

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293081

研究課題名(和文) 肝細胞癌の分子病理学的知見に基づくサブクラス分類の確立

研究課題名(英文) Establishing the molecular pathology-based subclassification of hepatocellular carcinoma.

研究代表者

坂元 亨宇 (SAKAMOTO, Michie)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40221270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：シグナル伝達系・表現型などの特徴を免疫組織学的に解析し、悪性度も反映する肝細胞癌の新たなサブクラス分類を確立した。幹細胞・胆管上皮マーカーを発現する症例群では治療標的の候補であるMAPK経路の活性化やグリピカン3の高発現と関連することが、WNTシグナル経路が活性化した症例群はMRI画像診断により検出可能であることが示された。今後、これらの臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：By analyzing cell signaling features and phenotype immunohistochemically, a new subclassification of hepatocellular carcinoma (HCC) that reflects the degree of malignancy was established. Activated MAPK signaling or overexpression of Glypican 3 as therapeutic target candidates were shown in biliary/stem cell marker-positive HCCs. The use of MRI to diagnose HCC with activated WNT signaling was also revealed. These findings are expected to be applied in the clinical practice.

研究分野：分子病理学、肝臓病理学、細胞生物学(浸潤・転移)

キーワード：病理学 肝細胞癌 シグナル伝達 サブクラス

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は臨床病理学的に多様性に富んでいるが、病理形態学的には腫瘍組織の構造異型により高分化型、中分化型、低分化型に分類され、手術材料の半数以上を中分化型が占める。多くの肝細胞癌は、慢性障害肝を背景として、異型結節、早期肝細胞癌から発生し、分化度を減じながら段階的に進展する。このような多段階発癌過程と関連するいくつかの分子異常が発見されているが、ドライバー変異については、他の癌に比べ、多くは明らかにされていない。近年、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析に基づく肝細胞癌のサブクラス分類が数多く報告され、それら分類の統合も試みられている。しかし、互いのサブクラスに重なりはもつものの、サブクラスを特徴づける発現パターンを示す遺伝子群に差異があり、リストされた分子の多くはその役割が明らかにされていないなど、癌における機能的な意義や臨床病理像との対応についてはさらなる研究が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでの肝細胞癌の発生・進展に関わる研究成果と分子病理学的知見を統合し、(1)WNT シグナル経路の活性化、(2)TGF- $\beta$  シグナル経路の活性化、(3)幹細胞・胆管上皮マーカーの発現に焦点を当てる。それらの機能的役割、関連して発現する分子を検討し、病理・病態への関与を明らかにする。さらに、それら分子の免疫組織染色プロファイリングと臨床病理学的所見を統合し、より実践的で有用な肝細胞癌のサブクラス分類を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) WNT シグナル経路の活性化  
肝細胞癌組織および細胞株における、WNT シグナル伝達因子や WNT 標的分子の発現や局在を調べることにより、WNT シグナル活性化の評価を行った。また、既知の WNT 標的分子である LGR5 の機能解析を行い、肝細胞癌におけるその役割を検討した。薬剤トランスポートのひとつである OATP8 が WNT 標的分子であることを示し、その発現と切除前の MRI 画像における信号値との関連を検討した。

(2) TGF- $\beta$  シグナル経路の活性化  
肝細胞癌組織および細胞株における、TGF- $\beta$  シグナル伝達分子や TGF- $\beta$  標的分子の発現や局在を調べることにより、TGF- $\beta$  シグナル活性化の評価を行った。肝細胞癌における TGF- $\beta$  シグナル活性化を反映する分子 (TGF- $\beta$  の直接的・間接的標的分子) を同定し、それらと悪性化機構との関連を検討した。

(3) 幹細胞・胆管上皮マーカーの発現  
肝細胞癌組織および細胞株における幹細胞・胆管上皮マーカーの発現を検討した。また、これらマーカーと関連するシグナル経路

の検討を行った。

### (4) 臨床的有用性の評価

肝細胞癌パネルでの免疫組織染色プロファイリングを行い、実践的なサブクラス分類に有用なマーカー分子を選定した。肝細胞癌の組織マイクロアレイや生検検体を用いて、選定したマーカーの有用性を検証した。

### 4. 研究成果

(1) 2003年から2010年の間の肝切除検体のうち肝細胞癌と診断された 162 結節(142 症例)を本研究の肝細胞癌パネルとし、その連続組織切片(ホルマリン固定パラフィン包埋切片)を作製した。この切片に対し免疫組織染色を行ったところ、KRT19 が 5.5%、SALL4 が 8.6%、EpCAM が 11.1%、CD133 が 0.6%、 $\beta$ -catenin が 11.1%、glutamine synthetase (GS) が 7.9%、p53 が 12.3% で陽性を示した。今回選定した抗体が全て陰性であったものは 53.7% であった。染色結果を二次元クラスター解析したものを図 1 に示す。これらの染色結果と臨床病理情報を対比したところ、KRT19/SALL4/EpCAM のいずれかが陽性となるグループ(17.3%)は、血清 AFP 値が高く、高頻度に門脈侵襲または肝内転移が見られ、早期再発率が高い傾向が認められた。 $\beta$ -catenin と GS のいずれかが陽性となるグループ(22.8%)は、悪性度の指標となる臨床病理学的因子との有意な相関が認められず、前述のグループと比較して悪性度は低いと考えられた。幹細胞・胆管上皮マーカーである KRT19/SALL4/EpCAM のいずれかが陽性となる 28 例の内 8 例で p53 が陽性であったが、WNT シグナル経路活性化と関連する  $\beta$ -catenin または GS が陽性となるのは 1 例のみであった。このことから、幹細胞・胆管上皮マーカー陽性症例群と WNT シグナル経路活性化症例群とはほとんど重なりがなく、独立したサブクラスとして認識されることが明らかとなった。

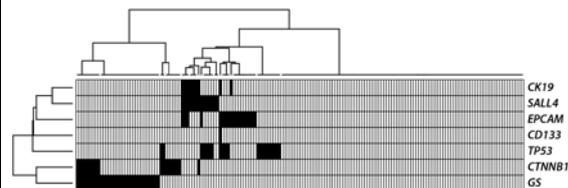


図 1. 免疫染色プロファイルのクラスター解析

各マスがひとつの症例を表し、黒が右に示すマーカー分子が陽性、白が陰性を示す。KRT19/SALL4/EpCAM のいずれかが陽性となる症例は、 $\beta$ -catenin/GS のいずれかが陽性となる症例とは異なるクラスターに分類された。

(2) TGF- $\beta$  処理した肝細胞癌細胞株において、上皮間葉転換(EMT)様の形態変化とともに、インテグリン  $\beta$ 4 (ITGB4) の発現が亢進することが明らかとなった(図 2)。また、肝細胞癌手術検体の免疫組織染色により、KRT19/SALL4/EpCAM のいずれかが陽性となるグループで、ITGB4 が陽性となる症例が有意に多いことが示された。このグループに含まれる症例は早

期再発率が高いことから、EMT が再発に関与している可能性が示唆された。

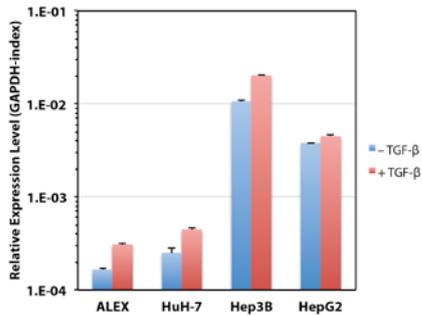


図 2. TGF-β による ITGB4 発現誘導

肝細胞癌細胞株 4 種を 5 ng/mL TGF-β1 で 48 時間処理し、Total RNA を抽出した。定量的 RT-PCR により ITGB4 遺伝子発現量を定量した。

(3) 薬剤トランスポーターのひとつである Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1B3 (OATP8)は、免疫組織染色の結果、一部の肝細胞癌で高発現していることが明らかとなったが、切除前の MRI 画像診断結果との相関解析から、EOB 増感剤を用いた MRI 画像における信号値と相関があることが明らかとなった(図 3)。また、肝細胞癌検体を用いた定量的 RT-PCR の結果から、OATP8 遺伝子の発現はいくつかの WNT 標的遺伝子の発現と相関していたことから、WNT シグナル経路が活性化している肝細胞癌グループで OATP8 が高発現していることが示唆された。これらの結果から、手術前の MRI 画像診断により WNT シグナル経路が活性化している肝細胞癌の症例を診断できる可能性が示された。

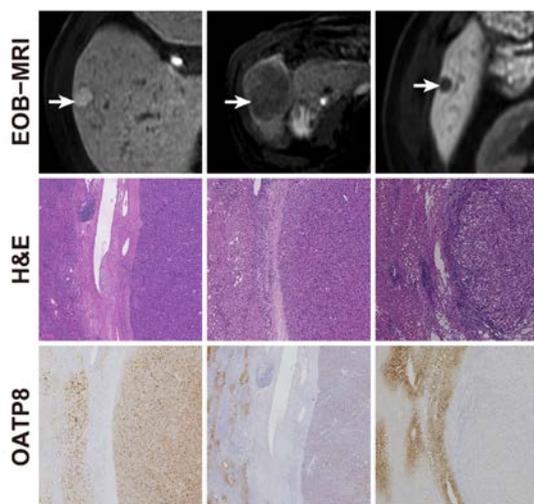


図 3. MRI 信号値と発現量が相関する OATP8

肝細胞癌 3 症例における MRI 画像(上)と、その切除検体の H&E 染色像(中)および OATP8 染色像(下)。MRI 信号値が高い結節(矢印、左から高、中、低信号)ほど OATP8 が高発現している。

(4) 肝細胞癌の薬剤治療に用いられるソラフェニブはマルチキナーゼ阻害剤であり、その標的である RAF は MAPK シグナル経路の活性化

を担っている。ERK は MAPK シグナル経路の一員であり、リン酸化を受けて活性化すると、核内に移行し、転写因子として機能する。肝細胞癌細胞株を HGF 存在下で培養すると、ERK のリン酸化促進および細胞増殖促進が示された。ソラフェニブに対する感受性は細胞株によって異なるが、ソラフェニブによる ERK リン酸化抑制と増殖抑制との関連が示された(図 4)。肝細胞癌手術検体における ERK の活性化状態を検討するため、癌細胞での ERK の核局在を免疫組織染色により検出した。癌細胞の核内で強陽性を示す症例を ERK 活性化症例とし、陰性および弱陽性を示す症例と比較したところ、ERK 活性化症例は、AFP 高値、低分化度、肝内転移、Ki-67 高値など悪性度と関連する因子との有意な相関を示した。さらに、幹細胞・胆管上皮マーカーである CK19 や SALL4 の発現とも有意な相関が見られた。このようなマーカー分子を発現する肝細胞癌では HGF の受容体である MET の活性化が報告されており、前述の結果と合わせると、HGF-MET-RAF-ERK を介するシグナル伝達経路の活性化によって細胞増殖が促進されていると考えられる。以上のことから、ERK が活性化された悪性度の高い肝細胞癌サブクラスが存在し、そのような症例はソラフェニブ治療が効果的な可能性が示唆された。

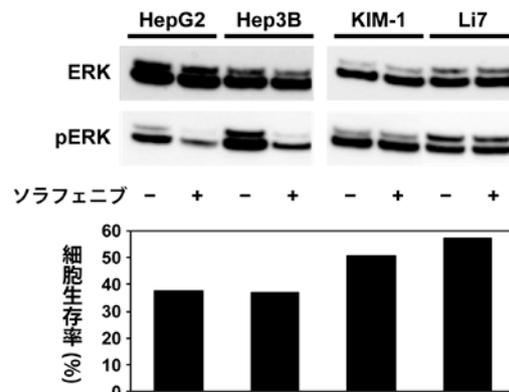


図 4. 肝細胞癌細胞株のソラフェニブによる ERK リン酸化阻害と増殖抑制

HepG2 および Hep3B 細胞は、ソラフェニブにより ERK リン酸化が抑制され、細胞増殖が大きく抑えられるのに対し、KIM-1 および Li7 細胞でのソラフェニブに対する感受性は低い。

(5) LGR5 発現プラスミドを導入した肝細胞癌培養細胞 KYN-2、および RNAi により LGR5 発現を抑制した肝細胞癌培養細胞 PLC/PRF/5 と HepG2 を用いたマイクロアレイ解析を行った。グリピカン 3 (GPC3)は、LGR5 を導入するとその発現が減少し、LGR5 を抑制すると亢進する遺伝子として同定されたが、肝細胞癌の免疫組織染色により、KRT19/SALL4/ EpCAM のいずれかが陽性となる肝細胞癌で高発現することが確認された。LGR5 導入 KYN-2 細胞を免疫不全マウスへ移植すると分化度の高い腫瘍を形成し、転

移能の低下が見られ、また GPC3 の発現が低下することが確認された(図 5)。肝細胞癌における LGR5 の発現は  $\beta$ -catenin 遺伝子変異と関連しており、WNT シグナル経路活性化の特徴を示す肝細胞癌グループに属すると考えられる。

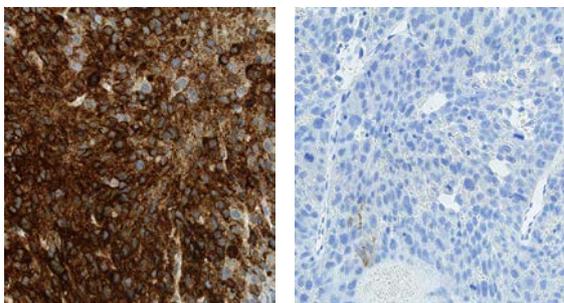


図 5. LGR5 導入によって発現が抑制される GPC3  
LGR5 導入 KYN-2 細胞を免疫不全マウスへ移植し形成させた腫瘍では、GPC3 の発現が低下することが示された。

#### 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 9 件)

- ① Tamaki N, Kuno A, Matsuda A, Tsujikawa H, Yamazaki K, Yasui Y, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Korenaga M, Mizokami M, Kurosaki M, Sakamoto M, Narimatsu H, Izumi N. Serum Wisteria Floribunda Agglutinin-Positive Sialylated Mucin 1 as a Marker of Progenitor/Biliary Features in Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep.* 7: 244, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-00357-8 査読有
- ② Sakamoto M, Tsujikawa H, Effendi K, Ojima H, Harada K, Zen Y, Kondo F, Nakano M, Kage M, Sumida Y, Hashimoto E, Yamada G, Okanoue T, Koike K. Pathological Findings of Nonalcoholic Steatohepatitis and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Pathol Int.* 67:1-7, 2017. doi: 10.1111/pin.12485 査読有
- ③ Yasui Y, Abe T, Kurosaki M, Higuchi M, Komiyama Y, Yoshida T, Hayashi T, Kuwabara K, Takaura K, Nakakuki N, Takada H, Tamaki N, Suzuki S, Nakanishi H, Tsuchiya K, Itakura J, Takahashi Y, Hashiguchi A, Sakamoto M, Izumi N. Elastin Fiber Accumulation in Liver Correlates with the Development of Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One.* 11:e0154558, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0154558 査読有
- ④ Kawaida M, Tsujikawa H, Sakamoto M.

Molecular pathology and malignancy of hepatocellular carcinoma. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 113:761-766, 2016. doi: 10.11405/nisshoshi.113.761 査読有

- ⑤ Ojima H, Masugi Y, Tsujikawa H, Emoto K, Fujii-Nishimura Y, Hatano M, Kawaida M, Itano O, Kitagawa Y, Sakamoto M. Early hepatocellular carcinoma with high-grade atypia in small vaguely nodular lesions. *Cancer Sci* 107:543-550, 2016. doi: 10.1111/cas.12893 査読有
- ⑥ Tsujikawa H, Masugi Y, Yamazaki K, Itano O, Kitagawa Y, Sakamoto M. Immunohistochemical molecular analysis indicates hepatocellular carcinoma subgroups that reflect tumor aggressiveness. *Hum Pathol* 50:24-33, 2016. doi: 10.1016/j.humpath.2015.10.014 査読有
- ⑦ Kurebayashi Y, Emoto K, Hayashi Y, Kamiyama I, Ohtsuka T, Asamura H, Sakamoto M. Comprehensive Immune Profiling of Lung Adenocarcinomas Reveals Four Immunotypes with Plasma Cell Subtype a Negative Indicator. *Cancer Immunol Res.* 4: 234-47, 2016. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0214 査読有
- ⑧ Masugi Y, Tanese K, Emoto K, Yamazaki K, Effendi K, Funakoshi T, Mori M, Sakamoto M. Overexpression of adenylate cyclase-associated protein 2 is a novel prognostic marker in malignant melanoma. *Pathol Int.* 65: 627-34, 2015. doi: 10.1111/pin.12351 査読有
- ⑨ Ueno A, Masugi Y, Yamazaki K, Komuta M, Effendi K, Tanami Y, Tsujikawa H, Tanimoto A, Okuda S, Itano O, Kitagawa Y, Kuribayashi S, Sakamoto M. OATP1B3 expression is strongly associated with Wnt/ $\beta$ -catenin signalling and represents the transporter of gadoxetic acid in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 61:1080-1087, 2014. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.008 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂元 亨宇 (SAKAMOTO, Michiie)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40221270

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

福間 真理子 (FUKUMA, Mariko)

山崎 剣 (YAMAZAKI, Ken)

エッフェンデイー・カトリーヌ  
(EFFENDI, Kathryn)