

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06935

研究課題名(和文) 肝細胞癌の門脈浸潤の制御分子の同定

研究課題名(英文) Identification of key molecules controlling portal vein invasion of hepatocellular carcinoma

研究代表者

矢野 博久 (Yano, Hirohisa)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：40220206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肝細胞癌(HCC)の門脈浸潤(PVI)に密に関連する分子をHCCの切除肝組織のレーザーマイクロダイセクション法を用いて採取した組織のマイクロアレイ解析によりPVIに関連する候補として3分子(stromal interaction molecule 2 (STIM2)、codanin 1 (CDAN1)、suppressor of Ty 5 homolog (SPT5))を最終的に同定した。HCC症例の免疫染色で、3分子共にPVIと有意に関連がある事を確認した。CDAN1とSPT5を強発現する細胞の割合はHCCの外科切除後の無再発生存期間と全生存期間にも有意に関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌(HCC)の2019年の日本における死亡者数は25,264人で悪性新生物の中では死因の第5位である。HCCは比較的高頻度に癌結節周囲の門脈に浸潤する。門脈浸潤(PVI)を伴うHCC患者は予後不良であり、HCCのPVIに関する分子機序の解明が必要である。今回、このPVIに係わる3分子を新規に同定した。この内、2分子のHCCにおける発現は再発や全生存に関連する事も初めて明らかにした。これらの分子の腫瘍組織あるいは血液(リキッドバイオプシーなど)における発現の評価は、PVIや予後の予測、効果的な治療方法の選択に利用可能と考えられ、HCCの死亡率を減少させることに貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated molecules closely related to portal vein invasion (PVI) of hepatocellular carcinoma (HCC) by using microarray analysis of tissue collected using laser microdissection from resected liver tissue of HCC. We finally identified three molecules: stromal interaction molecule 2 (STIM2), codanin 1 (CDAN1), and suppressor of Ty 5 homolog (SPT5). Immunostaining of HCC cases confirmed that all three molecules were significantly associated with PVI. The proportion of cells strongly expressing CDAN1 and SPT5 was also significantly associated with recurrence-free survival and overall survival after surgical resection of HCC.

研究分野：肝臓病理学

キーワード：肝細胞癌 門脈浸潤 マイクロアレイ 免疫染色 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝臓がんは、世界では死亡数が第2位の悪性腫瘍であり、日本でも死亡数は第5位に位置している。肝臓がんの約80%は肝細胞癌(HCC)である。近年、画像診断の進歩やHCC発生の高危険群のサーベイランスにより早期発見が可能となり治療成績は向上してきたが、外科切除5年後の再発率は約70%と未だに高く、5年生存率も40%前後にとどまっている。

(2) HCCの重要な生物学的特徴として門脈侵襲(PVI)があり、肝内転移・再発と深く関与しているため、患者の予後に大きく関連する。PVIと関連が深いものとして、肉眼型が単純結節周囲増殖型・多結節癒合型、組織型が低分化型、腫瘍径が3cm以上を呈するHCCと報告されている。

(3) PVIに関連した分子としては、Liver-intestine cadherinなどの細胞接着分子、TGF- β などの上皮間葉転換分子、HGF/c-Metなどの細胞運動関連分子などが報告されているが、PVIのバイオマーカーや治療標的となるような絶対的分子の同定には至っていない。これまで、SAL4やケラチン19などの幹細胞/胆管系マーカーがHCCの生物学的に悪性の症例で発現が見られるという報告があるが、生物学的悪性度とPVIは密に関係しているため、本研究により標的分子が同定できれば、HCCの悪性度評価、治療選択、予後予測にも貢献できると考える。

2. 研究の目的

(1) 本研究の最終目的は、HCCのPVIに密に関連する分子を同定し、その機能を解明し、更に、HCCの悪性度評価のバイオマーカーや治療標的となる可能性について検討することが目的である。

(2) 同定された分子のHCC組織における免疫組織学的発現やHCC患者の血清中のレベルによりPVI、肝内転移(IM)、再発などの予測を判定できるバイオマーカーとなり得るかどうかについて検討する。次に、同定された分子とその周囲のシグナル伝達系を検討することによりHCCの治療標的、すなわち、新たな分子標的治療に繋がる可能性について検討したい。

3. 研究の方法

(1) 外科的に切除されたHCCを含む肝組織をホルマリンで固定し、HCCの主結節の最大径が入った組織からホルマリン固定パラフィン(FFPE)切片を作成し、HE染色後にPVIの有無を検討した。PVIを伴う6症例のHCCを使用して、主結節(MT)部、PVI部、非腫瘍(NT)部からレーザーマイクロダイセクション装置(Leica LMD7)を用いて顕微鏡下にそれぞれの組織を採取し遺伝子発現解析に使用した。

(2) 遺伝子発現の検討には、Arcturus Paradise PLUS Reagent Systemを使用し採取された組織からRNAを抽出し、マイクロアレイ(GeneChip 3' IVT Express Reagent kit、Affymetrix GeneChip Human X3P Array使用)を使用して網羅的に遺伝子発現を検討し、PVIに特異的分子の同定を試みた。すなわち、NT部、MT部とPVI部の遺伝子を比較して、NT部からPVI部に段階的に上昇する遺伝子の検索を行った。

(3) PVI陽性のHCC 22症例とPVI陰性のHCC 30症例のFFPE切片を用いて、同定された複数の分子について、ベンタナ社製自動免疫染色装置を用いて免疫染色を行ない発現について検討した。発現の評価は、腫瘍細胞における陽性細胞の割合と染色強度(0: 陰性, 1: 弱, 2: 強)で実施した。それぞれの分子の発現と臨床病理学的所見の関連性を検討し、PVIと最も関係の深い分子を選択し、IMや予後など生物学的悪性度との関連性についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) 6症例で有意にPVI部において遺伝子発現が上昇している分子の同定は出来なかったが、少なくとも3症例で遺伝子発現が増加(27分子)あるいは低下(1分子)している分子を28分子同定した。その中でTCGA data base上でがんに関連する15分子に着目し、更にこれまでHCCとの関連性が報告されていないstromal interaction molecule 2 (STIM2)、codanin 1 (CDAN1)、suppressor of Ty 5 homolog (SPT5)の3分子に注目し、検討を進めた。

(2) 免疫染色ではSTIM2(図1)、CDAN1(図2)は腫瘍細胞の細胞質に発現を認め、SPT5(図3)は腫瘍細胞の核に発現を認めた。

(3) 陽性腫瘍細胞の割合は、いずれの分子も、PVI陽性群がPVI陰性群より高値であった(STIM2: 73.6% vs. 43.1%, $p < 0.01$; CDAN1: 45.5% vs. 27.8%, $p < 0.05$; SPT5: 16.8% vs. 8.8%, $p < 0.06$)。

(4) 染色強度に関しては、強発現する腫瘍細胞をPVI陽性群(STIM2: 9例; CDAN1: 19例)と陰性群(STIM2: 8例; CDAN1: 13例)で認めたが、STIM2とCDAN1に関してはPVI陽性群でより多くの症例で認めた。

(5) 強発現腫瘍細胞はPVI陽性群ではPVI部に多く見られた(図4)。CDAN1を強発現する腫瘍細胞の割合はPVI陽性群でPVI陰性群より高値であった(12.3% vs. 5.4%, $p < 0.05$)。

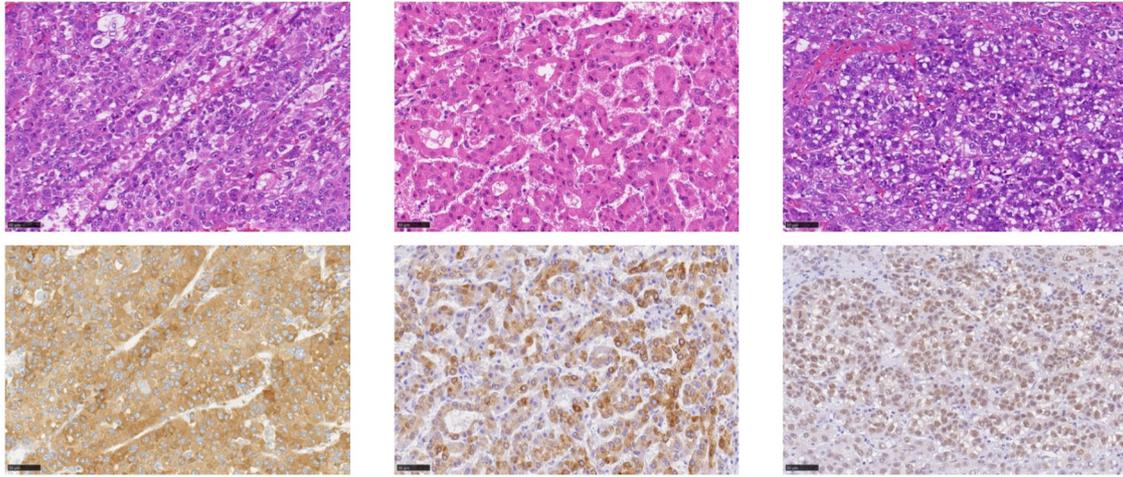


図1 HCCのHE染色組織像（上）と同部のSTIM2の発現（茶色）（下）

図2 HCCのHE染色組織像（上）と同部のCDAN1の発現（茶色）（下）

図3 HCCのHE染色組織像（上）と同部のSPT5の発現（茶色）（下）

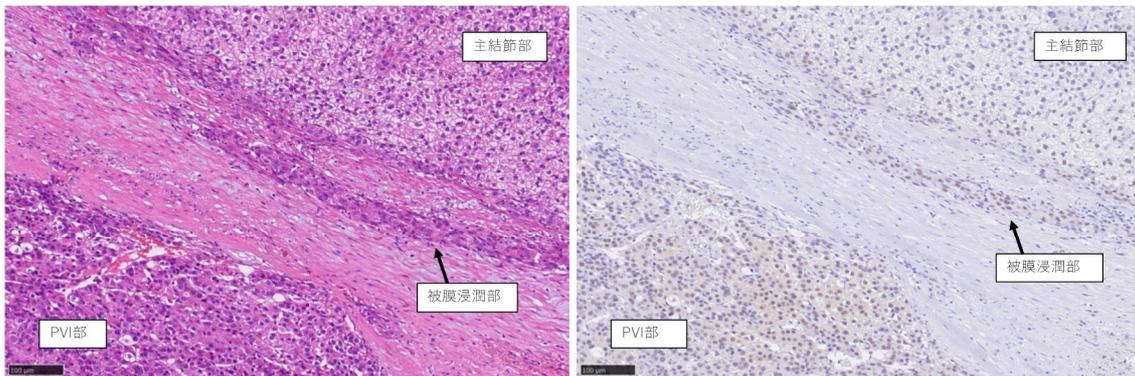


図4 左：門脈侵襲（PVI）を伴うHCCの組織像（HE染色）を示す。主結節部、被膜浸潤部およびPVI部が見られる。右：SPT5の免疫染色では、被膜浸潤部とPVI部のHCCの核にSTIM2の強い発現（茶色）を認める。

(6) CDAN1 と SPT5 を強発現する細胞の割合は HCC の外科切除後の無再発生存期間と全生存期間にも有意に関連していた。

(7) 結論として、HCC の PVI に関連する分子として STIM2、CDAN1、SPT5 を同定した。STIM2 と CDAN1 は、陽性腫瘍細胞の割合も強発現細胞数も PVI 陰性群より PVI 陽性群で多く見られ、特に CDAN1 では PVI 部の腫瘍細胞で強発現する腫瘍が多くみられ、PVI や予後との関連性が示唆された。

(8) ここまでの結果は、第 56 回日本臨床分子形態学会（2024 年 9 月 28 日、29 日開催）、第 28 回日本肝臓学会大会（2024 年 10 月 31 日、11 月 1 日開催）、The Liver Meeting 2024（2024 年 11 月 15 日-19 日開催）に抄録を提出中であり、受理されれば発表予定である。

(9) HCC の細胞株を使用して、同定した分子の発現や機能を検討し、バイオマーカーや治療標的となり得るか検討を行いたかったが、研究が途中遅れたこともあり、3 年間ではそこまでは至らなかった。HCC 細胞株が、これら 3 分子のうちいずれかを培養液中へ分泌していることが確認できれば、HCC 患者血清中に検出できる可能性があるため、保存している患者血清を使用し今後検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	秋葉 純 (Akiba Jun) (00341305)	久留米大学・大学病院・教授 (37104)	
研究分担者	小笠原 幸子 (Ogasawara Sachiko) (40258405)	久留米大学・医学部・准教授 (37104)	
研究分担者	三原 勇太郎 (Mihara Yutaro) (20869086)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	近藤 礼一郎 (Kondo Reiichiro)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	
研究協力者	宮崎 大貴 (Miyazaki Daiki)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------