

論文の内容の要旨

論文題目

ヒト正常組織と腫瘍組織における Glypican3 の発現とその意義

指導教官 深山正久 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 菱沼 美千代

背景と目的

肝腫瘍を対象にした DNA マイクロアレイ解析により, 肝細胞癌, 肝芽腫で高率, 特異的に Glypican 3 (GPC3)の発現が上昇していることが見出された. Glypican はヘパラン硫酸プロテオグリカンに属する膜蛋白である. はじめに過成長症候群である Simpson-Golabi-Behmel 症候群(SGBS)において GPC3 遺伝子の mutation が報告され, SGBS では悪性腫瘍の発生が多いことから, 各種の腫瘍において GPC3 の異常が検討された. その結果, 肝細胞癌, 肝芽腫における GPC3 の発現亢進が見出された.

従来, 腫瘍マーカーと呼ばれる腫瘍特異的に発現する分子が知られている. 中でも癌胎児性蛋白は, 胎児期の組織では高発現しているが, 出生後に発現が消失またはごく低濃度となり, 組織の修復, 腫瘍の発生に伴って胎児期と同じ部位に再び発現する分子である. GPC3 は胎児肝および肝細胞癌

において発現し、正常肝に発現していないことから、肝臓における癌胎児性蛋白と考えられている。癌胎児性蛋白が胎児組織、癌組織で発現する機序、意義については明確ではなく、また癌胎児性蛋白であることを証明するためには詳細な蛋白発現に関する検討が必要である。

本研究においては、特に肝細胞癌の特異的なマーカーとして見出された GPC3 に関して、その発現の意義を探索するため、正常胎児および成人組織、各種の腫瘍組織を用いて、GPC3 の蛋白発現の系統的、網羅的検索を行った。高頻度に GPC3 が発現している腫瘍においては、他の癌胎児性蛋白 (Alpha-fetoprotein;AFP, Human chorionic gonadotropin-beta;HCG-beta)との比較も行った。

本研究の概要と結果のまとめ

1. Tissue microarray (TMA) の構築

多数例の免疫組織化学的検討を効率的に行うため、外科切除標本を用いた TMA の構築を行った。対象例 490 例のうち 481 例(98.2%)について検討できた。TMA1 枚に最大 24 症例を配置し、連続切片を用いることにより同一症例において複数の抗体を比較することも容易であった。

2. ヒト正常組織における GPC3 の発現

胎児、新生児および成人正常組織を用いて、GPC3 蛋白の発現を検討した。胎盤(100%)、胎児の肝臓(100%)および腎臓(妊娠初期、後期 100%、中期 85.7%)に GPC3 の強い発現を認めた。新生児では肝臓(100%)、腎臓(67%)に弱い発現があった。成人組織では検索した臓器に GPC3 の発現は認めなかった。

3. ヒト腫瘍組織における GPC3 の発現

3-1. 各種のヒト腫瘍組織における GPC3 の発現

各種の腫瘍(肝内胆管癌, 肝外胆管癌, 胆嚢癌, 膵臓癌, 膀胱癌, 卵巣癌, 子宮頸癌, 子宮体癌, 腎芽腫, 悪性黒色腫, 肝細胞癌, 肺癌, 食道癌, 胃癌, 大腸癌, 乳癌, 腎細胞癌, 前立腺癌, 脳膠芽腫, 髄膜腫, 胸腺腫, 骨肉腫)における GPC3 の発現を調べた. 腎芽腫(90%), 肝細胞癌(70.5%)において陽性率が高く, 強い染色性を示した. その他の腫瘍では卵巣癌(33.3%), 胆嚢癌(30%), 子宮頸癌(30%)等に陽性であった.

3-2. 肝臓の腫瘍および非腫瘍性病変における GPC3 の発現

肝細胞癌を含む肝臓の腫瘍性病変例, 良悪性境界病変例, 非腫瘍性病変例を検討した. また肝細胞癌のマーカーである AFP, Hepatocyte antigen (HEP)との比較を行った. GPC3 陽性率は, 腫瘍性病変では肝芽腫(100%), 肝細胞癌(83.9%), 境界病変では異形成性結節(50%), 非腫瘍性病変では限局性結節性過形成(33.3%), 劇症肝炎(11.1%)であった. 肝細胞癌と背景肝において検討すると, GPC3 と AFP は肝細胞癌を特異的に認識し, 良悪性診断マーカーとして有用と考えられたが, HEP は肝細胞癌, 背景肝ともに発現していた. 肝細胞癌において, GPC3 は AFP よりも陽性率が高く, 特に高分化, 中分化肝細胞癌における GPC3 陽性率は有意に高かった.

3-3. 腫瘍組織における GPC3 と AFP, HCG-beta の発現の比較

GPC3 の発現頻度が高い 10 種類の腫瘍について, 癌胎児性蛋白である AFP と HCG-beta との比較検討を行った. GPC3 と AFP の陽性率は, 肝芽腫では 100%, 66.7%, 肝細胞癌では 70.5%, 30.5%であった. GPC3 は AFP より

陽性率が高だけでなく、個々の陽性例においても AFP より強く広範囲に腫瘍細胞を認識した。HCG-beta が特異的に発現している腫瘍はなかった。

4. AFP 産生腫瘍における GPC3 の発現

代表的な AFP 産生腫瘍である Hepatoid 胃癌と精巣胚細胞腫瘍を用いて GPC3 の発現を調べた。

4-1. Hepatoid 胃癌

AFP の他、肝細胞癌マーカーである Protein induced by vitamin K antagonist or absence-2 (PIVKA-2), HEP を加えて検討した。GPC3, AFP は Hepatoid 胃癌 10 例全例で陽性であり、いずれも Hepatoid component に強く発現する傾向があった。陽性例の多くで、GPC3 は AFP より広範囲で強い染色性を示した。PIVKA-2, HEP 陽性例はそれぞれ 3 例, 5 例であったが Hepatoid component を認識する傾向はなかった。TMA の胃癌 118 例では、GPC3, AFP, PIVKA-2, HEP 陽性率はそれぞれ 3.4%, 0.8%, 5.1%, 22.0% であった。GPC3 陽性例のうち 1 例(0.8%)が Hepatoid 胃癌であった。この症例では AFP 陽性部は Hepatoid component に限局していたが、GPC3 は Non-hepatoid component も含めて、AFP よりも強く広範囲に腫瘍を認識した。

4-2. 精巣胚細胞腫瘍

胚細胞腫瘍のうち AFP 産生腫瘍である卵黄嚢腫瘍を中心に、HCG-beta, OCT3/4 を加えて各組織型について検討した。

GPC3 は、卵黄嚢腫瘍(100%)に高率に発現していた。その他の腫瘍における GPC3 陽性率は、合胞体性巨細胞(71%), 絨毛癌(33.3%), 奇形腫(20%)であった。AFP は卵黄嚢腫瘍(92%)の他、奇形腫(20%)にも発現して

いた. 混合型胚細胞腫瘍の卵黄嚢腫瘍 21 例における比較では, AFP は 2 例の陰性例があったが GPC3 は全例で陽性であった. また 9 例で GPC3 は AFP よりも広範囲に発現していた. HCG-beta は合胞体性巨細胞 (100%), 絨毛癌 (100%) に, OCT3/4 は精上皮腫 (100%), 精細管内胚細胞腫瘍/分類不能型 (97%), 胎児性癌 (95%) において陽性であった.

5. GPC3 が腫瘍増殖に与える影響

GPC3 が組織における成長, 増殖の調節あるいは腫瘍発生に関与する可能性が示唆されている. そこで GPC3 陽性細胞株 (肝細胞癌細胞株, AFP 産生胃癌細胞株, 胃癌細胞株) と GPC3 陰性細胞株 (胃癌細胞株) に short interfering RNA (siRNA) を導入して mRNA を抑制し, GPC3 蛋白の発現抑制が細胞増殖に与える影響をみた. MTT assay では, GPC3 陽性細胞株において, siRNA によって GPC3 蛋白発現を抑制した細胞では, 増殖率の低下がみられた. GPC3 陰性細胞株では, 細胞増殖率に変化を認めなかった.

6. 針生検組織による肝腫瘍, 境界病変の病理診断への応用

肝臓針生検検体を用いて高分化肝細胞癌, 異形成性結節と背景肝における GPC3 の発現を検索し, 臨床病理学的診断における抗 GPC3 抗体の有用性と血管内皮マーカー CD34 との相補的使用について検討した. 肝細胞癌 Ed2, Ed1, 異形成性結節, 背景肝における GPC3 陽性率はそれぞれ 55.6%, 26.7%, 14.3%, 14.0% であり, 肝細胞癌における陽性率は, 非癌組織 (異形成性結節, 背景肝) より有意に高かった ($p=0.00092$). CD34 陽性率は 63.0%, 26.7%, 0%, 0% であった. GPC3 に CD34 を相補的に使用すると, GPC3 単独で使用した場合と比較して, 感度が 55.6% から 69.0% に向上し, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率についても 86.0%, 80.6%, 76.8% と比較的良い結果が得られた.

考察

GPC3 は腫瘍組織では肝芽腫, 肝細胞癌, 腎芽腫に高頻度に発現し, 胎児期と同様の分布を示した. 成人の肝臓, 腎臓では発現しないことから, 肝臓と腎臓において GPC3 が癌胎児性蛋白としての性質を有することが示された. GPC3 は成長因子を介して細胞増殖に関わる可能性が指摘されており, 胎児および腫瘍組織内で細胞増殖を調節していると考えられる. また肝芽腫, 肝細胞癌, Hepatoid 胃癌, 精巣卵黄嚢腫瘍では, GPC3 は AFP よりも陽性率が高く, これらの腫瘍における腫瘍マーカーとして GPC3 の有用性が示唆された.

肝細胞癌, AFP 産生胃癌, 胃癌細胞株を用いた生物学的検討では, GPC3 陽性細胞株では, GPC3 蛋白の発現抑制により細胞増殖率の低下を認めた. GPC3 を発現している腫瘍において, GPC3 は細胞増殖を促進している可能性がある.

臨床病理診断への応用を目指した針生検組織における検討では, GPC3 陽性率は肝細胞癌において非癌組織よりも有意に高く, さらに GPC3 と CD34 の相補的使用により, 診断の感度を向上させうることが示された.

本研究で行った免疫組織学的検索, 特に系統的な TMA を用いた検討は, 腫瘍における蛋白発現の網羅的解析を行う上で非常に有用であり, 今後のポストゲノム研究を進める中で極めて重要な手法と考えられた.