



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	脇坂, 和貴
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2569 他
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/2115/78119
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuki_Wakizaka_summary.pdf



学 位 論 文

(要 約)

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)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

脇 坂 和 貴

学 位 論 文

(要 約)

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)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

脇 坂 和 貴

【緒言】

肝細胞癌の罹患者数は全世界で全癌種中第 5 位である。肝切除は肝細胞癌に対する最も有効な治療法の一つであるが、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。

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、前者の異常な活性化が β カテニンの異常集積とその核内移行を介して発癌に関与することが知られている。一方で、 β カテニンが関与しない後者と発癌、癌の進展との関連は明らかにされていない。Wnt シグナル伝達経路のリガンドは Wnt タンパクファミリーであり、哺乳類において 19 種類同定されている。Wnt タンパクは細胞外分泌タンパクであり、細胞から分泌された Wnt タンパクは自己分泌もしくは傍分泌の形式でその細胞膜受容体に結合し、Wnt シグナル伝達経路が活性化される。 β カテニン非依存性経路においては、Wnt5a が重要なリガンドであると考えられている。また、 β カテニン非依存性経路は平面内極性 (planar cell polarity: PCP) 経路と Ca^{2+} 経路の二つの経路があり、細胞の増殖や分化、遊走、接着、極性を制御していると考えられている。Wnt タンパクの受容体としては Frizzled family receptors (Frz)、receptor tyrosine kinase-like orphan receptor family (ROR)、low-density lipoprotein receptor-related protein co-receptors (LRP)、receptor tyrosine kinase (Ryk) が知られており、特に Wnt5a に関しては ROR2 との特異性が報告されている。近年、これらの β カテニン非依存性経路に関わる分子の異常と癌の関連が報告されているが、その作用は癌種により異なっている。すなわち、甲状腺癌や大腸癌、乳癌に関しては Wnt5a が腫瘍に抑制的に働くが、悪性黒色腫や非小細胞肺癌、胃癌、前立腺癌では腫瘍に促進的に働くと報告されている。しかし、肝細胞癌における Wnt5a の作用については知られていない。

一方で、癌の浸潤や転移の機序として上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) が知られており、これは上皮細胞がその特徴を失って、間葉系細胞の特徴を得ることで細胞の遊走が可能となり、浸潤や転移を来すことである。腫瘍細胞は様々な因子によって EMT が生じることが報告されているが、肝細胞癌における Wnt5a と EMT の関連については知られていない。本研究では肝細胞癌における Wnt5a の発現の意義および EMT との関連、さらに Wnt5a に着目した肝細胞癌の治療について検討を行った。

【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】

はじめに、Wnt5a の細胞質発現と臨床病理学的因子の相関について検討を行った。Wnt5a 細胞質陰性は AFP 高値 ($P=0.009$)、低分化 ($P<0.001$)、多発腫瘍 ($P=0.023$)、脈管侵襲陽性 ($P=0.025$) と有意に相関が認められた。全生存に関しては Wnt5a 細胞質陰性は Wnt5a 陽性と比較して有意に予後不良であった ($P=0.018$)。無再発生存に関しては両群で有意差は認めなかった ($P=0.061$)。全生存についての予後因子の検討では、単変量解析にて AFP 高値 ($P=0.018$)、PIVKAII 高値 ($P=0.049$)、多発腫瘍 ($P=0.013$)、腫瘍径 5cm 以上 ($P=0.001$)、脈管侵襲陽性 ($P<0.001$)、肝硬変 ($P=0.012$)、Wnt5a 細胞質陰性 ($P=0.019$) が有意な予後不良因子として挙げられた。これらの因子の多変量解析の結果、多発腫瘍 (Hazard ratio (HR): 2.133, 95% Confidence interval (CI): 1.289-3.532, $P=0.003$)、腫瘍径 5 cm 以上 (HR: 1.818, 95% CI: 1.115-2.965, $P=0.017$)、脈管侵襲陽性 (HR: 2.501, 95% CI: 1.478-4.232, $P=0.001$)、肝硬変 (HR: 1.655, 95% CI: 1.062-2.579, $P=0.026$) が独立した予後不良因子であった。Wnt5a 細胞質陰性は HR: 1.506, 95% CI: 0.944-2.385, $P=0.086$ であり、多変量解析では有意な因子とはならなかった。

次に Wnt5a の細胞膜発現と臨床病理学的因子との相関を検討したところ、Wnt5a 細胞膜陰性は HCV 陽性 ($P=0.011$)、低分化 ($P=0.001$)、脈管侵襲陽性 ($P=0.046$) と有意に相関を認めた。全生存に関しては Wnt5a 細胞膜陰性は膜陽性と比較して優位に予後不良であった ($P=0.018$)。無再発生存に関しては Wnt5a 細胞膜陰性が膜陽性と比較して不良である傾向にあったが、統計学的有意差は

認めなかった($P=0.089$)。次に予後因子の検討を行った。単変量解析の結果前述の AFP 高値($P=0.018$)、PIVKAI 高値($P=0.049$)、多発腫瘍($P=0.013$)、腫瘍径 5cm 以上($P=0.001$)、脈管侵襲陽性($P<0.001$)、肝硬変($P=0.012$)に加え、Wnt5a 細胞膜発現陰性($P=0.020$)が有意な予後不良因子として挙げられた。多変量解析の結果、多発腫瘍(HR: 2.043, 95% CI: 1.238-3.373, $P=0.005$)、腫瘍径 5cm 以上(HR: 1.999, 95% CI: 1.214-3.291, $P=0.007$)、脈管侵襲陽性(HR: 2.367, 95% CI: 1.390-4.029, $P=0.002$)、肝硬変(HR: 1.745, 95% CI: 1.118-2.722, $P=0.014$)、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検討を行った。171 例中 Wnt5a 細胞膜陰性は 133 例、陽性は 38 例であった。それぞれの群の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なかった。再発後の予後に関しては、再発から再々発までの期間に有意差を認めないにも関わらず($P=0.576$)、再発後の全生存は Wnt5a 細胞膜陰性が有意に予後不良であった($P=0.026$)。

次に、Wnt5a のレセプターである ROR2 の発現について検討を行った。ROR2 の発現と Wnt5a の細胞質発現の相関を検討したところ、両者の相関が認められた。ROR2 の発現と臨床病理学的因子との相関を検討した結果、AFP 値($P=0.006$)と分化度($P=0.015$)に相関があった。ROR2 の発現と予後の検討では、全生存($P=0.726$)、無再発生存($P=0.878$)に有意差は認めなかった。

細胞株を用いた検討では、Wnt5a の発現は高分化の細胞株である Huh7 で高く、ROR2 も高分化の細胞株である HepG2、Huh7 で高かった。Huh7 の Wnt5a ノックダウンにより、増殖能と浸潤能の増加が認められ、HLF の Wnt5a 強制発現により、増殖能の変化は認めなかったが、浸潤能の低下が認められた。

EMT 関連分子の変化の検討では、Huh7 においては Wnt5a ノックダウンにより上皮系マーカーである E-cadherin が低下した。間葉系マーカーである N-cadherin、Vimentin は変化がなかった。HLF においては Wnt5a 過剰発現により、上皮系マーカーの変化は認められなかったが、Vimentin の低下が認められた。さらに、RNA マイクロアレイ解析を用いて検討では、HLF において Wnt5a 強制発現により SNAI2、SNAI3 の低下が認められた。MMP については MMP2、MMP7、MMP9、MMP10、MMP23B の発現低下が認められた。rWnt5a タンパクを用いた治療実験では、Huh7 において有意に増殖能が低下し、HLF においても低下傾向にあったが、有意差は認めなかった。また、浸潤能については、Huh7 において有意に浸潤能が低下し、HLF においては変化を認めなかった。

【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。