

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高居 宏武

本研究では、ヒトの肝がんで高発現しているグリピカン 3 (GPC3) の機能を主に病理組織学的手法を用いて解析した。

まず始めに、GPC3 の機能を解析する上で GPC3 の細胞膜発現プロファイルは重要なパラメータの一つと考えられたため、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。その結果、PLP-AMeX 標本が最も良好な細胞膜発現を示した。従って、GPC3 の機能を病理組織学的に解析する場合、多角的な解析が可能になる同標本を用いて行うことが最も妥当であると考えられた。

次に、抗ヒト GPC3 抗体である GC33 を GPC3 発現肝がん移植モデルに投与し、同モデル腫瘍組織を病理組織学的に解析した。その結果、腫瘍細胞の変化として、細胞死、円形細胞および多核細胞の増加、それ以外の細胞の変化として、マクロファージ (Mφ) ならびに好中球の増加が観察された。次いで、GC33 投与による Mφ 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 Mφ を枯渇化すると、そ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、Mφ 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と考えられた。一方、Mφ 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 Mφ 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 Mφ 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。

上記の結果を受け、肝がんにおいて、GPC3 の機能と Mφ 浸潤との間に生物学的な関係が認められるかどうかをしらべるための検討を肝細胞がん患者由来の肝臓を用いて行った。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 (GPC3 陰性: GPC3-, GPC3 陽性だが細胞膜発現は不明瞭: GPC3+/UC, GPC3 陽性で細胞膜発現明瞭: GPC3+/C) に分類した。次いで、汎 Mφ (pMφ) 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。その結果、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。また、ヒト肝細胞がんマウス皮下移植モデルを用いた検討でも同様の現象が再現された。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。

上記の M ϕ の phenotype (M1 or M2) を決定することは、肝がんにおける GPC3 発現と腫瘍の進展・転移との関係を明らかにする上で重要と考えられたことから、これについて検討した。加えて、M ϕ の動員に関わる走化性因子についても検討を行った。GPC3 非発現 (SK-HEP-1: GPC3-) および発現 (SK03: GPC3+/C) 肝細胞がん移植モデル腫瘍組織を用いて、遺伝子発現プロファイルを比較したところ、SK03 移植組織で M2 M ϕ 関連遺伝子の発現上昇がみられた。さらに、SK-HEP-1 移植組織と比べて SK03 移植組織で浸潤が増加していた M ϕ の大部分は 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。実際に、SK03 移植組織では、TAM の機能としての血管・リンパ管新生や基質リモデリングの亢進が観察された。一方、M ϕ の動員に関わることが報告されている因子のうち、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。

以上の成績から、肝がん腫瘍細胞における GPC3 の細胞膜発現により、肝がん組織への M2 タイプの TAM の動員が促されることが明らかになった。また、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。本研究の成果は、ヒト肝がんの病態発現機序を考える上での基礎的知見として極めて重要である。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位を授与するに値するものと認めた。