

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860270

研究課題名(和文)肝細胞癌におけるGlypican-3の発現調節機構に関する臨床病理学的研究

研究課題名(英文)Clinicopathological study of hepatocellular carcinoma focusing on glypican-3

研究代表者

頼田 顕辞(YORITA, Kenji)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80599267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：グリピカン-3(以下GPC3)は各種の癌で発現が認められ、肝細胞癌(以下HCC)で高発現することが知られている。本研究ではHCCにおけるGPC3の意義について臨床病理学的に検討を行った。GPC3が細胞膜に発現するHCC症例は予後不良で、腫瘍の悪性度を高めるとされるM2型マクロファージの腫瘍内浸潤がより多く認められた。HCCの原発巣と転移巣におけるGPC3の発現は、約半数に違いがみられた。新たなELISA系を用いて測定した術前血清GPC3値が高いHCC症例ほど、予後不良であった。尚、研究の過程で、乳酸の輸送に関与するモノカルボン酸輸送体4がHCCにおける新たな予後不良因子であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Glypican-3 (GPC3) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell surface glycoprotein overexpressed in hepatocellular carcinoma (HCC). This study aims to research clinicopathological significance of GPC3 in HCC. Circumferential membranous GPC3 immunoreactivity in HCC that indicates poorer prognosis may be related to be increased intratumoral infiltration of CD204-positive macrophages. Immunohistochemical expression of GPC3 (GPC3 score with an emphasis on circumferential immunoreactivity) between primary tumor and metastasis of HCC is different in about half of the autopsy cases. Preoperative serum GPC3 containing N-terminal subunit that is measured by a new sandwich enzyme-linked immunosorbent assay method is an independent prognostic biomarker for HCC. Aberrant expression of MCT4 in HCC cells provides an independent poor prognostic factor in HCC patients.

研究分野：病理学

キーワード：グリピカン-3 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (以下HCC) は死亡率が依然として高い悪性腫瘍であり、肝内再発・転移により治療困難となる症例が多く、HCCの浸潤転移を含めた悪性形質のさらなる理解は重要と考える。当該研究者はHCCに高率に発現する膜糖蛋白質であるグリピカン-3 (Glypican-3、以下GPC3) に関して、抗腫瘍効果を発揮する抗GPC3抗体を用いてHCCの病理組織学的解析を行い、GPC3の細胞膜発現を示す症例は統計学的に有意に予後が悪い傾向を見出した (Liver Int. 2011 31:120-31.)。HCCにおけるGPC3発現の意義は十分に明らかにされていないのが現状であるが、当該研究者の検討過程から、腫瘍内のGPC3発現状態は多くは均一ではなく、転移先と原発巣でのGPC3の発現が一致しないなど、GPC3の腫瘍組織内での発現の不均一性が示唆された。また、GPC3を発現するHCCほど、マクロファージの腫瘍内集積が増加することがマウスの実験から示唆されていたが (Liver Int. 2009, 1056-64.)、ヒトでは検討されていなかった。さらに、細胞膜上に発現し様々な膜蛋白を修飾するセリンプロテアーゼである hepatocyte growth factor activator inhibitor type1 (以下HAI-1) がHCCの独立した予後不良因子であることを当該研究者の所属教室が中心となって明らかにしたが (World J Surg 2010 34: 1563-1571)、HCCにおいてHAI-1とGPC3の関連性について論じた報告は認められていない。

そのためHCCにおけるGPC3発現の不均一性に関して、またHCCにおけるGPC3の意義についてマクロファージやHAI-1を通じて病理組織学的に検討したいと考えた。さらに、当初の検討事項には入っていなかったが、HCC患者の術前・術後に採取された血清と健常者の血清を利用して、新たなELIZA系を用いて測定された血清GPC3値に関する臨床病理学的な解析を行った。

2. 研究の目的

(1) HCCにおけるGPC3の意義に関して、以下の3つを具体的な目的として挙げた。

腫瘍内に浸潤するマクロファージとHCCにおけるGPC3発現との関連

性について。

HCCにおけるHAI-1とGPC3の関連性について。

血清GPC3値を用いて臨床病理学的検討を行うこと。

(2) HCCにおけるGPC3の発現調節機構を臨床病理学的に検討すること。

尚、HCCの浸潤転移先の病変 (塞栓子や転移病変) におけるHAI-1の発現状態やその場に浸潤するマクロファージに関して検討する予定であったが、物理的・時間的に検討できなかった。

3. 研究の方法

(1) - 外科的に切除された225症例のHCC切除検体を用いて、病理組織学的に検討した。マクロファージを同定するマーカーとして、マクロファージを広く認識するCD68と、腫瘍の悪性形質を高めるとされるM2形質のマクロファージを認識するとされるCD204を用いた。

(1) - 外科的に切除された200症例のHCC切除検体を用いて、臨床病理学的に検討した。

(1) - 術前・術後の血清が利用できた115症例を用いて臨床病理学的に検討した。また血清GPC3値の測定に、今までに報告のない新たなELIZA系を用いた。

(2) HCCを有する44症例の剖検症例を用いて病理組織学的に検討した。これらは転移巣 (肺、リンパ節、副腎、腹膜播種、脾臓、骨髄、硬膜) を有しており、原発巣と転移巣との間で、GPC3発現に差異がないかを検討した。

尚、GPC3の免疫染色の評価に関しては、細胞膜全周性の陽性所見を重視したGPC3スコア (Liver Int. 2011 31:120-31.) を使用した。端的に説明すると、細胞膜全周性にGPC3が陽性となる腫瘍細胞が含まれる症例ほど、GPC3スコアは高い傾向となる。

4. 研究成果

(1) - CD204陽性マクロファージの腫瘍内浸潤が多い症例は、少ない症例ほど予後不良であった ($p=0.015$)。

また、GPC3 スコアと CD204 陽性マクロファージの腫瘍内浸潤数に関しては、両者に正の相関が認められた ($p=0.015$)。しかし、CD68 陽性マクロファージの腫瘍内浸潤と GPC3 スコアに有意な相関は見られず、CD68 陽性マクロファージの腫瘍内浸潤の多寡は予後に関係しなかった。この結果より、GPC3 が全周性に膜陽性となる腫瘍細胞を含む HCC 症例は、M2 形質の腫瘍内浸潤マクロファージを多く含む可能性がある。以上の結果は、以下の 5- に報告した。

尚、この報告を通じて、乳酸の細胞内外の輸送に関わるモノカルボン酸輸送体 4 が、肝細胞癌の約 2 割に陽性となることを見出し、モノカルボン酸輸送体 4 が HCC にとって独立した予後不良因子となることを新たに示した。

(1) - GPC3 と HAI-1 の関連性は、臨床病理学的に認められなかった。

(1) - HCC 患者の術前血清 GPC3 値は、健常者よりも有意に高く ($p<0.0001$)、60%の症例で異常高値を示した。また HCC 患者の術前血清 GPC3 値が高い症例ほど、術前の血清 -fetoprotein 値が高く、Child-Pugh Score が高く、C 型肝炎罹患者が多い傾向が見られた。術前の GPC3 値が高値な HCC 症例は、全生存期間、無病再発期間、いずれも短縮し、術前血清 GPC3 値が HCC にとって独立した予後不良因子となった。既知の ELIZA 系で測定された血清 GPC3 値が予後や血清 -fetoprotein と関連性が認められた報告はなく、本研究に用いた ELIZA 系が既知の ELIZA 系よりも優れている可能性がある。以上の結果は、以下の 5- に報告した。

(2) 52%($n=23$)症例において、原発巣と転移巣における GPC3 スコアに変化が見られたが、その変化に一定の傾向はなかった。また、ある転移臓器では転移巣の GPC3 スコアが上昇・低下するといった傾向は見出せなかった。

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 2 件)

Haruyama Y^{*}, Yorita K^{*}, Yamaguchi T, Kitajima S, Amano J, Ohtomo T, Ohno A, Kondo K,

Kataoka H. High preoperative levels of serum glypican-3 containing N-terminal subunit are associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *Int J Cancer in press.* ^{*}co-first author, 査読有

Ohno A^{*}, Yorita K^{*}, Haruyama Y, Kondo K, Kato A, Ohtomo T, Kawaguchi M, Marutuska K, Chijiwa K, Kataoka H. Aberrant expression of monocarboxylate transporter 4 in tumour cells predicts an unfavourable outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2014 ;34(6):942-52. ^{*}co-first author, 査読有

[学会発表](計 3 件)

大野 招伸, 頼田 顕辞, 春山 幸洋, 丸塚 浩助, 片岡 寛章: 肝細胞癌細胞における monocarboxylate transporter 4 (MCT-4) 発現は、肝癌患者の予後不良因子である。第 10 回 日本病理学会カンファレンス, 兵庫県神戸市 (2013.8.2-3)

Haruyama Y, Yorita K, Kondo K, Yamaguchi T, Kitajima S, Amano J, Ohtomo T, Kataoka H. High preoperative levels of serum N-terminal fragments of glypican-3 are associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *International liver cancer association 8th annual conference, Kyoto, Japan* (2014.9.5-07)

Haruyama Y, Yorita K, Ohtomo T, Kitajima S, Kataoka H. High levels of serum glypican-3 are associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma after hepatectomy. 第 73 回日本癌学術総会, 神奈川県横浜市 (2014.9.25-27)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
[http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/p
atho2/Presen2011.html](http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/p
atho2/Presen2011.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

頼田 顕辞 (YORITA, Kenji)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80599267

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

大野 昭伸 (Ohno, Akinobu)

宮崎大学医学部附属病院・病理部・
衛生検査技師長