

論文の内容の要旨

論文題目 肝がんにおけるグリピカン 3 (GPC3) 発現による tumor-associated macrophage (TAM) の動員ならびに TAM を介した腫瘍微小環境の調節

氏 名 高 居 宏 武

グリピカン 3 (GPC3) は、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) であるグリピカンファミリーの一員であり、その C 末端が糖化フォスファチジルイノシトールと共有結合することで細胞膜上に繫留されている。一方、GPC3 を含む HSPG は、そのコアタンパクやヘパラン硫酸糖鎖への結合を介して、ケモカインや細胞増殖因子など様々なサイトカインの調節に関わっていることが知られている。近年の研究から、GPC3 は肝がんにおいて高発現していることが明らかとなり、その機能に関する研究が進められているものの、いまだその全貌は明らかにされていない。そこで、本研究では、肝がんにおける GPC3 の機能に関する新たな知見を得ることを目的に、GPC3 非発現および発現肝細胞がん組織ならびに抗 GPC3 抗体 (GC33) を投与した GPC3 発現肝がん移植モデル腫瘍組織を病理組織学的に解析した。得られた結果は下記の通りである。

1. GPC3 免疫染色のための組織プロセッシング法の最適化

GPC3 の機能を解析する上で GPC3 細胞膜発現プロファイルは重要なパラメーターの一つと考えられたため、まず始めに、GPC3 抗原の細胞膜発現を免疫染色によりの確に捉えるための組織プロセッシング法を検討した。検討した方法のうち、PLP-AMeX 標本が最も良好な細胞膜発現を示し、免疫染色に対する反応性 (IR) を示すスコアはいずれも高値であった。ホルマリン固定時間の検討では、7 日間固定標本は、24 時間固定標本よりも GPC3 IR が劣っていた。また、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いた抗原賦活化法の検討では、検討した 3 法 (オートクレーブ、マイクロウェーブ及びプロテアーゼ処理) のうち、プロテアーゼ処理した標

本において、最も良好な IR が得られた。なお、PLP-AMeX 標本は、形態学的評価ならびに種々の免疫染色、酵素化学的染色、分子病理学的解析に適していることが示されている。以上から、病理組織学的手法を主軸に GPC3 の機能を解析する場合、多角的な解析が可能になる PLP-AMeX 標本を用いて行うことが最も妥当であると考えられた。一方、FFPE 標本を用いて GPC3 の機能を解析する場合には、ホルマリンによる長期間固定は避け、プロテアーゼ処理を第一選択とした抗原の賦活化が不可欠であると考えられた。

2. 抗ヒト GPC3 抗体 (GC33) の GPC3 発現肝がん移植モデル腫瘍組織における抗腫瘍効果

抗ヒト GPC3 抗体である GC33 (ADCC 活性を有する) を GPC3 発現肝がん移植モデルに投与し、腫瘍組織における病理組織学的変化の経時的推移を精査した。その結果、移植腫瘍細胞の変化として、細胞死、円形細胞 (RC) 及び多核細胞 (MNC) の増加、それ以外の細胞の変化として、小型の紡錘形 or 類円形細胞 {SSC; 大部分はマクロファージ (M ϕ)} ならびに好中球の増加が認められ、この変化は GC33 投与後 3~5 日にピークに達した。GC33 の抗腫瘍効果の機序を探るため、過去に GPC3 との関連が報告されている細胞増殖活性と ECM を評価した。前者については、増殖系マーカーを用いて検討をしたが、GC33 による腫瘍細胞の増殖活性への影響は認められなかった。後者については、GC33 投与群で ECM のリモデリング亢進を示唆する変化が観察されたが、同所見は SSC の浸潤増加が顕著な領域において強く認められる傾向があったことから、SSC (M ϕ) 浸潤に伴う二次的变化であると考えられた。次いで、GC33 投与による M ϕ の浸潤増加と GPC3 の機能修飾との関係について検討した。GC33 投与前に M ϕ の枯渇化処理をすると、GC33 の抗腫瘍効果が大幅に減弱、またはほぼ完全に消失したことから、M ϕ の浸潤増加は細胞死に対する二次的反応ではなく、抗腫瘍効果発現に対して中心的な役割を果たしていることが強く示唆された。一方、M ϕ による抗腫瘍メカニズムとしては、「ADCC」と「GPC3 の機能修飾」の 2 通りが想定された。マウス腹腔内 M ϕ を用いた *in vitro* ADCC アッセイでは、細胞傷害活性はほとんど確認されなかったことから、前者の可能性は考えにくく、後者の可能性が想定された。換言すれば、GPC3 と M ϕ との間に何らかの生物学的な関係があり、GC33 がそれに対して修飾を加えた可能性が考えられた。

3. ヒト肝細胞がんにおける GPC3 発現プロファイルとマクロファージ浸潤との関係

肝がんにおいて、GPC3 発現と M ϕ 浸潤との間の関係を検討するため、肝細胞がん患者由来の肝臓 (n = 30) を用いて行った。まず、各肝細胞がんサンプルを GPC3 発現パターンに基づき 3 群に分類した。すなわち、GPC3 陰性の標本を GPC3-, GPC3 陽性で全周性の細胞膜陽性を示す腫瘍細胞の割合が少ない (陽性細胞の 20% 未満) 標本を GPC3+/unclear (UC)、この割合が多い (同 20% 以上) 標本を GPC3+/clear (C) とした。次いで、組織孤在性及び汎 M ϕ (rM ϕ 及び pM ϕ) マーカーを用いた免疫染色を行い、上記の GPC3 発現パターンによる群間で陽性細胞数を比較した。肝細胞がんの 76.7% が GPC3+ であった。rM ϕ マーカー陽性細胞数は、肝細胞がん

組織の各群間で差はみられなかったのに対して、pM ϕ マーカー陽性細胞数は、GPC3+/C の肝細胞がん組織で GPC3-及び GPC3+/UC と比較して有意に増加していた。さらに、GPC3 非発現 (GPC3-)・発現 (GPC3+/C) 肝細胞がん移植モデル腫瘍組織間の比較では、後者で浸潤 M ϕ 数の有意な増加が観察された。以上の結果から、肝細胞がん組織の腫瘍細胞における GPC3 の細胞膜発現と同組織への M ϕ 動員との関連が考えられた。

4. GPC3 関連 M ϕ の phenotype とその動員に関する候補因子の同定

GPC3+/C パターンの肝細胞がん組織で浸潤増加がみられた M ϕ の phenotype (M1 or M2) と M ϕ の動員に関わる走化性因子を明らかにすることを目的として、GPC3 非発現 (SK-HEP-1: GPC3-) 及び発現 (SK03: GPC3+/C) 肝細胞がん移植モデル腫瘍組織を用いて、関連遺伝子発現プロファイルを比較した。SK-HEP-1 及び SK03 移植組織間における M1 ならびに M2 M ϕ 関連遺伝子発現プロファイルについて階層的クラスタリングを行ったところ、M2 M ϕ 関連遺伝子についてのみ、SK-HEP-1 と SK03 の2つの明確なクラスターに分かれた。また、これら M2 M ϕ 関連遺伝子の多くは、SK03 移植組織で有意に発現が上昇していた。さらに、SK03 移植組織中の M ϕ のほとんどは、M2 M ϕ 特異的マーカーに対して陽性であった。これらの結果から、SK03 移植組織に動員された M ϕ は M2 M ϕ であることが強く示唆された。腫瘍組織中の M2 M ϕ は、一般に tumor-associated macrophage (TAM) に分類され、腫瘍の進展や転移を促すとされている。また、SK03 移植組織では、血管・リンパ管新生や基質リモデリングが SK-HEP-1 移植組織と比較して亢進していたことから、同移植組織に動員された M2 M ϕ は TAM の機能を備えていると考えられた。一方、腫瘍細胞由来で M ϕ の動員に関わることが報告されている因子のうち、SK-HEP-1 と比較し SK03 移植組織で有意に発現が上昇していた遺伝子は、CCL5、CCL3 及び CSF1 であった。これら3つの因子が、SK03 移植組織における M ϕ の動員に関わっている可能性が考えられた。

以上、本研究により、肝がん組織の腫瘍細胞における GPC3 の細胞膜発現により、肝がん組織への M ϕ の動員が促されることが明らかになった。また、同 M ϕ は、腫瘍の進展や転移を促すことが知られている M2 タイプの TAM であり、GPC3 は、これら TAM の機能を介して、血管・リンパ管や ECM などの腫瘍微小環境を調節し、肝がんの進展や転移を促している可能性が示唆された。加えて、これらを動員するための走化性因子として、CCL5、CCL3 及び CSF1 が考えられた。