

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462092

研究課題名(和文) 肝癌の移植後再発を規定する宿主臓器・腫瘍微小環境の機序解明

研究課題名(英文) Mechanism of host organs and tumor microenvironment that related tumor recurrence after liver transplantation

研究代表者

居村 暁 (IMURA, Sarotu)

徳島大学・大学病院・特任教授

研究者番号：90380021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題研究により得られた以下の知見を論文あるいは学会で報告した。肝癌において、(1) 転写因子STAT4発現は細胞性腫瘍免疫指標であり予後不良因子である。(2) 非癌部におけるCD44遺伝子(癌幹細胞指標)発現は、切除後の多中心性・肝内転移再発に関与する。(3) 非癌部Fbxw7(癌抑制遺伝子)低発現群では有意に多中心性再発が高頻度であり、Fbxw7低発現が肝発癌に関与する。(4) 細胞増殖因子Nek2遺伝子の高発現は腫瘍悪性度と関連し、再発危険因子となる。(5) 肝癌細胞を肝星細胞と共培養することで肝癌細胞の増殖・浸潤・遊走能が増強し、経路としてIL-6やMMP-9が関与する。

研究成果の概要(英文)：We studied the mechanism of hepatocellular carcinoma (HCC) progression focused on cancer microenvironment. In HCC, (1) transcription factor STAT4 expression is an index of the cancer immunity and is a poor prognostic factor, (2) cancer stem cell marker CD44 gene expression in non-tumor liver tissue is involved in multicentric recurrence and intrahepatic metastases, (3) cancer suppressive gene Fbxw7 expression decreased in HCC. In the analysis of Fbxw7 expression in non-tumor tissues, the multicentric recurrence was more frequent in the low expression group than that in the high expression group. Low Fbxw7 expression may be associated with hepatocarcinogenesis, (4) overexpression of the cell growth factor Nek2 gene was recurrent risk factor associated with tumor grade, (5) by co-cultivation of cancer cells with hepatic stellate cell, proliferation, invasion, and migration abilities of cancer cells was increased via IL-6 or MMP-9 pathway.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝癌 肝切除 肝移植 再発 腫瘍微小環境

### 1. 研究開始当初の背景

癌は生体内制御機構から逸脱し無秩序な増殖をするという特徴を有しており、癌の致死率を規定する最大の要因は、原発巣での増殖ではなく、転移巣における増殖である。転移癌細胞は異常な運動能・接着能・細胞外基質の破壊能など様々な性質を兼ね備えており、これまでに癌転移に関わる様々な分子が同定されてきた。さらに最近では、原発巣における癌細胞自身の変化に加え、転移先臓器内の微小環境が転移形成に重要な役割を果たしていることが知られている。

肝臓に対する究極治療である肝移植後の肝臓再発の規定因子を考える上で、通常の再発と異なる点は移植後再発に多中心性発癌や肝内転移再発はなく、すべて循環血中の癌細胞あるいは移植時既に他臓器に存在した micrometastasis (微小転移巣) によるという点である。しかも同じ進行度でも術後再発する人とならない人がおり腫瘍悪性度だけで説明がつかないことがあり、腫瘍だけでなく宿主転移先臓器の微小環境 (microenvironment) が転移再発に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

肝細胞癌 (肝臓) における宿主臓器、腫瘍の微小環境 (microenvironment) からみた転移機構解明を主な目的とする。肝臓はひとたび門脈内進展すれば容易に肝内転移を起こし制御困難となることが治療抵抗性の一要因である。また肝移植後の肝臓再発はすべて血中癌細胞あるいは移植時既に他臓器に存在する微小転移による再発のため制御困難である。しかし、このような転移再発に関して、非癌部肝組織による転移形成の違いは不明である。一方、肝臓の治療抵抗性には原発巣から出る際、癌組織微小環境の影響による上皮間葉転換 (EMT) が必要でその制御は肝臓治療の大きな課題である。そこで本研究では、宿主の臓器微小環境 (organ microenvironment) および腫瘍微小環境 (tumor microenvironment) に着目した転移機構解明を目指して研究を遂行することを目的とした。

具体的には以下の研究を行った。

(1) 肝臓における STAT4 発現と細胞性腫瘍免疫

(2) 肝臓における CD44 発現

(3) 肝臓における Fbxw7 発現

(4) 肝臓における Nek2 発現

(5) 肝臓の浸潤・転移における肝星細胞の役割

### 3. 研究の方法

(1) 肝臓切除標本 (n=66) を用いて Real-time PCR 法にて STAT4 および IFN の遺伝子発現量を解析し低発現・高発現の2群に分類した。また免疫組織染色にて STAT4、IFN、CD8 陽性 T 細胞を染色し、臨床病理学的因子との関連を検討した。

(2) 肝細胞癌切除標本 (n=48) の非癌部における CD44 遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討し、CD44 高発現群と低発現群とに分類し、臨床病理学的因子を比較検討した。

(3) 肝臓における Fbxw7 発現を癌部および非部について定量的 RT-PCR 法で遺伝子発現を解析した (n=66)。中央値で低発現・高発現群に分け、予後を含めた臨床病理学的因子との関連を検討した。

(4) 肝臓切除標本 (n=50) を用いて癌部および非癌部の Nek2 発現について RT-PCR と免疫染色で評価し、癌部 Nek2 mRNA 発現の中央値で2群に分類し、臨床病理学的因子との関連につき検討した。

(5) 肝臓細胞株 (HuH-7・HepG2)、肝星細胞株 (LX2) を 72 時間培養した後、それぞれの細胞増殖能 (Cell proliferation assay) と細胞遊走能 (Cell migration assay) を検討した (肝臓細胞株  $1 \times 10^5$  個 + 肝星細胞株  $1 \times 10^5$  個を 96 well plate)。さらに肝臓細胞と肝星細胞の共培養において細胞接触を防ぐため、肝臓細胞株 + 肝星細胞株を Trans-well® Permeable well にて 72 時間培養した後、肝臓細胞の細胞増殖能 (Cell proliferation assay)・細胞遊走能 (Cell migration assay) を 96 well plate にて培養した肝臓細胞と比較検討した。

### 4. 研究成果

(1) 非癌部における STAT4 および IFN 遺伝子発現は癌部と比較して有意に高発現していた。また STAT4 遺伝子発現は IFN 発現と相関しており、さらに STAT4 発現は CD8 陽性細胞浸潤とも相関していた (図 1)。

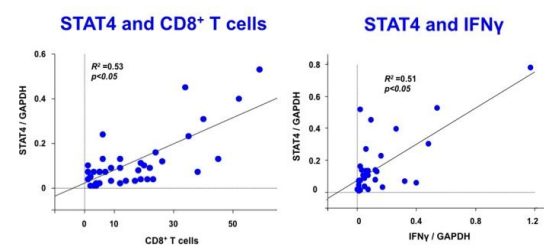


図 1

免疫組織学的染色において CD8 陽性細胞は非癌部で有意に高発現しており、また STAT4 高発現群では低発現群と比較し、CD8 陽性細胞が有意に高発現していた。

無再発生存率の検討では STAT4 および IFN 遺伝子高発現群ではともに低発現群と比較し、有意に生存率が良好であった。

(2) CD44 高発現群 (n=24) は低発現群 (n=24) と比較し、des-gamma-carboxy prothrombin 高値、進行した Stage が多い傾向であり、CD44 高発現群の肝切除後無再発生存率は低発現群と比較し有意に不良であった (3 年: 18.2% vs. 50.1%)。また、CD44 高発現群は低発現群と比較し再発率が高く (70.8% vs. 41.7%)、

多中心性肝内再発を多く認めた。

再発危険因子の検討では、単変量解析で非癌部 CD44 高発現、組織学的門脈侵襲および肝内転移、進行病期が有意な再発危険因子であり、多変量解析では非癌部 CD44 高発現と組織学的門脈侵襲が独立した再発危険因子であった。このことは肝細胞癌の非癌部肝組織における CD44 遺伝子発現は、肝切除術後の多中心性再発のみならず肝内転移再発にも関与することが示唆された。

(3) 癌部と非癌部における Fbxw7 遺伝子発現を比較したところ、癌部で有意に低発現であった。免疫染色でも、癌部は非癌部と比較し発現は有意に減弱しており、特に低分化型肝癌で低発現であった。非癌部での Fbxw7 発現と予後に関しては、累積生存率は両群で差を認めなかったが、無再発生存率では Fbxw7 低発現群で有意に予後不良、すなわち再発が有意に高頻度であった(図2)。

### 非癌部Fbxw7発現と予後

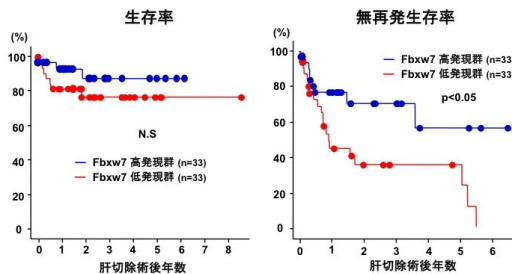


図2

再発形式の検討では、非癌部 Fbxw7 低発現群で多中心性再発が有意に高頻度であり(図3) Fbxw7 低発現が肝発癌ポテンシャルに関与している可能性が考えられた。

### 非癌部Fbxw7と再発形式

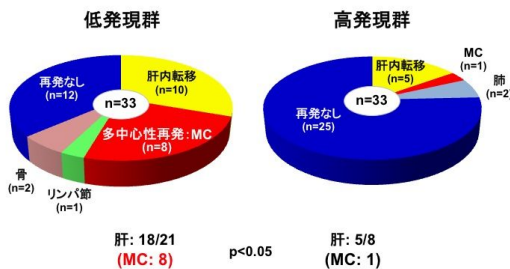


図3

また、無再発生存率において、癌部・非癌部ともに低発現の群は有意に不良であり、癌部あるいは非癌部単独での評価と比べて、より鋭敏に再発リスクを反映した。無再発生存に関する予後因子を検討したところ、多変量解析にて癌部・非癌部ともに低発現が有意な独立予後不良因子として抽出された (HR: 3.12)。

(4) Nek2 遺伝子発現 (RT-PCR 法) は非癌部と比較し癌部で有意に高発現していた(図4)。また、免疫組織染色による Nek2 タンパク発現は非癌部と比較し癌部で有意に高発現していた。

### NEK2 発現 - RT-PCR -

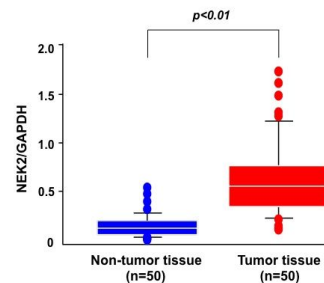


図4

Nek2 遺伝子発現と臨床病理学的因子との関連について、Nek2 高発現群 (n=25) と低発現群 (n=25) で比較したところ、高発現群で有意に組織学的脈管侵襲が高頻度、腫瘍マーカー高値であり、無再発予後も有意に不良であった(図5)。

### 生存率

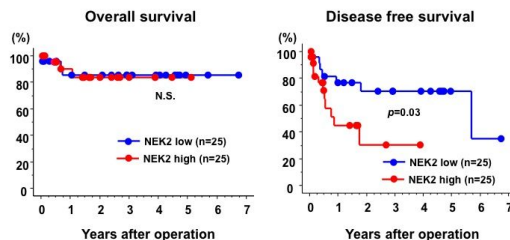
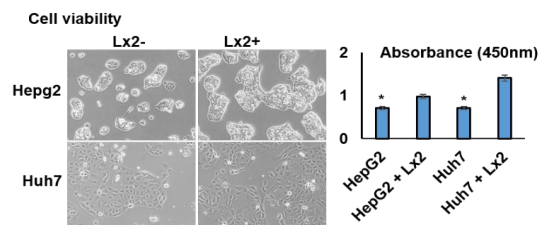


図5

また、ヒト肝癌細胞株 HepG2 (Parental cell および Sphere) における Nek2 発現の検討では、通常条件で培養した Parental cell と比較し、Sphere における Nek2 発現は有意に高く、癌幹細胞マーカーである CD133 および NANOG も Sphere でより高発現していた。

(5) 肝癌細胞と肝星細胞との共培養においては肝癌細胞単独培養群と比較して、肝癌細胞の増殖能・浸潤能・遊走能の増強が認められた(図6)。



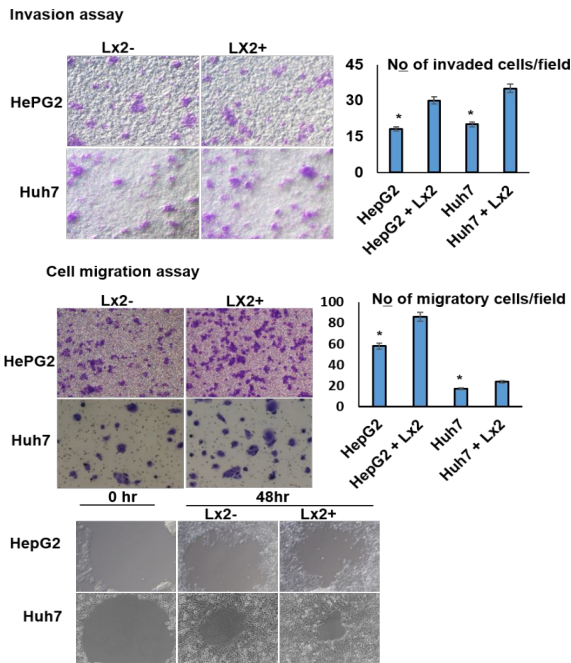


図6

またそのシグナル因子に関しては肝癌細胞と肝星細胞での共培養にて IL-6, MMP-9 の発現上昇が認められた(図7)。

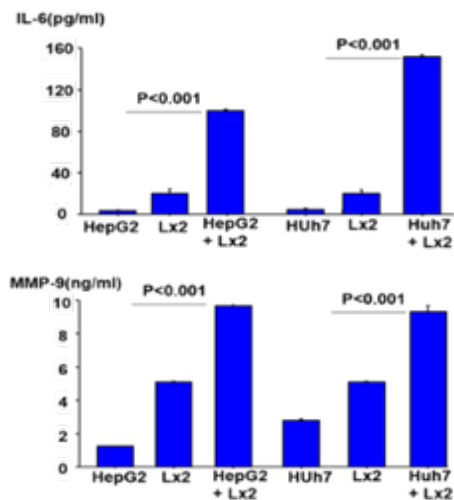


図7

## 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 3 件)

1. Wubetu GY, Morine Y, Teraoku H, Yoshikawa M, Ishikawa D, Yamada S, Ikemoto T, Saito Y, Imura S, Shimada M. High NEK2 expression is a predictor of tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients after hepatectomy. *Anticancer Res.* 2016;36(2):757-762. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=High+NEK2+expression+is+a+predictor+>

[of+tumor+recurrence+in+hepatocellular+carcinoma+patients+after+hepatectomy.](#)

2. Wubetu GY, Utsunomiya T, Ishikawa D, Yamada S, Ikemoto T, Morine Y, Iwahashi S, Saito Y, Arakawa Y, Imura S, Kanamoto M, Zhu C, Bando Y, Shimada M. High STAT4 expression is a better prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Ann Surg Oncol.* 2014;21 Suppl 4:S721-728. doi: 10.1245/s10434-014-3861-9. 査読有
3. Tovuu LO, Imura S, Utsunomiya T, Morine Y, Ikemoto T, Arakawa Y, Mori H, Hanaoka J, Kanamoto M, Sugimoto K, Iwahashi S, Saito Y, Yamada S, Asanoma M, Miyake H, Shimada M. Role of CD44 expression in non-tumor tissue on intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2013;18(4):651-656. doi: 10.1007/s10147-012-0432-6. 査読有

[学会発表](計 4 件)

1. 山田眞一郎, 島田光生, 森根裕二, 居村暁, 池本哲也, 齋藤裕, 吉川雅登, 寺奥大貴  
肝細胞癌症例における NEK2 発現の意義に関する検討  
第 53 回日本癌治療学会学術集会  
2015 年 10 月 29-31 日 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府京都市)
2. 齋藤裕, エンヘボルトチンポルト, 吉川雅登, 寺奥大貴, 石川大地, 岩橋衆二, 荒川悠佑, 池本哲也, 森根裕二, 居村暁, 島田光生  
肝内胆管癌における Fbxw7 発現低下と臨床病理的意義 -細胞増殖・EMT 誘導との関連-  
第 27 回日本肝胆膵外科学会  
2015 年 6 月 11-13 日 ホテル グランパシフィック LE DAIBA(東京都港区)
3. 山田眞一郎, 島田光生, 森根裕二, 居村暁, 池本哲也, 荒川悠佑, 岩橋衆二, 齋藤裕, 石川大地, 寺奥大貴, 吉川雅登  
肝内胆管癌における細胞周期調節因子 Fbxw7 の発現低下は独立予後規定因子である  
第 115 回日本外科学会定期学術集会  
2015 年 4 月 16-18 日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

[その他]

ホームページ等  
徳島大学 消化器・移植外科ホームページ  
<http://www.tokugeka.com>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

居村 暁 (IMURA, Satoru)  
徳島大学・病院・特任教授

研究者番号：90380021

(2)研究分担者

島田 光生 (SHIMADA, Mitsuo)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号：10216070

森根 裕二 (MORINE, Yuji)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師  
研究者番号：60398021

池本 哲也 (IKEMOTO, Tetsuya)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号：20398019

岩橋 衆一 (IWAHASHI, Shuichi)  
徳島大学・病院・特任助教  
研究者番号：30531751

坂東 良美 (BANDO, Yoshimi)  
徳島大学・病院・准教授  
研究者番号：00238239

宇都宮 徹 (UTSUNOMIYA, Toru)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授  
研究者番号：30304801