

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

Regulator of G-protein signaling 5は肝細胞癌の門脈侵襲を促進する

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）において門脈侵襲は予後を規定する重要な因子とされている。今回我々は、laser microdissection（LMD）法を用いてHCC非癌部、癌部、門脈侵襲部から選択的に細胞を採取し、cDNA microarrayによる網羅的な解析を行い、肝細胞癌において門脈侵襲と関連する分子の同定を試みた。【方法】3例のHCC凍結標本を対象に、LMDを用いて非癌部、癌部、門脈侵襲部から細胞を採取しRNAを抽出した。cDNA microarrayにより網羅的解析を行い、複数の症例で共通して発現の増減の見られたmoleculeを同定し、32例のHCCの癌部と非癌部の凍結組織を用いて quantitative RT-PCR（qRT-PCR）を、60例のホルマリン固定後パラフィン包埋組織を用いて免疫染色を施行し、臨床病理学的因子との関連を検討した。【成績】cDNA microarrayによる解析の結果、癌部より門脈侵襲部で発現の高い分子としてITGB3, SPP1, RGS5を、発現が低い分子としてMT1G, MT1Hを同定した。これらの分子のqRT-PCR解析では、RGS5は非癌部より癌部での発現が有意に増加しており、MT1G, MT1Hは非癌部より癌部での発現が有意に低下していたが、門脈侵襲を含む臨床病理学的因子との関連性は認めなかった。HCC組織におけるRGS5の発現を免疫染色で検討した結果、RGS5は60例中38例（63.3%）で癌部において高発現がみられ、門脈侵襲、肉眼型（単純結節周囲増殖型や多結節癒合型）と有意な関連性を認めた。【結語】RGS5は非癌部より癌部に多く発現しており、癌部での高発現は門脈侵襲と深く関連している可能性が示唆された。

A．研究目的

肝細胞癌（HCC）において門脈侵襲は進行癌では高頻度に認められ、予後を規定する重要な因子とされている。門脈侵襲の分子機構の解明は、分子標的治療に繋がり、患者の予後改善に寄与すると思われるが、未だ不明の点が多い。今回我々は、laser microdissection（LMD）法を用いてHCC非癌部、癌部、門脈侵襲部から選択的に細胞を採取し、cDNA microarrayによる網羅的な解析を行い、肝細胞癌において門脈侵襲と関連する分子の同定を試みた。

B．研究方法

3例の肝細胞癌凍結標本を対象に、LMDを用いて非癌部、癌部、門脈侵襲部から細胞を採取しRNAを抽出した。cDNA microarrayにより網羅的解析を行い、複数の症例で共通して癌部に比べ門脈侵襲部で発現が高いあるいは低い分子の同定を試みた。更に同定した分子に関して、32例の肝細胞癌の癌部と非癌部の凍結組織を用いて quantitative RT-PCR（qRT-PCR）を行い、各分子の発現を比較検討し、発現と臨床病理学的因子との関連性を検討した。また、60例のホルマリン

固定後パラフィン包埋組織を用いて、いくつかの分子に関しては免疫染色を施行し、癌部、非癌部、門脈侵襲部の発現を検討し、更に、臨床病理学的因子との関連性も検討した。

C . 研究結果

cDNA microarrayによる解析の結果、癌部より門脈侵襲部で発現の高いmoleculeとして integrin beta 3 (ITGB3) , secreted phosphoprotein 1 (SPP1) , regulator of G-protein signaling 5 (RGS5) を、発現が低い molecule として metallothionein 1G (MT1G) , metallothionein 1H (MT1H) を同定した。これらの分子についてqRT-PCRを施行した。RGS5は非癌部より癌部での発現が有意に増加していた。MT1G, MT1Hは非癌部より癌部での発現が有意に低下していた。ITGB3, SPP1の発現に有意差は認めなかった。これら5つのmoleculeいずれにおいても門脈侵襲を含むその他の臨床病理学的因子と癌部におけるRNAレベルでの発現に相関は見られなかった。

更にRGS5について免疫染色を施行した結果、60例中38例 (63.3%) で癌部において高発現がみられ、さらに癌部で高発現を示す症例に門脈侵襲が有意に高頻度にみられた。また肉眼型では単純結節型より単純結節周囲増殖型や多結節癒合型を呈する頻度が有意に高かった。また、発現が高い症例で肝内転移が多い傾向を認めた。腫瘍径、被膜形成、被膜浸潤、分化度と癌部におけるRGS5の発現に相関は認めなかった。多変量解析では、RGS5の発現は、PVIの独立した予後因子ではなかったが、肉眼形態については、独立した因子であった。RGS5は、他の因子とは独立して肉眼形態と関連しており、それは、RGS5が肉眼形態の決定に重要な役割を果たしており、それが、PVIに寄与していると考えられる。

D . 考察

RGS5は、RGSタンパク質familyのメンバーの一つで、RGSタンパク質は、ヘテロ三合体G-タンパク質にサブユニットのGTPaseを活性化するタンパク質として作用し、G-タンパク質のシグナル伝達を負に制御する。RGS5は、心臓、肺、骨格筋、小腸に豊富に発現していると報告されており、血管においては、周皮細胞や血管平滑筋細胞に発現していると報告されている。腫瘍におけるRGS5の発現は、血管内皮細胞とする報告が過去にいくつか報告されており、肝臓での研究では、Chenらは、ISHで、RGS5は非腫瘍性の肝組織の類洞内皮細胞にはRGS5は発現しておらず、mRNAは、HCC組織の類洞内皮細胞にみられたと報告している。しかしながら、我々の検討のように、癌細胞の細胞質に発現を認めたという報告も見られる。Wangらは、胃癌におけるRGS5の免疫染色を施行し、RGS5は癌細胞の細胞質に発現がみられたと報告している。また、Huangらは、非小細胞性肺癌における免疫染色で、癌細胞の細胞質または細胞膜にRGS5の発現がみられたと報告している。肝癌の細胞株でRGS5の発現報告もあり、我々も同様の結果を得ている。以上、LMDにより選択的に採取された組織を用いたcDNA microarrayによる網羅的な解析を行い門脈侵襲と関連すると分子としてRGS5を同定し、今後更にその機能などについて解析を行う予定である。

E . 研究発表

1 . 論文発表

1) 高嶋 智之, 飯島 尋子, 青木 智子, 中野 智景, 會澤 信弘, 岸野 恭平, 霜野 良弘, 長谷川 国大, 高田 亮, 楊 和典, 石井 昭生, 坂井 良行, 西村 貴士, 西川 浩樹, 岩田 恵典, 池田 直人, 榎本 平之, 廣田 誠一, 藤元 治朗, 矢野 博久, 中島 収, 鹿毛 政義, 西口 修平. 慢性肝炎における肝線維化マーカー

ELFスコアの有用性. 肝臓 56巻10号
Page543-545 (2015.10)

2) Umeno Y, Ogasawara S, Akiba J, Hattori S, Kusano H, Nakashima O, Koga H, Torimura T, Yamakawa R, Yano H. Regulator of G-protein signaling 5 enhances portal vein invasion in hepatocellular carcinoma. Oncology Reports (in press), 2016.

2. 学会発表

1) 梅野有美,小笠原幸子,秋葉純,草野弘宣,中島収,古賀浩徳,鳥村拓司,矢野博久. Regulator of G-protein signaling 5は肝細胞癌の門脈侵襲を促進する.第41回日本肝臓学会西部会.名古屋 2015年12月3, 4日.

2) Umeno U, Ogasawara S, Akiba J, Kusano H, Nakashima O, Koga H, Torimura T, Yano H. Regulator of G-protein signaling 5 enhances portal vein invasion in hepatocellular carcinoma. The 66th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, USA, November 13-17, 2015.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。