



Title	Wnt5aの発現と肝細胞癌の生物学的悪性度および切除例における予後の検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	脇坂, 和貴
Description	配架番号 : 2569
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14103号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78117
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuki_Wakizaka_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 脇坂 和貴

学 位 論 文 題 名

Wnt5a の発現と肝細胞癌の生物学的悪性度および切除例における予後の検討

(Studies on Wnt5a expression and biological malignancy of hepatocellular carcinoma)

【背景と目的】肝細胞癌の治療として肝切除は最も有効な治療の一つであるが、治癒切除が得られたとしてもその再発率は高いことが知られている。肝細胞癌の予後を向上させるためには、その発癌や癌の進展のメカニズムを解明し、治療のターゲットとなる分子を同定することが必要である。肝細胞癌においては Wnt シグナル伝達経路の異常が発癌に関わるとされている。Wnt シグナル伝達経路には β カテニン依存性経路と β カテニン非依存性経路があり、 β カテニン依存性経路の異常と発癌の関連については知られているが、Wnt5a が主なりガンドである β カテニン非依存性経路と発癌や癌の進展との関連については明らかにされていない。本研究では肝細胞癌における Wnt5a と癌の進展のメカニズムについて検討した。

【対象と方法】当科で肝切除を行った 243 例を対象に、腫瘍組織標本の Wnt5a とその受容体である ROR2 の免疫染色を行い、それらの発現と臨床病理学的因子、予後との関連、再発について検討した。また、肝癌細胞株を用いた検討では HLE、HLF、HepG2、Huh7 における Wnt5a と ROR2 の発現をウエスタンブロット法にて検討した。Wnt5a 低発現であった HLF に対して発現ベクターを用いた Wnt5a の強制発現株を作成し、Wnt5a 高発現であった Huh7 に対して shRNA を用いた Wnt5a の発現抑制株を作成した。それらの細胞株を用いて細胞増殖アッセイ、細胞浸潤アッセイを行い、それぞれ増殖能、浸潤能の変化を検討した。また、Wnt5a の強制発現株もしくは発現抑制株の E カドヘリン、ZO-1、N カドヘリン、Vimentin のタンパク発現の変化をウエスタンブロット法にて検討し、上皮間葉転換 (EMT) 関連分子の関与について検討した。HLF においては mRNA マイクロアレイ解析により、EMT 関連転写因子やマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の変化についても検討した。さらに治療実験としてリコンビナント Wnt5a タンパク (rWnt5a) 添加による肝癌細胞株の増殖能と浸潤能の変化について検討した。

【結果】Wnt5a の細胞膜発現に関しては、Wnt5a 細胞膜陽性が 180 例 (74.1%)、陰性が 63 例 (25.9%) であった。Wnt5a 細胞膜陰性は低分化、脈管侵襲陽性と相関を認めた。予後について、Wnt5a 陰性は陽性と比較して有意に全生存が不良であったが ($P=0.018$)、無再発生存については有意差を認めなかった ($P=0.089$)。予後因子の検討の結果、単変量解析にて AFP 値、PIVKAII 値、腫瘍個数、腫瘍径、脈管侵襲、肝硬変、Wnt5a 細胞膜陰性が全生存における有意な因子として挙げられ、多変量解析の結果、Wnt5a 細胞膜陰性 (HR: 1.895, 95% CI: 1.053-3.409, $P=0.033$) が独立した予後不良因子であった。243 例中 171 例に再発を認め、これらの症例に関して Wnt5a の膜発現陽性群、陰性群で比較を行った。Wnt5a 細胞膜陰性が 133 例、陽性が 38 例で、再発形式と再発

に対する治療については両群で有意差は認めなかったが、再発後の全生存に関しても Wnt5a 細胞膜陰性群が有意に予後不良であった ($P=0.026$)。

Wnt5a の受容体である ROR2 の発現は Wnt5a の細胞質発現と相関を認め ($P<0.001$)、AFP 値 ($P=0.006$)、分化度 ($P=0.015$) と相関があったが、ROR2 の発現により予後に差は認めなかった ($P=0.726$)。

細胞株を用いた検討では、ウェスタンブロット法により高分化の細胞株である Huh7 で Wnt5a が高発現であり、低分化の細胞株である HLF で Wnt5a が低発現であった。Huh7 において Wnt5a のノックダウンにより増殖能、浸潤能の増加が認められ、HLF において Wnt5a の強制発現により浸潤能の低下が認められた。EMT 関連分子の変化は、Huh7 の Wnt5a 発現抑制により E カドヘリンが低下した。また、HLF の Wnt5a 強制発現により Vimentin が低下した。mRNA マイクロアレイ解析により HLF において Wnt5a の強制発現により EMT 関連転写因子である SNAI2、SNAI3 の発現が低下し、MMP2 と MMP9 の低下が認められた。治療実験においては rWnt5a タンパク添加により HLF に変化は認められなかったが、Huh7 の増殖能、浸潤能は抑制された。

【考察】臨床検体の免疫染色において細胞膜の染色性が細胞質よりも予後因子としてより有意であり、これは β カテニン非依存性経路がより活性化されている状態ではないかと推察された。Wnt5a の受容体である ROR2 の発現に関しては Wnt5a の細胞質発現と相関を認めたものの予後因子としては有意なものではなく、肝細胞癌においては他の Wnt シグナル伝達経路の受容体が関わっている可能性が考えられた。予後の検討において、全生存では Wnt5a 細胞膜陰性が有意に予後不良であったが、無再発生存では有意差を認めず、この理由を検討するために再発について検討を行ったが、再発形式や再発後の治療について両群で差はなかった。肝細胞癌の再発形式として癌細胞の播種による肝内転移の他、多中心性再発が多いと報告されているため、初発の癌の悪性度に関わらず再発の頻度は高いと考えられ、これにより両群の無再発生存の差が打ち消されたのではないかと考えた。以上の臨床検体を用いた検討から、Wnt5a が腫瘍抑制因子である可能性が考えられ、細胞株を用いてその機序について検討を行った。各細胞株の Wnt5a の発現は高分化の細胞株で高い傾向にあり、これは臨床検体を用いた検討と一致する結果と考えられた。Wnt5a の強制発現、発現抑制による増殖能、浸潤能の変化は Wnt5a が腫瘍に対して抑制的に作用していることを示唆する結果であった。また、それに伴った EMT 関連分子、EMT 関連転写因子、MMP の変化は、Wnt5a の悪性度の変化にこれらの機序が関連していることが示唆された。rWnt5a による治療実験の結果は Huh7 に対しては腫瘍を抑制したが、HLF においては抑制効果を認めず、添加する rWnt5a の濃度等を含めてさらに検討が必要であると考えられた。以上より Wnt5a は EMT の抑制を介して腫瘍の浸潤能を抑制する腫瘍抑制因子であることが示唆された。また、rWnt5a タンパクによる β カテニン非依存性経路への介入が肝細胞癌の治療に有用である可能性が示唆された。

【結論】Wnt5a 発現は肝細胞癌の独立した予後因子であり、バイオマーカーとしての有用である可能性が示唆された。Wnt5a は肝細胞癌において EMT の抑制を介して腫瘍の浸潤能を抑制させる腫瘍抑制因子であることが示唆され、Wnt5a の腫瘍抑制作用に着目した肝細胞癌治療につながることを期待される。