

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501293

研究課題名(和文)肝細胞癌悪性度バイオマーカー候補 E - FABP の発現、機能解析

研究課題名(英文)Clinical significance of Fatty Acid Binding Protein 5 in hepatocellular carcinoma

研究代表者

横尾 英樹 (Yokoo, Hideki)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70399947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌切除検体に対し免疫組織化学染色を施行、FABP5高発現をしている肝癌細胞株に対しRNAi法を用い増殖能、浸潤能の差を検討した。予後、再発の検討では5年でOSがFABP5-群で89.9%、FABP5+群で59.5%と2群間で有意差を認め( $p<0.0001$ )、肝癌細胞株においては、RNAi群がcontrol群と比較して増殖能、浸潤能の低下を認めた( $p<0.05$ )。肝細胞癌におけるFABP5の発現は予後、再発、腫瘍の悪性度に非常に強い相関性を示しており、肝細胞癌の新たなバイオマーカー、新しい治療のターゲット分子として強く期待される。

研究成果の概要(英文)： We analyzed the correlation between the expression of FABP5 and malignant behavior of HCC using HCC tissues and cell lines. A total of 243 HCC samples were subjected to immunohistochemistry, and protein expression of FABP5 in HCC cell lines was assessed by Western blot. The intensity of immunostaining in HCC tissues were divided into a strong staining group and a weak staining group. In the strong group, 5-year overall survival rate was 59.5%, compared with 89.9% in the weak group, and 5-year relapse free survival rate in the strong group was 23.7%, compared with 47.2% in the weak group. In vitro, Western blot showed protein expression of highly invasive cell lines was high, while lowly invasive cell was low. The knockdown of FABP5 in highly invasive cell lines also inhibited cell proliferation, migration and invasiveness significantly. FABP5 was closely related with malignancy, and also behaved as a significant prognostic and recurrence factor for HCC patients.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：肝細胞癌 バイオマーカー E-FABP

### 1. 研究開始当初の背景

我々は 2005 年に 9 種類の肝癌細胞株と 4 種類の primary culture の正常肝細胞株を用いたプロテオミクス解析 (蛍光 2 次元電気泳動法) により E-FABP が非癌部と比較して肝細胞癌に発現していることを世界で初めて報告した。(Fujii K, Kondo T, Yokoo H et al, proteomics, 2005)。E-FABP はこれまで膀胱 (Sinha P, Electrophoresis, 1999)、子宮内膜癌 (Li Z, Int J Cancer, 2008)、口腔扁平上皮癌 (Fang L, J oral and patho Medicine, 2010)、前立腺癌 (Morgan E, Int J Oncology, 2008) など報告されており、予後マーカーや腫瘍の増殖、浸潤に関与しているとされていた。E-FABP のメカニズムについては c-Myc や EpCAM の発現を増強させることや、ラット Rama37 モデル細胞を用いた E-FABP 遺伝子による転移誘導機構を研究した報告があり (Jing C, Cancer Res, 2001)、E-FABP 形質転換細胞、およびその転移性変異細胞では血管内皮増殖因子 (VEGF) 遺伝子発現が増加しており、VEGF タンパク質も分泌されていたとされる。また、E-FABP 形質転換細胞を移植することにより形成された腫瘍において強い VEGF 染色、及び毛細血管密度増加が認められている。

肝細胞癌は多血性の腫瘍であり、VEGF との関連が強く、すでに分子標的治療薬の multikinase inhibitor である sorafenib が臨床応用されており血管新生抑制、腫瘍増殖抑制の点からその有効性が実証されている。

一方、FABP family の中で H-FABP が心筋梗塞の血清マーカーとしてすでに臨床応用され ELISA キットも販売されていることから (DS ファーマバイオメディカル株式会社) E-FABP も肝細胞癌において血清マーカーとなる可能性がある。

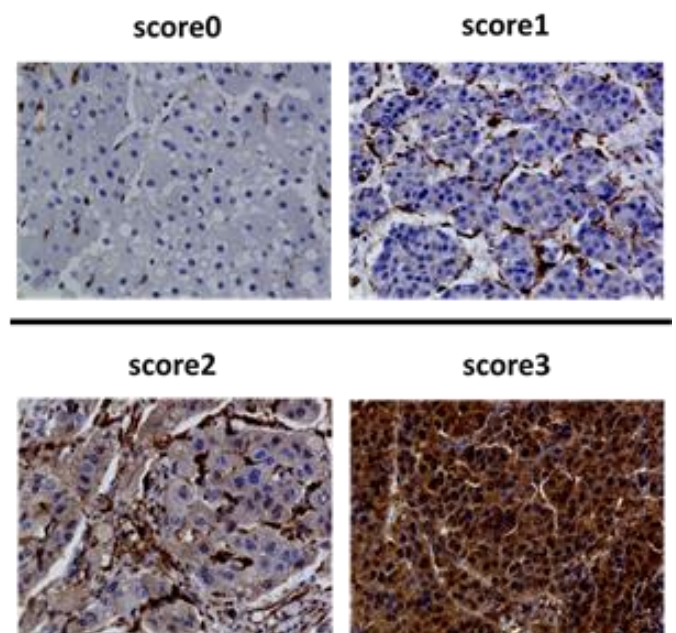
以上のことから、肝細胞癌に発現している E-FABP が腫瘍の増殖や脈管浸潤、ならびに引き続いて起こる経門脈性におこる肝内転移を助長させている可能性が強く、術前の血清マーカーの可能性、原発巣の免疫組織化学染色強度による悪性度マーカーになる可能性、将来的な治療のターゲットになり得ることが推察された。

### 2. 研究の目的

E-FABP は肝癌細胞株の種類間で発現のばらつきがあり、また他の癌種で悪性度との関連がある報告があることから新たな肝細胞癌の悪性度マーカーとなり得る可能性があり、悪性度との関係を分子レベルで解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 対象は 1997 年から 2006 年までの当科で施行した肝細胞癌初回肝切除例 243 例において抗 FABP5 抗体を用いて免疫組織化学染色を施行した。腫瘍細胞に対する染色強度の定義は、FABP5-:陽性染色なし/細胞質にわずかに染色を認めるもの、FABP5+:細胞質にびまん性に染色を認めるものとし、上記 2 群で予後、再発、病理学診断の比較を検討した。

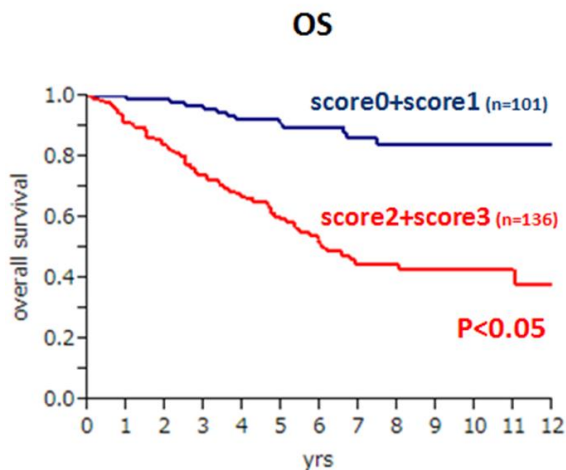


(2) 肝癌細胞株 (HLE, HLF, Li7, HepG2, Hep3B) における E-FABP 発現を western blotting で確認。

(3) E-FABP 高発現株に対し RNAi 法を用いて E-FABP の発現を抑制し増殖能、浸潤能、運動能の変化を観察する。また、分子レベルでの変化を RNA レベル、タンパクレベルで観察する。

#### 4. 研究成果

予後、再発の検討では5年でOSがFABP5-群で89.9%、FABP5+群で59.5%、RFSがFABP5-群で47.2%、FABP5+群で23.7%と2群間で有意差を認めた ( $p<0.0001$ )。



FABP5 発現と AFP, AFP-L3%, PIVKA-II、腫瘍径、肉眼的/顕微鏡的脈管侵襲、分化度と相関関係を認めた ( $p<0.05$ )。

Correlation between FABP5 and clinicopathological factors

	FABP5+	FABP5-	p		FABP5+	FABP5-	p
<b>AFP</b>	<20ng/ml	59	<0.05	<b>Macro vascular invasion</b>	positive	20	<0.05
	>=20ng/ml	71			negative	112	
<b>AFP-L3%</b>	<10%	77	<0.05	<b>Micro vascular invasion</b>	positive	32	<0.05
	>=10%	50			negative	100	
<b>PIVKA-II</b>	<40mAU/ml	45	<0.05	<b>Intrahepatic metastasis</b>	Positive	26	0.98
	>=40mAU/ml	82			Negative	106	
<b>Tumor size</b>	<3 cm	35	<0.05	<b>Differentiation</b>	well/mod	20	<0.05
	>=3 cm	96			por	112	
<b>Growth pattern</b>	ns	122	0.37	<b>Number of tumors</b>	St	97	0.12
	lg	10			Mt	23	

E-FABP 高発現肝癌細胞株は HLE、HLF、Li-7 であった。そこで HLE を用いて RNAi を行い E-FABP の発現を抑制し proliferation assay, invasion assay, migration assay を行った。

RNAi 群が control 群と比較して増殖能、浸潤能、運動能の低下を認めた ( $p<0.05$ )。

分子レベルでは EMT 関連分子である N-cadherin や vimentin が E-FABP の発現と関連することがわかった。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

1. 大畑多嘉宣、横尾英樹：肝細胞癌における FABP5 の新規バイオマーカーとしての有用性

第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014/4/3-5、京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都市)

2. Takanori Ohata, Hideki Yokoo : Utility of Fatty Acid Binding Protein 5 expression as a recurrence and prognostic factor in hepatocellular carcinoma

AASLD Liver Meeting 2013 , 2013/11/1-5, Walter E. Washington Conference Center ( WashingtonDC, USA)

3. Takanori Ohata, Hideki Yokoo : Utility of FABP5 expression as a recurrence and prognostic factor in hepatocellular carcinoma

第 72 回日本癌学会学術総会、2013/10/3-5、パシフィコ横浜 (横浜市)

4. 大畑多嘉宣、横尾英樹：肝細胞癌における予後再発因子としての FABP5 の有用性について

第 24 回消化器癌発生学会総会、2013/9/5-6、石川県立音楽堂・ホテル日航金沢 (金沢市)

5. 大畑多嘉宣、横尾英樹：肝細胞癌における予後再発因子としての FABP5 発現の意義

第 68 回日本消化器外科学会総会、2013/7/17-19、シーガイアコンベンションセンター (宮崎市)

6. 大畑多嘉宣、横尾英樹：肝細胞癌における予後再発因子としての FABP5 発現の検討

第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013/4/11-13、福岡国際会議場・福岡サンパレス・マリンメッセ福岡 (福岡市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

横尾 英樹 (YOKOO HIDEKI)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：70399947

(2)研究分担者

神山 俊哉 (KAMIYAMA TOSHIYA)  
北海道大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：80322816

中西 一彰 (NAKANISHI KAZUAKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講  
師  
研究者番号：80374338

柿坂 達彦 (KAKISAKA TATSUHIKO)  
北海道大学・北海道大学病院・医員  
研究者番号：40583092

(3)連携研究者

なし