



Title	肝細胞癌におけるFatty acid binding protein 5(FABP5)発現による上皮間葉転換に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	大畑, 多嘉宣
Description	配架番号 : 2340
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12836号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67440
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takanori_Ohata_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 大畑 多嘉宣

学 位 論 文 題 名

肝細胞癌における Fatty acid binding protein 5 (FABP5) 発現による上皮間葉転換に関する研究

(Studies on epithelial-mesenchymal transition induced by expression of Fatty acid binding protein 5 (FABP5) for hepatocellular carcinoma)

【背景と目的】

肝がんは本邦の 2013 年の主要部位別がん年齢調整死亡率において悪性新生物全体で第 5 位であり、予後不良な悪性疾患のひとつである。肝細胞癌の再発形式には肝内転移再発と多中心性発生再発が存在するが、予後向上のためには外科的切除後におきる多中心性発癌再発の抑制、肝内転移の抑制のほか、転移巣形成後の腫瘍増殖を抑制させることも重要である。肝内転移再発の予測には AFP, AFP-L3, PIVKA II などが報告されているが十分ではない。我々は 2005 年にプロテオミクス解析により Fatty Acid Binding Protein 5 (以下 FABP5) が非癌部と比較して肝細胞癌に発現していることを世界で初めて報告した。

【対象と方法】

1. 免疫組織化学染色

1997 年 1 月から 2006 年 12 月までに当科で切除された肝細胞癌初回肝切除 243 例を対象に抗 FABP5 抗体を使用して酵素抗体法による免疫組織化学染色を行った。染色性の評価は 2 人の病理医により実施された。

2. 細胞培養

ヒト肝癌細胞株である HLE, JHH5, HuH-7, HepG2, Li-7, Hep3B を使用した。すべての細胞株は CO₂ インキュベーターにて 37℃、5 % CO₂ 下で培養した。

3. FABP5 遺伝子過剰発現株と抑制株の作成

本実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って実施した。HepG2 に対し、レンチウイルスベクターの過剰発現ベクターを導入し FABP5 過剰発現株を作製した。一方 Li-7 に対して連とウイルスベクターの shRNA ベクターを導入し FABP5 発現抑制株を作製した。

4. 細胞浸潤・遊走能アッセイ

浸潤能アッセイ、遊走能アッセイにそれぞれ 24 ウェルの Matrigel invasion chambers および polyester membrane inserts を使用し細胞株を 48 時間培養、upper chamber に残存した細胞を除去、メンブレン上の細胞数を計測した。

5. 細胞増殖能アッセイ

96 ウェルの culture plate に撒いた細胞株を培養、4 日毎に MTS kit を用いて 490nm の吸光度を測定した。

6. マウス xenograft model の確立

BALB/cSlc-nu/nu マウスを用い、50 μ l の PBS に懸濁した 1×10^6 個の肝癌細胞株を 50 μ l Matrigel と混合しマウスの肩甲下に皮下注した。腫瘍径を 20 日間以上の期間で 4 日毎に計測した。次に遠隔転移モデルを以下の手順で作製した。肝内転移モデル：ヌードマウスを全身麻酔下で開腹、門脈左枝を仮結紮し、50 μ l の phosphate buffered saline に懸濁した 1×10^6 個の肝癌細胞株を選択的に門脈右枝に注射した。門脈注射後仮結紮糸を解き閉

腹、6-7 週間後にマウスを sacrifice し、肝表面の肝転移巣数を計測した。肺転移モデル：ヌードマウスの尾静脈に 50 μ l の phosphate buffered saline に懸濁した 1×10^6 個の肝癌細胞株を注射し、尾静脈注射8週後にマウスを sacrifice し肺転移巣の有無を確認した。

7. PCR Array 法

FABP5 の悪性度にかかわる遺伝子発現プロファイリングを解析するために Human Cancer Pathway Finder RT2 Profiler PCR Array を用いた。Fold-change が 1.5 以上の遺伝子を有意差ありとした。

8. Western Blot 法

各培養細胞から細胞質タンパク質・膜タンパク質・水溶性核タンパク質および細胞骨格タンパク質を抽出した後、EMT 関連分子 (E-cadherin, N-cadherin, Snail) と FABP5 に対する 1 次抗体を使用し Western Blot 法を行った。

【結果】

1. 免疫組織化学染色

全 243 例中 139 例 (57.2%) に FABP5 発現陽性を認めた。FABP5 陽性群は臨床病理学的因子との相関にて、顕微鏡的脈管侵襲 ($P=0.0001$)、腫瘍分化度 ($P=0.0337$)、腫瘍径 ($P=0.0001$)、血清 AFP 値 ($P=0.0022$)、血清 PIVKA-II 値 ($P=0.0025$) と相関を示した。予後・再発の検討では FABP5 陽性群は FABP5 陰性群と比較して予後 (5 年 Overall Survival (OS): 60.6% vs. 90.5%; $P < 0.0001$)、再発 (5 年 Disease-free Survival (DFS): 24.2% vs. 47.9%; $P < 0.0001$) いずれにおいても予後不良であった。単変量・多変量解析において FABP5 は独立した予後不良因子であり最も強力な再発因子でもあった。

2. In vitro アッセイ

浸潤能、遊走能、増殖能アッセイいずれにおいても FABP5 発現抑制により Li-7 の悪性度が優位に低下する ($P < 0.05$) のに対し、FABP5 発現により HepG2 の悪性度が優位に亢進する ($P < 0.05$) ことが確認された。

3. In vivo アッセイ

マウス皮下注モデルでは FABP5 高発現株による腫瘍が FABP5 低発現株による腫瘍よりも優位に体積が大きいたことが確認された ($P < 0.05$)。マウス肝転移モデルにおいて FABP5 低発現群では肝表面に明らかな結節を視認できなかったが、FABP5 高発現群では肝表面の結節を視認できた。マウス肺転移モデルにおいて、FABP5 低発現群、FABP5 高発現群双方において肺結節は視認できなかったが、顕微鏡下において FABP5 高発現群で肺転移を形成していることが確認された。

4. 網羅的分子生物学的解析

PCR-array において FABP5 高発現群で Snail の発現が亢進していることを確認した。Western Blot 法にて FABP5 発現抑制にて E-cadherin, ZO-1 の発現が亢進し、N-cadherin, Snail 発現と β -catenin の核内移行が抑制されることが確認された。一方 FABP5 発現亢進により逆の現象を引き起こすことも確認した

【考察】

今回の検討で FABP5 が非癌部よりも癌部に強く発現していること、臨床病理学的に腫瘍径、脈管浸潤、分化度などと相関しており、FABP5 の発現が高いほど予後不良であり再発率も高いことを確認し、in vitro における FABP5 と細胞浸潤、遊走、増殖との相関、in vivo における腫瘍形成、転移巣形成との相関関係を証明した。また今回初めて FABP5 が上皮間葉転換を介して腫瘍形成や転移を引き起こす可能性を示した。

【結論】

FABP5 が新たな肝細胞癌の悪性度バイオマーカーおよび分子治療ターゲットとして臨床応用されることが強く期待できると考えられた。