

論文内容の要旨

論文題目 新規癌関連因子 EBAG9/RCAS1 の肝細胞癌における発現
解析 -腫瘍の脱分化・増殖との関連-

指導教官 幕内雅敏教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 青木 琢

肝細胞癌(HCC)は、我が国における悪性腫瘍死亡の第3位を占める代表的な固形癌の一つである。従来、HCCは典型的な多段階進展を起こすことが知られており、早期肝細胞癌が脱分化、増殖能を獲得して古典的肝細胞癌へと進展していく過程が形態学的にも明瞭に捉えられる点で非常にユニークである。近年の研究によりその進展の各段階でどのような遺伝子群の発現の変化が生じているのかについても部分的に明らかにされてきているが、いまだ不明な点も多く残っている。

今回研究の対象とした ER-binding fragment-associated gene 9 (EBAG9)は、当初、エストロゲンの一次応答遺伝子として単離されたものである(Watanabe T, *et al.* 1998)。その後、EBAG9は、全く別の経路で発見された癌関連抗原 receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) と同一遺伝子であることが報告され(Nakashima M, *et al.* 1999)、RCAS1がTリンパ球やNK cellをアポトーシスに導く作用

を持つことが想定されたことから、癌の進展、転移に関わる因子として注目を集めるようになった(EBAG9/RCAS1)。EBAG9/RCAS1 は一部の正常臓器で発現が認められるほか、種々の癌組織で発現の増強が認められることが最近次々に報告されており、一部の癌種においては患者の予後因子となっているとの報告も見られる。しかしながら、EBAG9/RCAS1 はそのレセプターの存在や構造、免疫担当細胞への作用機序などが全く不明であり、正常組織での機能も明らかにされていない。

このような背景を踏まえ、本研究は、EBAG9/RCAS1 の HCC ならびに非癌肝組織での発現状況を明らかにし、HCC の多段階進展における位置づけを定めること、さらに EBAG9/RCAS1 の発現と臨床的因子の相関との検討から HCC 治療への活用の可能性を探ることを目的とした。

肝細胞癌での EBAG9/RCAS1 の発現状況の検討は、免疫組織染色およびウェスタンブロット法にて行った。東京大学医学部附属病院肝胆膵・人工臓器移植外科にて切除された HCC143 症例に加え、正常肝の針生検標本 10 例、C 型慢性肝炎症例の針生検標本 10 例を対象とし、共同研究者井上らが作成した抗 EBAG9 ポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。また、同じ症例に対して抗 Ki-67 モノクローナル抗体による免疫染色も施行し、腫瘍の増殖能の指標とした。さらに、一部の症例の凍結組織を用いてウェスタンブロット法を行い、蛋白発現量を免疫染色の結果と対比させた。その結果以下の所見が得られた。(1) 正常肝、慢性肝炎、肝硬変組織肝細胞はいずれも弱いながらも EBAG9 を発現しており、細胞質内に明らかな局在を示した。したがって、EBAG9 が非癌組織中で何らかの生理的作用を持つ可能性が示唆された。(2) HCC 腫瘍細胞には、EBAG9 の発現が非癌肝細胞と同等のものと、発現が増強しているものがあり、発現が増強している腫瘍細胞では発現の局在が崩れ、細胞膜、細胞質に発現が認められた。(3) 結節内での EBAG9 の発現が増強している細胞の局在を検討すると、分化度の異なる成分を含む結節ではより分化の悪い領域

で EBAG9 発現の増強が見られ、また腫瘍が被膜浸潤を起こしている部分で EBAG9 発現の増強している細胞が多く認められた。(4)腫瘍結節内で EBAG9 発現の有無(染色の濃さ)および発現が増強している細胞が占める比率に基づいて腫瘍を分類すると、EBAG9 陰性結節(EBAG9 の発現増強を細胞を認めない結節)または EBAG9 発現の弱い結節(境界域結節:比率に関係なく、薄くしか染色されない結節、または EBAG9 の発現増強が腫瘍細胞全体の 5%未満の結節)が 41%(59 症例)、EBAG9 陽性結節(EBAG9 の発現増強が腫瘍細胞全体の 5%以上の結節)が 59%(84 症例)であり、この分類と、ウェスタンブロットイングでの EBAG9 蛋白発現量とはよく相関した。

次いで、EBAG9 発現増強と臨床病理学的因子との相関を検討した。先ほどの EBAG9 陰性/境界域結節、EBAG9 陽性結節との間で、7 つの臨床的因子(年齢、性別、B 型肝炎ウイルス表面抗原、抗 C 型肝炎ウイルス抗体、Child-Turcotte-Pugh スコア、血清 alpha-fetoprotein 値、血漿 des- γ -carboxy prothrombin 値)および 6 つの病理学的因子(腫瘍の分化度、腫瘍サイズ、腫瘍数、脈管侵襲あるいは肝内転移、腫瘍被膜形成および被膜浸潤、背景肝組織)、さらに Ki-67 labeling index の計 14 因子との相関を検討した結果、EBAG9 発現増強との相関が認められたのは、腫瘍の分化度($P = 0.01$)および Ki-67 labeling index ($P < 0.001$)であり、脈管侵襲あるいは肝内転移とは相関しなかった($P = 0.86$)。また、対象症例の無再発生存を調査し、予後に寄与する因子を単変量解析にて検討したが、EBAG9 は有意な予後因子とはならなかった(リスク比 1.30、95%信頼区間 0.88-1.92)。

HCC の多段階進展のモデルでは、高分化型腫瘍が脱分化、増殖し、その上でさらに遺伝子変化を経て転移能を獲得すると考えられる。これらの各ステップで全く個別の遺伝子変化が必要となるかどうかは明らかではないが、今回の結果では、EBAG9/RCAS1 の発現増強は HCC 進展の中期のイベントすなわち脱分化と増殖に関与し、それ以降の転移能獲得には直接関与していない可能性が示された。この結

果は、EBAG9/RCAS1 発現増強が患者の無再発生存と有意な相関を示さなかったこととも合致した。従来、HCC の脱分化・増殖開始のメカニズムは良く知られていなかったが、治療開始の適応、タイミングを決定する上で極めて重要な現象であることから、今回明らかとなった EBAG9/RCAS1 の発現は、この脱分化・増殖開始という現象の有力なマーカーとなるとともに、今後治療の標的ともなる可能性があると思われた。また、EBAG9/RCAS1 の腫瘍における機能を検討することで、HCC 進展のメカニズムの一部が明らかになる可能性があると考えられた。さらに、正常肝組織中での EBAG9/RCAS1 の機能の解析も今後の重要な課題であると考えられた。