

**厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服政策研究事業）
分担研究報告書**

肝細胞癌における新規生物学的悪性度規定分子の検討

研究分担者 矢野 博久 久留米大学医学部 病理学 教授

研究要旨 【目的】肝細胞癌（HCC）の生物学的悪性度は治療や予後などと関連しており、その評価は重要である。近年、種々のがんにおいて、がん幹細胞が、がんの悪性度と関連しており、Side population（SP）細胞にがん幹細胞が豊富に含まれると報告されている。今回、2つのHCC細胞株において非SP細胞に比べSP細胞で共通に遺伝子発現が上昇していた分子のうち3つ（ANXA1, JAKMIP3, ELF3）に着目して肝癌の生物学的悪性度との関連性を検討した。【方法】2007年から2009年の間に当院で切除された腫瘍径5cm以下の100症例のHCC部と非腫瘍部におけるANXA1, JAKMIP3及びELF3の発現を免疫組織学的に検討した。また、それぞれの発現スコアとHCCの臨床病理学的因子との関連性の検討を行った。【成績】ANXA1, JAKMIP3, ELF3のそれぞれの発現スコアは低分化型HCC、門脈侵襲が高度なHCC、肝内転移を伴うHCCで有意に高値であった。これらの結果は、3つの発現スコアの合計の比較では、同等あるいはより顕著に認められた。3つの発現スコアの合計により100症例を低スコア群（<6）と高スコア群（>6）分けた場合、低スコア群は高スコア群に比べ有意に長い全生存期間を示した。【結語】ANXA1, JAKMIP3, ELF3は、生物学的悪性度が高く、予後不良なHCCで高発現しており、肝腫瘍生検組織のこれら3種類の分子の染色によりHCCの生物学的悪性度や予後などを推察できる可能性がある。

A．研究目的

肝細胞癌（HCC）の生物学的悪性度は治療や予後などと関連しており、その評価は重要である。以前、我々は、結節内結節像を示すHCCより樹立された高分化型HCC細胞株（HAK-1A）とその脱分化により生じた低分化型HCC細胞株（HAK-1B）のside population（SP）細胞を解析し、HAK-1BのSP細胞は非SP細胞に比べ生物学的悪性度が高いことを報告した（Nakayama M et al. J Gastroenterol Hepatol, 2014）。今回、HAK-1BとHAK-1A細胞のmicroarray解析において、非SP細胞に比べSP細胞において共通に遺伝子発現が上昇していた分子のう

ち、ANXA1（Annexin A1, lipocortin-1, calpactin II）、JAKMIP3（Janus kinase and microtubule interacting protein 3）（C10orf14 or NECC2（neuroendocrine long coiled-coil protein 2））、ELF3（E74-like factor 3）の3つに着目して肝癌の生物学的悪性度との関連性を検討した。

B．研究方法

2007年から2009年に久留米大学病院で切除された5cm以下の単発及び初回治療の肝癌患者100例を対象とし、ANXA1, JAKMIP3及びELF3の発現を免疫組織化学的に検討した。発現スコアは、発現強度を4段階にスコ

ア化 (0, Negative; 1, Weakly positive; 2, Moderately positive; 3, Strongly positive) し、発現領域も同様に4段階にスコア化 (0, 0%; 1, < 30%; 2, 30% <, <50%); 3, 50% <) し、2つのスコアの積を算出し求めた発現スコアと臨床所見や病理学的所見(組織分化度、門脈侵襲、肝内転移など)との関連性の検討を行った。さらに、発現スコアを低スコア群 (< 6) と高スコア群 (> 6) に分けて全生存期間の比較を行った。

C . 研究結果

ANXA1, JAKMIP3, ELF3のそれぞれの発現スコアは低分化型HCC、門脈侵襲が高度なHCC、肝内転移を伴うHCCで有意に高値であった。更に、3つの発現スコアの合計を分化度、門脈侵襲、肝内転移、肝癌の肉眼型において検討したところ、高分化、中分化、低分化型HCCの値は、それぞれ、3.0, 5.9, 9.7と有意に低分化型で高く、門脈侵襲なし、軽度、高度の値は、4.1, 6.3, 8.6と有意に門脈侵襲高度例で高く、肝内転移なし、ありの値は、5.7と8.4で肝内転移ありに有意に高値であった。また、肉眼型との関係の検討では、多結節癒合、単純結節周囲増殖型、単純結節型の値は、それぞれ、7.9, 7.6, 5.1と多結節癒合と単純結節周囲増殖型で有意に高値であった。更に、発現スコアを低スコア群 (< 6) と高スコア群 (> 6) に分けて全生存期間の比較を行ったところ、高発現群で有意に予後不良であった。

D . 考察

今回、2つの肝癌細胞株を用いて、がん幹細胞を豊富に含むSP分画の細胞を分離し、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現が共通して上昇している遺伝子を検索し、更にその生物学的意義に関して検討を行った。8つの遺伝子が同定され、その8つの遺伝子のうちANXA1, JAKMIP3とELF3の3つに着目

して更に免疫組織化学的に検討を行った。ANXA1は、38 kDaのカルシウム依存性リン脂質であるAnnexin familyの1つで、抗炎症作用と関連した蛋白である。JAKMIP3は、非レセプター型のチロシンキナーゼで、IL-2、IL-4のシグナル伝達経路に関与し、ATAT6, IRS1, IRS2及びPI3Kをリン酸化する。JAKのシグナル伝達や微小管細胞骨格の再構成の制御に関連している。ELF3は、ERBB2 シグナル伝達経路の重要な下流の作用因子で、転写活性化因子である。血管の炎症に関与するが、上皮細胞の脱分化や発癌にも重要な役割を果たしている。いずれの分子も、肝癌の分化度、門脈侵襲、肝内転移など肝癌の生物学的悪性度を大きく規定する因子との有意な関連性を認めた。肝腫瘍生検組織を用いて、これら3種類の分子を染色することによりHCCの生物学的悪性度や予後などを推察できる可能性が示唆されたことから、更に検討を続ける予定である。

E . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Ogasawara S, Akiba J, Nakayama M, Nakashima O, Torimura T and Yano H: Epithelial cell adhesion molecule-positive human hepatic neoplastic cells can develop combined hepatocellular-cholangiocarcinoma in mice. *J Gastroenterol Hepatol*, 30: 413-420, 2015.
- 2) Nomura Y, Kage M, Ogata T, Kondo R, Kinoshita H, Ohshima K and Yano H: Influence of splenectomy in patients with liver cirrhosis and hypersplenism. *Hepatol Res* 44: E100-109, 2014.
- 3) Nakayama M, Ogasawara S, Akiba J, Ueda K, Koura K, Todoroki K, Kinoshita H and Yano H: Side population cell fractions from hepatocellular carcinoma cell lines increased with tumor dedifferentiation,

but lack characteristic features of cancer stem cells. *J Gastroenterol Hepatol* 29: 1092-1101, 2014.

4) Kondo R, Nakashima O, Sata M, Imazeki F, Yokosuka O, Tanikawa K, Kage M and Yano H: Pathological characteristics of patients who develop hepatocellular carcinoma with negative results of both serous hepatitis B surface antigen and hepatitis C virus antibody. *Hepatol Res* 44: 1039-1046, 2014.

5) Kondo R, Kage M, Ogata T, Nakashima O, Akiba J, Nomura Y and Yano H: Therapeutic efficacy of splenectomy is attenuated by necroinflammation of the liver in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, in press, 2014.

6) Chung JE, Tan S, Gao SJ, Yongvongsoontorn N, Kim SH, Lee JH, Choi HS, Yano H, Zhuo L, Kurisawa M and Ying JY: Self-assembled micellar nanocomplexes comprising green tea catechin derivatives and protein drugs for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 9: 907-912, 2014.

7) 近藤礼一郎, 矢野博久, 鹿毛政義. 肝臓への血小板集積は肝硬変における脾摘の効果に關与するか. *消化器内科* 59(2): 194-200, 2014.

2. 学会発表

1) 野村頼子, 秋葉 純, 中島 収, 小笠原幸子, 鹿毛政義, 矢野博久. 肝細胞癌における新規生物学的悪性度規定分子の検討. 第50回日本肝臓学会総会. 東京 2014年5月29日.

2) Nomura Y, Ogasawara S, Akiba J, Kusano H, Nakayama M, Nakashima O, Yano H. Identification of new tissue biomarkers to predict biologic features of hepatocellular carcinoma. The 65th Annual Meeting of the American

Association for the Study of Liver Diseases. Boston, USA, November, 2014.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。