

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591614

研究課題名（和文） 肝細胞癌浸潤・転移における Fascin 蛋白の機能解析とその臨床応用

研究課題名（英文） Role of Fascin protein in proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma.

研究代表者

武富 紹信 (TAKETOMI AKINOBU)

九州大学・医学研究院・消化器・総合外科・助教

研究者番号：70363364

研究成果の概要（和文）：

Fascin はアクチン結合蛋白質であり、細胞膜運動に重要な役割を担っている。Fascin の発現は様々な癌で報告されており、その増殖や予後に関わるとされているが肝細胞癌 (HCC) における意義は未だ不明であった。そこで我々は 137 例の HCC 切除検体を使用して免疫組織化学的に Fascin の発現程度を検討したところ、23 例 (16.8%) の症例において Fascin は高発現しており、その発現と腫瘍サイズや腫瘍分化度と有意に相関を認めた。さらに Fascin 高発現症例では、門脈浸潤、胆管浸潤、肝内転移が高頻度に認められ、AFP 値と Fascin 発現とは相関していた。また、Fascin 高発現群の予後は有意に低発現群と比較して不良であり、無再発生存の独立した危険因子であった。これらのことから、Fascin は HCC 増殖の新しいマーカーであり、予後を予測するための指標になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

BACKGROUND: Fascin is an actin-bundling protein and induces membrane protrusions and cell motility after the formation of lamellipodia or filopodia. Fascin expression has been reported to be associated with progression or prognosis in various neoplasms, but the role of fascin in hepatocellular carcinoma (HCC) remains unknown. The aim of this study was to investigate the clinicopathological and prognostic relevance of fascin by immunohistochemistry. **METHODS:** A total of 137 patients with HCC were stained with anti-fascin antibody. The tumor cells having unequivocal cytoplasmic and/or membranous fascin immunoreactivity were defined as fascin-positive. **RESULTS:** Immunohistochemically, 23 (16.8%) HCCs having unequivocal fascin immunoreactivity were found. Tumors showing fascin expression were larger and less differentiated than those showing no fascin expression ($P = 0.0239$ and 0.0018 , respectively). Portal venous invasion, bile duct invasion, and intrahepatic metastasis were detected significantly more frequently in fascin-positive group ($P = 0.0029$, 0.0333 , and 0.0403 , respectively). In addition, high alpha-fetoprotein (AFP) levels were significantly associated with the fascin expression in HCC ($P = 0.0116$). Fascin-positive group had significantly poorer outcomes than fascin-negative group and was an independent prognostic factor for disease-free survival. **CONCLUSIONS:** Fascin might become a novel marker of progression in HCC and a significant indicator of a poor prognosis for patients with HCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：肝胆膵外科

科研費の分科・細目：7302 消化器外科学

キーワード：Fascin、肝細胞癌、予後、無再発生存

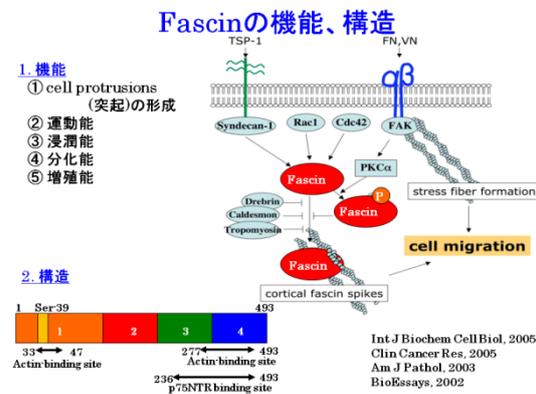
1. 研究開始当初の背景

(1) 肝細胞癌の予後と治療法

肝細胞癌に対する診断や治療法は向上しているが、第17回全国原発性肝癌追跡調査報告によると切除後の5年生存率は35.4%と低く、また他の報告においても70~100%と高い再発率を示し、その予後は未だ不良である。最近では、その発生母地である肝炎・肝硬変組織も同時に置換する肝移植が有効な治療法として実施されている。確かに、ミラノ基準内の肝癌であれば移植後の生存率は非常に良好である。しかし、多くの移植実施施設では脈管浸潤や遠隔転移を伴う進行肝癌症例は適応外としている事から、進行肝癌症例に対しては有効な治療手段が無いのが現状である

近年、消化器癌の領域において様々な分子標的治療薬が開発され臨床の現場で高い効果を示しているが、肝細胞癌に効果が証明された治療薬は未だなく、肝細胞癌に対する標的分子の同定・機能解析を基礎とした分子標的治療の開発が切望されている。

(2) Fascin 蛋白質とその機能



Fascin 蛋白質は染色体 7p22 よりコードされる 493 アミノ酸よりなる球状の actin-binding protein であり、正常の間葉組織、神経組織に発現している (Hashimoto Y. Int J Biochem Cell Biol 2005; Hashimoto Y. BMC Cancer 2006)。Fascin 蛋白質はアクチン束を平行に結合させることで、lamellipodia や filopodia を形成し、細胞運動・浸潤に関わっていると考えられている。Hashimoto らは、食道癌細胞株を用い、siRNA をトランスフェクションすることにより、Fascin 蛋白質が細胞の運動能、浸潤能に関与していることを

証明した (Hashimoto Y. Clin Cancer Res 2005)。また Fascin は E-cadherin と競合的に beta-catenin に結合すると言われており (Tao et al. J Cell Biol 1996)、これらの調整機構により Fascin が細胞運動能に寄与していることが推測されている。

一方、正常の大腸上皮細胞株に Fascin を高発現させることで正常の腺管の構築が崩れ、また細胞増殖能が増加することが報告されている (Jawhari et al. Am J Pathol 2003)。さらに、口腔扁平上皮癌 (Lee et al. Cancer Lett 2007)、胃癌 (Hashimoto et al. Oncology 2004)、食道癌 (Hashimoto et al. Clin Cancer Res 2005)、乳癌 (Yoder et al. Clin Cancer Res 2005) などの各種固形癌において Fascin の発現と臨床病理学的因子ならびに予後との関連が報告されるなど、Fascin 蛋白質はヒト癌の脱分化、増殖能に関わっていることが推測され、発癌、進展、転移に対する分子標的治療のターゲットとして期待されている。

(3) これまでの肝癌細胞運動機能解析

我々は細胞運動調整因子である focal adhesion kinase (FAK) やそのアダプター分子である Grb7 の高発現が肝細胞の予後と関連する事を報告してきた (Itoh S. Clin Cancer Res 2004, Itoh S. Mol Cancer Res 2007)。FAK や Grb7, Thrombospondin-1 などの細胞運動制御蛋白群と Fascin 蛋白質の間には PKC α/β 等のメッセンジャー分子、もしくはリン酸化等により緊密な関係があり細胞運動を調節していると考えられる。これらの関連および肝細胞癌における Fascin 蛋白質の動態を解明する事は、その浸潤・転移メカニズムを詳細に明らかにし、さらには進行肝癌症例の分子標的治療の開発につながる意義のある研究であると考えられる。すでに、我々は肝内胆管癌切除症例のパラフィン包埋標本を用い、Fascin に対する免疫組織化学染色を行い、臨床病理学的因子、予後との関連について検討をすすめている。Fascin の過剰発現は肝内胆管癌における独立予後因子であり、腫瘍径や分化と関連していたことから、肝癌の一つである肝内胆管癌の発癌、進展に Fascin は関与していることが示唆された (未発表データ)。

2. 研究の目的

肝細胞癌における発癌、進展および転移における Fascin の役割を解明する。

- ①ヒト肝細胞癌における Fascin 発現の検討と臨床病理学的因子との関連を検討する。
- ②肝癌細胞株を用いた発癌・進展における Fascin 蛋白の機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌における Fascin 蛋白発現の検討：免疫組織化学染色、外科切除検体

①使用した抗体：抗 fascin 抗体

(monoclonal, 55K-2, Novocastra 社)

②免疫組織化学染色および評価

パラフィン包埋ブロックを用い、SAB 法にて免疫組織化学染色を行った。癌細胞 1000 個あたりの Fascin 発現の有無を評価し、陽性細胞数 1%以上を陽性群とした。

③蛍光染色

固定した肝癌細胞株を用い、蛍光染色を行い蛍光顕微鏡でその細胞内発現分布および形態を観察した。

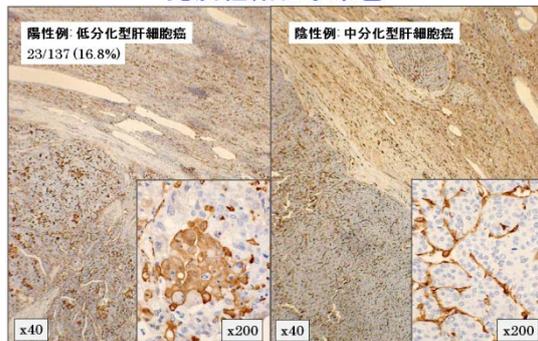
(2) 細胞株における Fascin 発現の検討：肝癌細胞株、免疫蛍光染色

4. 研究成果

(1)免疫組織化学染色による Fascin 発現

Fascin 蛋白質は正常上皮においては発現を認めなかったが、胆管上皮および血管内皮において発現していた。肝細胞癌においては Fascin の発現は細胞質や細胞膜に認められた。検討した 137 例の肝細胞癌のうち、23 例 (16.8%)にのみ発現していた。Fascin 陽性癌細胞はびまん性もしくは巣状に認められた。さらに、門脈内に浸潤した肝癌細胞にも発現していた。

免疫組織化学染色



(2)Fascin 発現と臨床病理学因子の比較検討

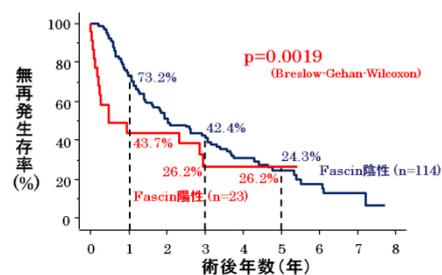
検討した 137 例を Fascin 陽性群 23 例と Fascin 陰性群 114 例の 2 群に分けて臨床病理学的因子と比較検討したところ、性、年齢、術前肝機能、手術因子に有意差は認められなかった。術前 AFP 値は Fascin 陽性群で有意に高値であり、腫瘍径は大きく、腫瘍分化度は有意に低分化であった ($p < 0.05$)。高分化型肝細胞癌には Fascin の発現は認められなかった。門脈腫瘍栓 ($p = 0.0029$)、胆管浸潤 ($p = 0.033$)、肝内転移 ($p = 0.0403$) はより Fascin 陽性群に多く認められた。ロジスティック解析にて検討したところ、臨床病理学的因子のなかで唯一 AFP のみが Fascin 発現と相関する因子であった。

Fascin 蛋白発現と臨床病理学因子との関連

臨床病理学的因子	Fascin陰性 (<1%, n=114)	Fascin陽性 (≥1%, n=23)	p-value
AFP (>100 / ≤100 ng/ml)	27/87	13/9	0.0021
腫瘍径 (>5cm, / ≤5cm)	20/94	11/12	0.0038
組織学的分化度 Poorly (%)	24.6	60.9	0.0018
門脈浸襲 (%)	45 (39.5%)	17 (73.9%)	0.0051
胆管浸襲 (%)	2 (1.8%)	3 (13.0%)	0.0425
肝内転移 (%)	28 (24.6%)	11 (47.8%)	0.0451

(3) 肝切除後予後との関連

Fascin発現の有無と術後無再発生存率



Fascin 陰性群では肝切除後 1、3、5 年無再発生存率は 73.2%、42.4%、24.3%であるのに対し、Fascin 陽性群は 43.7%、26.2%、26.2%と有意に予後不良であった ($p = 0.0019$)。さらに、Fascin 陰性群の肝切除後 1、3 生存率は 97.3%、87.1%であったのに対し、Fascin 陽性群は 77.3%、67.3%であり、有意に Fascin 陽性群で予後不良であった ($p = 0.0076$)。

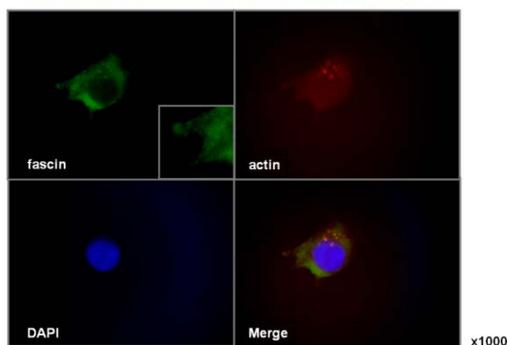
さらに、多変量解析では、肝内転移の有無、AST>53IU/L、ICG15 分値>16.2%、術中出血量<780cc、肝硬変の有無に加えて、Fascin 陽性

が無再発生存に寄与する独立因子の一つとして抽出された。

(4) 肝癌細胞における Fascin の局在

HLE 肝癌細胞株を用いて蛍光抗体法にて Fascin の細胞内分布を検討した。図に示す如く Fascin は主に細胞質に存在するが、細胞運動に伴い Lamellipodia などの細胞突起内に移動し actin filament と共存していた。

肝癌細胞株における Fascin の局在



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 16 件)

1. **Taketomi A**, Fukuhara T, Morita K, Kayashima H, Ninomiya M, Yamashita Y, Ikegami T, Uchiyama H, Yoshizumi T, Soejima Y, Shirabe K, Maehara Y.: Improved results of a surgical resection for the recurrence of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(9):2283-2289.
2. **Taketomi A**, Toshima T, Kitagawa D, Motomura T, Takeishi K, Mano Y, Kayashima H, Sugimachi K, Aishima S, Yamashita Y, Ikegami T, Gion T, Uchiyama H, Soejima Y, Maeda T, Shirabe K, Maehara Y.: Predictors of extrahepatic recurrence after curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(10):2740-2746.
3. **Taketomi A**, Morita K, Toshima T, Takeishi K, Kayashima H, Ninomiya M, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, Maehara Y.: Living donor hepatectomies with procedures to prevent biliary complications. *J Am Coll Surg*. 2010; 211(4):456-464.
4. Ueda S, Shirabe K, Morita K, Umeda K, Kayashima H, Uchiyama H, Soejima Y, **Taketomi A**, Maehara Y. Evaluation of ERCC1 Expression for Cisplatin Sensitivity in Human Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2010 Nov 13. PMID: 21076943
5. Harimoto N, Taguchi K, Shirabe K, Adachi E, Sakaguchi Y, Toh Y, Okamura T, Kayashima H, **Taketomi A**, Maehara Y.: The significance of fibroblast growth factor receptor 2 expression in differentiation of hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 2010; 78(5-6):361-368.
6. Aishima S, Fujita N, Mano Y, Iguchi T, **Taketomi A**, Maehara Y, Oda Y, Tsuneyoshi M.: p62+ Hyaline inclusions in intrahepatic cholangiocarcinoma associated with viral hepatitis or alcoholic liver disease. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134(3):457-465.
7. Ninomiya M, Shirabe K, Terashi T, Ijichi H, Yonemura Y, Harada N, Soejima Y, **Taketomi A**, Shimada M, Maehara Y.: Deceleration of regenerative response improves the outcome of rat with massive hepatectomy. *Am J Transplant*. 2010; 10(7):1580-1587.
8. Shimoda S, Harada K, Niuro H, **Taketomi A**, Maehara Y, Tsuneyama K, Kikuchi K, Nakanuma Y, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K.: CX3CL1 (fractalkine): a signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2010;

- 51(2):567-575.
9. Kayashima H, Toshima T, Okano S, **Taketomi A**, Harada N, Yamashita Y, Tomita Y, Shirabe K, Maehara Y.: Intratumoral neoadjuvant immunotherapy using IL-12 and dendritic cells is an effective strategy to control recurrence of murine hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice. *J Immunol.* 2010; 185(1):698-708.
 10. Fukuhara T, **Taketomi A**, Okano S, Ikegami T, Soejima Y, Shirabe K, Maehara Y. Mutations in hepatitis C virus genotype 1b and the sensitivity of interferon-ribavirin therapy after liver transplantation. *J Hepatol.* 2010; 52(5):672-680.
 11. Fukuhara T, **Taketomi A**, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, Maehara Y. Variants in IL28B in Liver Recipients and Donors Correlate With Response to Peg-Interferon and Ribavirin Therapy for Recurrent Hepatitis C. *Gastroenterology.* 2010; 139(5):1577-1585.
 12. **Taketomi A**, Sanefuji K, Soejima Y, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Harada N, Yamashita Y, Sugimachi K, Kayashima H, Iguchi T, Maehara Y.: The impact of des-gamma-carboxy prothrombin and tumor size on the recurrence of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. *Transplantation,* 2009;87(4):531-537.
 13. **Taketomi A**, Kayashima H, Soejima Y, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Yamashita Y, Harada N, Shimada M, Maehara Y.: Donor risk in adult-to-adult living donor liver transplantation: Impact of left lobe graft. *Transplantation,* 2009;87(3):445-450.
 14. Iguchi T, Aishima S, Umeda K, Sanefuji K, Fujita N, Sugimachi K, Gion T, **Taketomi A**, Maehara Y, Tsuneyoshi M.: Fascin expression in progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol,* 2009; 100(7):575-579.
 15. Iguchi T, Yamashita N, Aishima S, Kuroda Y, Terashi T, Sugimachi K, Taguchi K, **Taketomi A**, Maehara Y, Tsuneyoshi M.: A comprehensive analysis of immunohistochemical studies in intrahepatic cholangiocarcinoma using the survival tree model. *Oncology,* 2009;76(4):293-300.
 16. Iguchi T, Aishima S, **Taketomi A**, Nishihara Y, Fujita N, Sanefuji K, Sugimachi K, Yamashita YI, Maehara Y, Tsuneyoshi M.: Fascin overexpression is involved in carcinogenesis and prognosis of human intrahepatic cholangiocarcinoma: immunohistochemical and molecular analysis. *Hum Pathol,* 2009; 40(2):174-180.
- [学会発表] (計 11 件)
1. **武富紹信**、福原崇介、本村貴志、戸島剛男、武石一樹、森田和豊、萱島寛人、二宮瑞樹、内山秀昭、副島雄二、調 憲、松浦善治、前原喜彦：ウイルスおよび宿主の遺伝子解析による肝移植後再発C型肝炎に対する高精度な IFN 治療効果予測。第 28 回日本肝移植研究会、2010 年 7 月 1-2 日、広島、シンポジウム
 2. **武富紹信**、調 憲、前原喜彦：再発肝細胞癌に対する生体肝移植の役割と治療成績。第 8 回日本消化器外科学会大会 (DDW2010)、2010 年 10 月 13-16 日、横浜、シンポジウム
 3. **武富紹信**、武藤 純、本村貴志、戸島剛

- 男、武石一樹、伊地知秀樹、原田昇、内山秀昭、吉住朋晴、調 憲、前原喜彦：肝左葉グラフトを第一選択とする生体肝移植ドナー選択基準の意義。第46回日本移植学会総会、2010年10月20-22日、京都、ワークショップ
4. 武富紹信、武藤純、的野る美、本村貴志、間野洋平、戸島剛男、武石一樹、伊地知秀樹、原田昇、内山秀昭、吉住朋晴、調 憲、前原喜彦：再発肝細胞癌に対する生体肝移植の治療成績。第48回日本癌治療学会学術集会、2010年10月28-30日、京都、優秀演題講演
 5. 武富紹信、武藤純、的野る美、本村貴志、間野洋平、戸島剛男、武石一樹、伊地知秀樹、原田昇、内山秀昭、吉住朋晴、池田哲夫、調 憲、前原喜彦：胆道合併症ゼロを目指した生体肝移植ドナー肝切除の工夫。第72回日本臨床外科学会総会、2010年10月21-23日、横浜、主題関連口演
 6. 武富紹信、杉町圭史、武石一樹、戸島剛男、森田和豊、池上徹、山下洋市、祇園智信、副島雄二、前原喜彦：小型肝細胞癌に対する系統的肝切除の妥当性の検討。第34回日本外科系連合学会学術集会、2008年6月18-19日、東京、シンポジウム
 7. 武富紹信、調 憲、本村貴志、間野洋平、戸島剛男、武石一樹、森田和豊、萱島寛人、二宮瑞樹、内山秀昭、副島雄二、相島慎一、前原喜彦：肝細胞癌に対する肝切除後10年生存例の検討。第45回日本肝癌研究会、2009年7月3-4日、福岡、シンポジウム
 8. 武富紹信、福原崇介、戸島剛男、武石一樹、森田和豊、植田茂、井口友宏、實藤健作、永田茂行、杉町圭史、池上徹、祇園智信、副島雄二、前原喜彦：HCV遺伝子変異を指標とした肝移植後C型肝炎再発に対するIFN・リバビリン療法の効果予測。第27回日本肝移植研究会、2009年7月10-11日、三島、シンポジウム
 9. 武富紹信、森田和豊、梅田健二、永田茂行、杉町圭史、池上徹、祇園智信、副島雄二、調 憲、前原喜彦：Stage IV肝細胞癌に対する治療戦略決定のための予後予測システムの構築。第64回日本消化器外科学会、2009年7月16-18日、大阪、企画口演
 10. 武富紹信、副島雄二、前原喜彦：HCV遺伝子変異を指標とした肝移植後C型肝炎

再発に対するIFN・リバビリン療法の効果予測。第13回日本肝臓学会大会(JDDW2009)、2009年10月14-17日、京都、ワークショップ

11. 武富紹信、本村貴志、間野洋平、戸島剛男、武石一樹、森田和豊、梅田健二、萱島寛人、二宮瑞樹、内山秀昭、副島雄二、調 憲、前原喜彦：生体肝移植後の肝細胞癌再発に対する外科治療の意義。第47回日本癌治療学会総会、2009年10月22-24日、横浜、シンポジウム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武富 紹信 (TAKETOMI AKINOBU)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70363364

(2) 研究分担者

前原 喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：80165662
調 憲 (SHIRABE KEN)
九州大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：70264025
山下洋市 (YAMASHITA YOICHI)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：00404070
杉町圭史 (SUGIMACHI KEISHI)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：90452763

(3) 連携研究者

相島 慎一 (AISHIMA SHINICHI)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：