組織学的検討
 - 有意な疾患群の抽出の試み
 研究課題名（英文） Tissue microarray based immunohistochemical analysis of
 hepatocellular carcinomas
 研究代表者
 柴原 純二（SHIBAHARA JUNJI）
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：60334380

研究成果の概要：

肝細胞癌においては、汎用の組織学的分類のみに基づいて、各症例の予後を予測することは困難であることが知られている。本研究は組織マイクロアレイを用いた免疫組織学的手法により、複数の遺伝子経路と肝細胞癌との関連性を検討し、経過予測可能な腫瘍群を得る発現型の抽出を目的とした。解析した個々の因子については、脈管侵襲、肝内転移などの臨床病理学的因子と相関するものもあったが、組織分類を補完するような発現型の抽出には至らず、今後の検討の課題である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：癌、免疫組織学的染色、組織マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

我が国で新規に診断される肝癌は依然増加傾向にある。病理学的検索の機会が多い肝細胞癌に関して、我々は新規抗体を用いた検討から、Glypican 3及びROB01が肝細胞癌の病理診断に有用であることを示してきたが (Mod

Pathol.18(12):1591,2005., Clin Cancer Res.12(11Pt1):3257,2006.)、肝細胞癌の診断について未解決の問題が存在する。

(1) 進行癌(古典的肝癌)についての問題

肝細胞癌では、同様の組織像を呈する腫瘍においても、再発、生存率に反映される生物

学的振る舞いは多様であることが知られており、現行の組織学的分類からの予後予測は困難である。

組織学的分類の限界を克服するものとして、遺伝子発現型に基づく腫瘍分類が模索されている。肝細胞癌についても、DNAマイクロアレイを用いた発現プロファイリングによる腫瘍分類が、既に多数試みられているが、これまでに提示された結果は研究者間で必ずしも一定しない。手技、解析法に更なる改良の余地があることもその原因と考えられており、日常診療への応用には程遠いのが現状であると言える。

一方、免疫組織学的手法は既に日常診療にも不可欠な手法であり、*in situ*での蛋白発現の検討に極めて有用である。従来、多数の検体について、多数の蛋白の発現を検討することは困難であったが、最近開発された組織マイクロアレイを用いることで、腫瘍の発現プロファイリングを目的としたような大規模な検討を行うことも可能となった。

肝細胞癌においては、Wnt/ β -catenin経路、AKT経路、MAPK経路、JAK-STAT経路など、複数の遺伝子経路の異常が指摘されている。関連遺伝子についての*in situ*での発現の検討は未だ十分にはなされておらず、複数の経路を包括的に解析した研究は皆無である。組織マイクロアレイを用いた免疫組織学的手法により、関連遺伝子についての大規模な発現解析を行うことで、再発率や予後を規定する発現signatureを明らかにすることが可能と考えられる。得られた結果から、合目的な腫瘍分類の提唱が期待される。

(2) 早期病変についての問題

画像技術の進歩に伴い、小型の結節性病変が生検診断に供される機会が増加しているが、現行の診断基準の問題もあって、その診断は

必ずしも容易ではない。例えば、前癌病変と想定されているdysplastic noduleは、細胞異型、密度を指標に定義された概念で、国際的に一応のコンセンサスを得ているが、dysplastic noduleの範疇に入る組織像でありながら、門脈域への浸潤所見などから癌であることが明らかな病変が存在することも経験される。

早期病変についての新たな診断基準の設定が求められているが、細胞密度や異型度を指標とした基本的な組織像、画像所見に加え、進行癌と同様に遺伝子発現型も考慮することで、有意な早期病変を抽出し得ると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 手術検体から肝細胞癌の大規模な組織マイクロアレイを作成し、既に異常の知られた遺伝子経路を含む、複数の遺伝子経路の関連遺伝子について、免疫組織学的な発現検討を包括的に行い、経過予測可能な均一な腫瘍群を得る発現型を解明する。

(2) 肝小結節性病変について、基本的な病理組織像を再検討するとともに、免疫組織学的な発現解析を行い、有意な腫瘍群を得るような診断基準の設定を試みる。

3. 研究の方法

(1) 大規模な組織マイクロアレイの作成

当院で外科手術された肝細胞癌症例を用い、肝細胞癌約250例、非腫瘍肝組織約150例からなる組織マイクロアレイを作成した。腫瘍及び非腫瘍性肝組織の包埋されたパラフィンブ

ロックから、各2箇所のコアを打ち抜き、新たなパラフィンブロックを作成した。

(2) 免疫組織学的染色

作成した組織マクローレイのパラフィンブロックから4 μ mの切片を作成し、免疫組織学的染色を行った。

Wnt/ β -catenin経路、AKT経路、MAPK経路、JAK-STAT経路の関連遺伝子、Myc関連遺伝子を検討対象とした。関連遺伝子は多岐に亘るが、鍵となる遺伝子を約50個選び、市販抗体を用いて発現を検討した。

(3) 病理組織学的因子との対比

得られた染色結果と、腫瘍径、肉眼型、組織型、脈管侵襲や肝内転移の有無など、病理学的因子との相関を検討した。

(4) 早期病変の再検討

当院の生検検体約1000例の中から、dysplastic nodule, 高分化型肝細胞癌と診断された症例を対象として、基本的な組織像の再検討を行った。

(5) 早期病変の免疫組織学的検討

上記検討に含まれる小型病変での遺伝子発現態度を参考に、発癌早期に関わっていると考えられる遺伝子群を選択し、早期病変に対する免疫組織学的な発現検討を行った。

先に得られた基本組織像と免疫組織学的染色結果を合わせ、有意な診断基準の設定を試みた。

4. 研究成果

(1) 進行癌(古典的肝癌)の検討結果

検討した各種遺伝子経路のうち、Wnt/ β -catenin経路については、

β -cateninの核内集積が肝細胞癌の約20%に認められ、核内集積例においてE-cadherinの発現は有意に減少していたが、標的遺伝子であるcyclin D-1やc-mycの発現との間に相関は確認されなかった。

AKT経路については、p-AKTの発現が肝細胞癌の約30%に認められたが、関連遺伝子であるmTOR, p70S6の活性化(p-mTOR, p-p70S6の発現)との間に明瞭な相関は確認されなかった。

その他の発現解析した遺伝子も含め、個々の遺伝子と発現と、脈管侵襲、肝内転移などの臨床病理学的因子との相関は一部で確認されものの、各遺伝子経路と臨床病理学的因子との有意な相関は目下のところ見出せておらず、今後の検討の課題である。

(2) 早期病変についての検討結果

早期癌については、現行の組織学的診断基準を補完するような遺伝子の発現型は得られなかった。

検討した遺伝子の数が未だ少なく、引き続き検討を行っていく予定である。

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1件)

Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, et. Al(13名中3番目)

Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging.

Cancer 2009.115(11):2491-504(査読有)

[学会発表](計2件)

柴原純二、福嶋敬宜、野田直宏、田中麻理子、深山正久

「細胆管癌」についての臨床病理学的検討

第 98 回日本病理学会総会
2009 年 5 月 3 日、京都
柴原純二、福嶋敬宜、野田直宏、田中麻
理子、深山正久
肝細胞癌における cytokeratin 19 の発現
第 98 回日本病理学会総会
2009 年 5 月 3 日、京都

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柴原 純二 (SHIBAHARA JUNJI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 60334380

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし