

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月7日現在

機関番号：13501  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21791277  
 研究課題名（和文）C型肝炎患者肝細胞癌の転移機構解明を目的としたMTA-1発現に関する研究  
 研究課題名（英文）Clarification of a mechanism of metastasis in hepatocellular carcinoma based on hepatitis C virus infection by analysis of expression of Metastatic Tumor Antigen (MTA-1)  
 研究代表者  
 浅川 真己（ASAKAWA MASAMI）  
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員  
 研究者番号：10456460

研究成果の概要（和文）：MTA-1がHIF-1 $\alpha$ を介して発現亢進させる転移に関与する血管新生因子VEGFの発現は、MTA-1の発現の無い腫瘍周囲でも亢進していた。C型肝炎ウイルス感染を背景にした肝細胞癌の肝内転移再発にMTA-1は強く関与していない。一方、VEGF発現領域には肝Kupffer細胞が高度に浸潤しておりTGF $\beta$ の発現も高いことから、肝内転移再発に活性化肝Kupffer細胞からのcytokineが関与していることが解明された。

研究成果の概要（英文）：VEGF which is induced by MAT-1 through HIF-1  $\alpha$  was highly expressed in the peritumor lesion where expression of MAT-1 was not found. So, MAT-1 has no connection with intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma based on hepatitis C virus infection. Cytokines produced from the liver macrophage participate in intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma because of the findings of highly invasion of liver macrophage and high expression of TGF  $\beta$  in the lesion where VGF is expressed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝細胞癌、MTA-1、肝内転移、HIF-1 $\alpha$ 、Rac

- |  |   |
|--|---|
| <p>1. 研究開始当初の背景</p> <p>(1) 肝細胞癌は高率に肝内転移再発をきたし予後不良である。</p> <p>(2) 研究代表者は肝細胞癌に IL-18receptor</p> | <p>が発現しており、肝細胞癌が apoptosis を回避していることを明らかにしている。</p> <p>(3) 研究代表者は肝細胞癌発癌の重要な背</p> |
|--|---|

景である慢性炎症に肝 Kupffer 細胞が重要であることを明らかにしている。

- (4) 肝内転移再発に血管新生因子(VEGF)が関与していることが知られており、VEGFを誘導する因子として MAT-1 が知られている。

## 2. 研究の目的

- (1) C 型肝炎患者の肝細胞癌の肝内転移再発の機序を明らかにし、予後不良な肝細胞癌に対する新規の治療法を開発する。
- (2) 肝内転移再発に最も関連すると考えられる種々の血管新生因子の発現を検討し、それらを制御することによって腫瘍の増殖を抑制する。そのためにそれら血管新生因子を誘導すると考えられている Metastatic Tumor Antigen (MTA-1) の発現を検討する。
- (3) 肝 Kupffer 細胞の動態を検索する。

## 3. 研究の方法

- (1) パラフィン包埋切片を用いて MTA-1, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, VEGF-R, CD-31 の免疫染色を施行する。それらの結果と臨床病理学的因子との関係を検討する。
- (2) RNAeasy Kit を使用して mRNA を抽出し cDNA 作成の後、real time RT-PCR で(1)の発言を検討する。
- (3) VEGF 発現を免疫染色で検討し、染色された領域での肝 Kupffer 細胞を CD163 ならびに CD68 で免疫染色し個数を測定し、さらにこれら肝 Kupffer 細胞を分離しそのサイトカイン産生を測定する。

## 4. 研究成果

- (1) MTA-1 は腫瘍細胞のすべてではなく、一部の腫瘍細胞にのみ染色され、しかもその染色強度には heterogeneity が認められた。また、染色細胞数ならびにその染色強度と、臨床病理学的な腫瘍径、組織分化度、脈管侵襲の程度、さらにはその予後ならびに無再発生存期間に明らかな関与は認められなかった。

- (2) 新生血管増殖因子である vascular epithelial growth factor (VEGF) の免疫染色では、腫瘍内部には明らかな染色域は見いだせず、腫瘍周囲の間質部分に強く染色された(図 1)。さらにそれらの領域は新生血管を認識する抗体である CD-31 の免疫染色により、CD-31 の染色域と一致しており、腫瘍周囲の結合織には新生血管増殖因子が誘導され、実際に新生血管が形成されていることが明らかになった。しかしながら、研究代表者が予測していたそれら VEGF 及び CD-31

の染色域に一致する領域に MAT-1 の免疫染色では染色されなかった。これらのことから、MAT-1 は腫瘍の血管新生ならびに新生血管の増成には関与が薄いと考えられた。また VEGF 及び CD-31 の染色域の面積ならびに染色強度は臨床病理学的な腫瘍径、組織分化度とは明らかな相関は認められなかったが、CD-31 と脈管侵襲の間には強い相関関係が認められた。しかし VEGF と脈管侵襲との間には相関を示す傾向は認められたものの、統計学的には相関関係を見出すことはできなかった。また、VEGF と CD-31 の免疫染色での染色域ならびにその染色強度はよく一致していたにも関わらず、VEGF と無再発生存期間との間には関連は認められなかったが、CD-31 の染色面積及びその強度と全生存期間、無再発生存期間 (DFS) との間には統計学的に強い相関関係が認められた(図 2, 3)。さらに、CD-31 の染色面積で、臨床対症例を 2 群に分けると、CD-31 の染色面積が大きい症例が有意に無再発生存期間は短かった。このことから、CD-31 が腫瘍の新生血管の増成を示しており、そのことは脈管侵襲が強いことを示しており、制御その結果全生存期間及び無再発生存期間を短縮することが明らかになった。

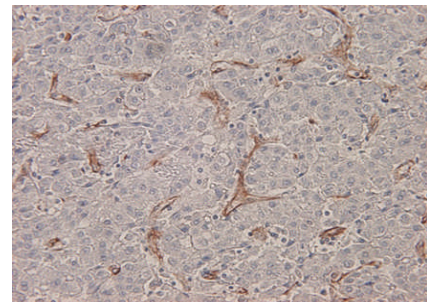


図 1 : vascular epithelial growth factor (VEGF) の免疫染色腫瘍の周囲間質に強く染色されている。

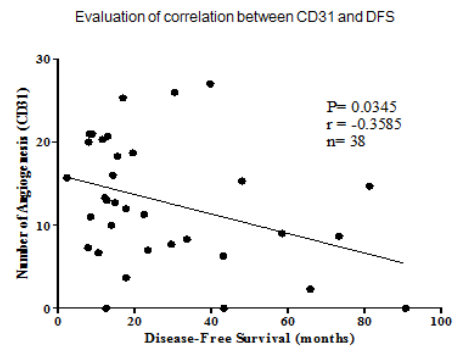


図 2 : CD-31 と無再発生存期間 (DFS) との間には統計学的に強い相関関係が認められる。

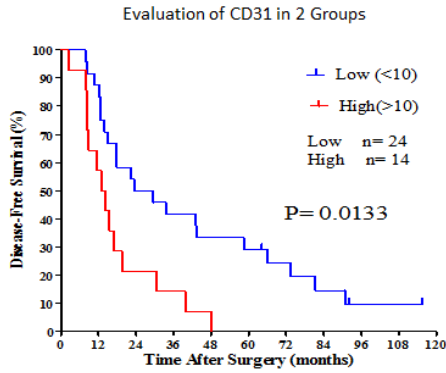


図 3 : CD-31 の免疫染色の染色面積により 2 群に分類し無再発生存期間 (DFS) をみると、CD-31 高発現群が明らかに予後不良である。

(3) CD31 陽性は間質に認められたが、結果 (2) でも示されたように、vascular epithelial growth factor (VEGF) 免疫染色陽性域に一致しており、新生血管増成には VEGF が関与していることは明らかである。そこでこれらの新生血管増殖因子がいかなる細胞から産生され間質に放出されているかを検討すると、肝細胞ではなく、間質に浸潤する CD68 ならびに CD163 で免疫染色される 2 種類の macrophage が同定された。そのうち肝臓の resident macrophage である肝 kupffer 細胞であることを示す CD163 で免疫染色される macrophage は、CD68 で免疫染色される肝臓の類洞に外部から侵入した外来性の macrophage に比べその染色性は弱かった (図 4)。ただし、CD163 で免疫染色される肝 kupffer 細胞の染色性は、CD31 の染色性が強い領域で強い傾向にあることが明らかとなった。

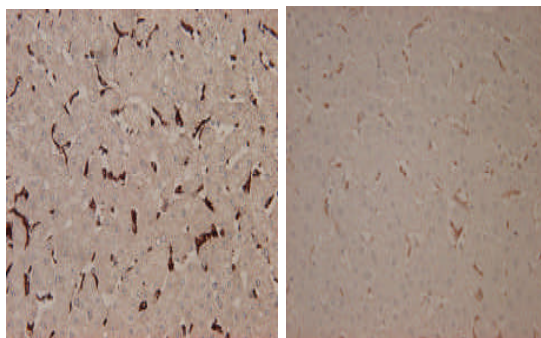


図 4 : CD68 (外来性の macrophage) CD163 (肝 Kupffer 細胞)

(4) (3) で明らかにされたように、CD163 で免疫染色される肝 kupffer 細胞が、腫瘍周囲の血管新生に関与していることが強く示唆されたため、また (2) で明らかと

なったように、CD-31 高発現群で全生存期間及び無再発生存期間が短縮することが明らかになっているため、CD68 で免疫染色される外来性の macrophage 及び CD163 で免疫染色される肝 kupffer 細胞のいずれが、CD-31 の発現と相関する全生存期間及び無再発生存期間に関係するのかを検討したが、CD68 で免疫染色される外来性の macrophage 及び CD163 で免疫染色される肝 kupffer 細胞、各々単独では全生存期間及び無再発生存期間と明らかな相関は認められなかった。しかし、間質に浸潤している全 macrophage のうち、肝臓の resident macrophage である肝 kupffer 細胞 (CD163 陽性) の比率が上昇すると、その無再発生存率が有意に不良になることが明らかとなった (図 5)。さらに、その比率により症例を 2 群に分類すると、統計学的に有意差を持って明らかに、肝臓の resident macrophage である肝 kupffer 細胞 (CD163 陽性) の比率が高値である症例で無再発生存期間が短かった。

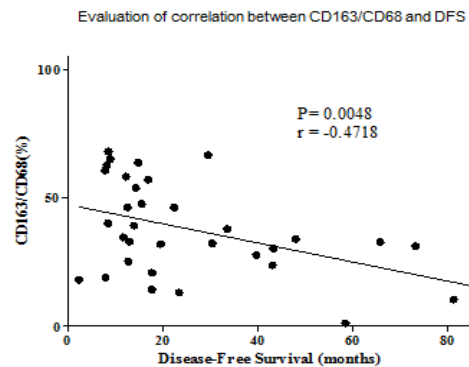


図 5 : CD163/CD65 は無再発生存期間と有意に逆相関する。

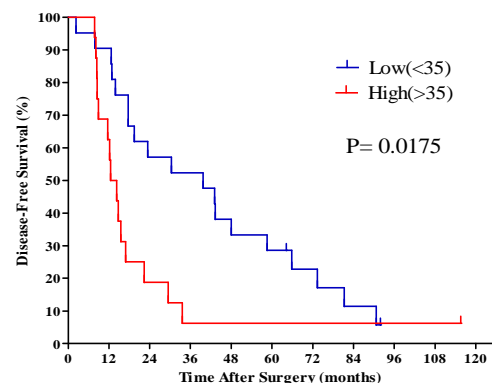


図 6 : CD163/CD65 高値群は CD163/CD65 低値群に比較して無再発生存期間は有意に不良である。

- (5) そこで、無再発生存期間に関連するとの結果を得た CD-31 ならびに CD163/CD65 により、いずれもの症例、いずれも高値の症例、いずれかが高値でありしかも同時にいずれかが低値の症例の3群に分け無再発生存期間を検討した。その結果、CD-31 ならびに CD163/CD65 のいずれもが高いものほど、すなわち肝 kupffer 細胞が腫瘍近傍に浸潤し、かつ新生血管が多くみられる症例は、CD-31 ならびに CD163/CD65 のいずれもが低値である症例に比較して、有意に無再発生存期間が短かった。さらに興味あることに、CD-31 ならびに CD163/CD65 のいずれか一方のみが高値である症例は、その無再発生存期間は CD-31 ならびに CD163/CD65 のいずれもが高値である症例と、CD-31 ならびに CD163/CD65 のいずれか一方のみが高値である症例の間であった(図 7)。

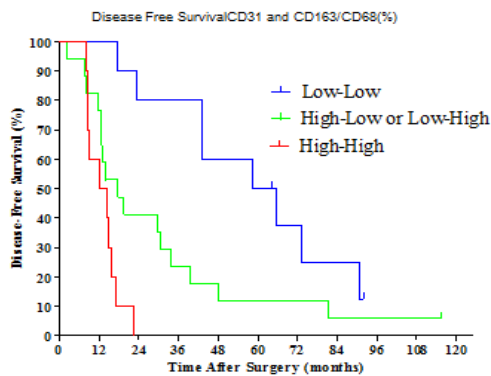


図 7 : CD-31 ならびに CD163/CD65 の高値、低値の組合せからみた無再発生存期間

今回の研究結果から肝 kupffer 細胞が腫瘍周辺の正常肝細胞からの VEGF を誘導し、血管新生を促進し、転移・浸潤を誘発し、無再発生存期間を短縮している可能性がきわめて高いことが明らかになり、きわめて興味深い知見である。今後、肝 kupffer 細胞がどのように VEGF を誘導するのかについてそのカスケードを明らかにしてゆく予定である。

## 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 4 件)

- ① Sano K, Ichikawa T, Motosugi U, Sou H, Muhi AM, Matsuda M, Nakano M, Sakamoto M, Nakazawa T, Asakawa M, Fujii H, Kitamura T, Enomoto N, Araki T. Imaging study of early hepatocellular carcinoma: usefulness of gadoxetic acid-

enhanced MR imaging., 2011; 261(3):834-44 (査読有)

- ② Motosugi U, Ichikawa T, Sano K, Sou H, Onohara K, Muhi A, Kitamura T, Amemiya F, Enomoto N, Matsuda M, Asakawa M, Fujii H, Araki T. Double-dose gadoxetic Acid-enhanced magnetic resonance imaging in patients with chronic liver disease., Invest Radiol. 2011; 46(2): 141-5 (査読有)
- ③ Matsuda M, Asakawa M, Amemiya H, Fujii H. Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of AFP is a useful prognostic biomarker for survival after repeat hepatic resection for HCC., J Gastroenterol Hepatol. 2011; 26(4): 731-8 (査読有)
- ④ Matsuda M, Shiba S, Asakawa M, Kono H, Fujii H. Complete remission of multiple recurrent hepatocellular carcinomas by oral administration of enteric-coated tegafur/uracil in a patient with huge hepatocellular carcinoma extending to the inferior vena cava after hepatic resection: analysis of mRNA expression of fluoropyrimidine metabolism enzymes in the primary tumor., Int J Clin Oncol. 2009; 14(3): 245-8 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 松田政徳 他, 肝細胞癌切除後 10 年以上無発症症例の検討からみえてきた、長期生存に寄与する因子, JDDW2011, 2011.10.20, 福岡県
- ② 松田政徳 他, 長期生存を目指した肝細胞癌切除後再発への治療戦略とその成績, 第 65 回日本消化器外科学会総会, 2010.7.14, 山口県
- ③ 松田政徳 他, 長期予後改善をめざした肝細胞癌治療一切除後再発の治療戦略とその成績, 第 46 回日本肝臓研究会, 2010.7.8,

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅川 真巳 (ASAKAWA MASAMI)  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部  
・医学研究員  
研究者番号: 10456460

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし