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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14103
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80626
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuki_Wakizaka.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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

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

目　　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1頁

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6頁

方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8頁

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12頁

Ⅰ. 肝細胞癌における Wnt5a の細胞質発現・・・・・・・・・・ 12頁

Ⅱ. 肝細胞癌における Wnt5a の細胞膜発現・・・・・・・・・・ 18頁

Ⅲ. 肝細胞癌における ROR2 の発現 ・・・・・・・・・・・・・・ 22頁

Ⅳ. 肝癌細胞株を用いた検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32頁

結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 38頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kazuki Wakizaka, Toshiya Kamiyama, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Shingo Shimada, Akihisa Nagatsu, Hirofumi Kamachi, Hideki Yokoo, Moto Fukai, Nozomi Kobayashi, Tomoko Mitsuhashi, Akinobu Taketomi
Wnt5a suppresses invasiveness of hepatocellular carcinoma via suppressing epithelial-mesenchymal transition
(Cancer Science 投稿中)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Kazuki Wakizaka, Toshiya Kamiyama, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Hideki Yokoo, Shingo Shimada, Akihisa Nagatsu, Takanori Ohata, Hirofumi Kamachi, Akinobu Taketomi
Wnt5a expression correlates with clinicopathologic features and prognosis of hepatocellular carcinoma patients
11th AACR-JCA Joint Conference, February 8-12, 2019, Maui, Hawaii, USA

2. 脇坂　和貴、神山　俊哉、横尾　英樹、長津　明久、島田　慎吾、折茂　達也、蒲池　浩文、三橋　智子、武冨　紹信
肝細胞癌における Wnt5a 発現の臨床病理学的意義の検討
第 119 回日本外科学会定期学術集会、2019 年 4 月 18-20 日、大阪

3. Kazuki Wakizaka, Toshiya Kamiyama, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Shingo Shimada, Akihisa Nagatsu, Hirofumi Kamachi, Hideki Yokoo, Tomoko Mitsuhashi, Akinobu Taketomi
The expression of Wnt5a on tumor cell membrane is associated with favorable pathological features and prognosis in hepatocellular carcinoma, The 38th Sapporo International Cancer Symposium, July 11-13, Sapporo, 2019

要　旨

【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が主なリガンドである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、ウエ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が期待される。

略　語　表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AFP	α-fetoprotein
CI	confidence interval
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
EMT	epithelial-mesenchymal transition, 上皮間葉転換
Frz	Frizzled family receptors
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
HR	hazard ratio
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein co-receptors
MMP	matrix metalloproteinase, マトリックスメタロプロテアーゼ
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NC	negative control
OS	overall survival
PCP	planar cell polarity, 平面内極性
PCR	polymerase chain reaction
PIVKAII	protein induced by vitamin K absence or antagonist-II
RFS	relapse free survival
ROR	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor family
rWnt5a	recombinant Wnt5a protein, リコンビナントWnt5aタンパク
Ryk	receptor tyrosine kinase

【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(Galle et al., 2018)。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(Kamiyama et al., 2009)。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(Nusse and Clevers, 2017)。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(Logan and Nusse, 2004)。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(Wend et al., 2013)。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(Asem et al., 2016)。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

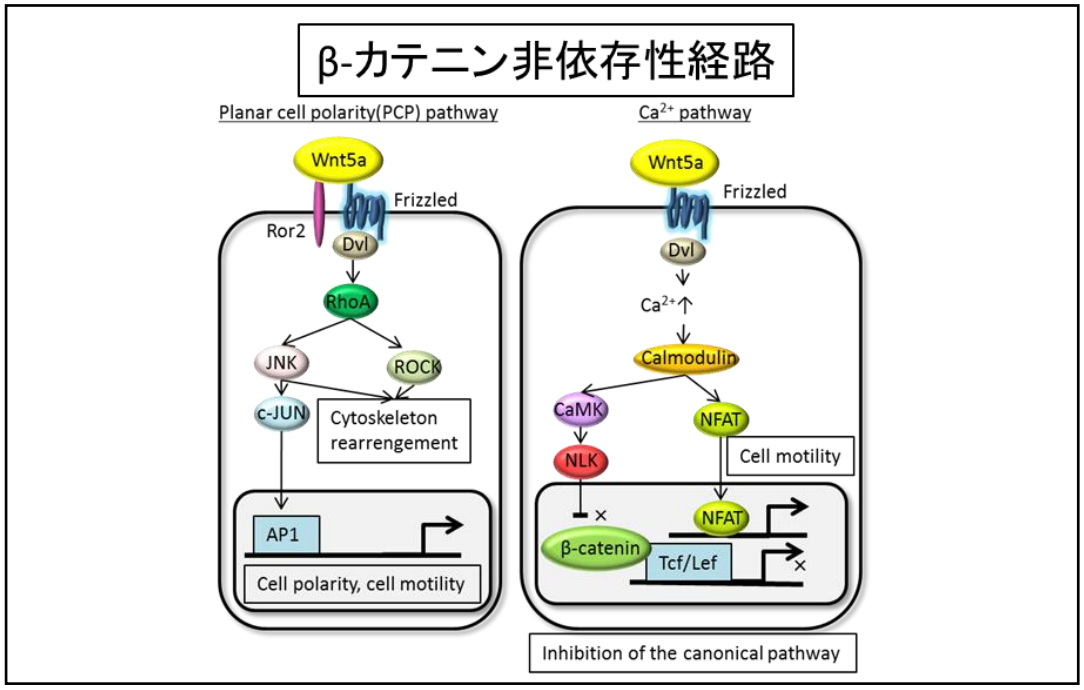

図 1　Wnt シグナルβカテニン非依存性経路

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(図 1)(Zhou et al., 2017)。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(Asem et al., 2016; Geng et al., 2012; Huynh et al., 2019; Wu et al., 2019)。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(Dejmek et al., 2005; Jin et al., 2013; Kanzawa et al., 2013; Kremenevskaja et al., 2005; Prasad et al., 2016; Wang et al., 2017; Weeraratna et al., 2002)。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(Lamouille et al., 2014)。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。

【方法】

患者と組織標本

1997 年 1 月から 2006 年 12 月までの期間に当教室で肝切除が行われた肝細胞癌 243 例が対象である。患者は術後外来にて 3 か月ごとの腫瘍マーカー測定、腹部 CT もしくは MRI にて経過観察が行われている。肝細胞癌の再発は画像検査と腫瘍マーカーで診断した。すべての患者の性別、年齢、肝炎ウイルス感染、腫瘍マーカー(α-fetoprotein (AFP)、protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKAII))、術式、病理報告書のデータを診療録から収集した。病理学的なデータには腫瘍個数、腫瘍径、リンパ節転移、脈管侵襲、背景肝の所見が含まれている。病理学的ステージ診断は肝癌取り扱い規約(第 6 版)に従って行った(The Liver Cancer Study Group of Japan, 2015)。本研究はヘルシンキ宣言に則り、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得て行われた(017-0237)。

免疫組織化学染色

組織標本の免疫染色にはホルマリン固定パラフィン包埋された組織標本の 4 μm の薄切標本を用いた。標本はキシレンとエタノールにて脱パラフィンを行い、抗原の賦活化には target retrieval solution pH 9.0 (415211, Nichirei Biosciences inc.)を用いて、95℃、30 分の圧力鍋を用いた熱処理法にて行った。Block Ace (UKB80, KAC Co., Ltd.)を用いて 5 分間ブロッキングを行い、抗 Wnt5a 抗体(LS-C47384, LifeSpan BioSciences, Inc.)、抗 ROR2 抗体 (PAB3385, abnova)にて 4℃オーバーナイトでインキュベートした。抗 Wnt5a 抗体は 100 倍、200 倍、400 倍、800 倍、1000 倍、2000 倍希釈で、抗 ROR2 抗体は 50 倍、200 倍、500 倍、1000 倍、2000 倍希釈で条件検討を行い濃度を決定した。次に標本を Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) (724152, Nichirei Biosciences inc.)を用いて室温で 30 分インキュベートし、3,3’-ジアミノベンジジンにて発色し、ヘマトキシリン染色にて核染色を行った。

臨床検体における免疫染色の判定は、腫瘍組織における陽性細胞の割合が 50%以上で陽性と判定した。陽性細胞の定義は染色強度に関わらず、細胞質の染色性もしくは細胞膜の染色性で検討を行い決定した。

細胞培養

Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank より購入したヒト肝細胞癌株 HLE、HLF、HepG2、Huh7 を使用した。10%ウシ胎児血清を添加した Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM)を用いて 37℃、5%CO^2 の条件で

培養を行った。培地交換は2日毎に行った。

細胞のトランスフェクション

Wnt5aのノックダウン株作成をWnt5aに対するshRNA発現レンチウイルス TL320572, OriGene)を用いて行った。肝癌細胞株へのトランスフェクションは Lenti-X HTX packaging system (631251, Takara Bio Inc.)を用いた。Lenti-X HTX packaging Mixに1μg/μlのレンチウイルスベクターを混合し、10cm培養プレートに播種させて24時間インキュベートしたLenti-X 293T細胞に添加した。48時間後に上清を回収し、0.45μmフィルターを通して精製し、肝癌細胞株の培養液中に添加してWnt5aノックダウン株を作成した。

Wnt5aの過剰発現株の作成にはWnt5aをコードする全長のcDNAをHuh7のcDNAから逆転写polymerase chain reaction (PCR)にて得た。その際にフォワードプライマーは5’-CAGTGTGGTGGAATTGCCACCATGAAGAAGTCC-3’を用い、リバースプライマーには5’-GATATCTGCAGAATTCTACTTGCACACAAACTGG-3’を用いた。Wnt5aのcDNAをpcDNA3.1 (V79020, Thermo Fisher Scientific)に導入し、70%コンフルエントとなった肝癌細胞株にLipofectamine2000 (Invitrogen, Life Technologies CO.)を用いてトランスフェクションした。pcDNA3.1にはG418耐性が含まれており、48時間毎にG418が含まれた培地に交換し、細胞株の安定化をした。

ウエスタンブロット

細胞株を80%コンフルエントまで培養し、lysis bufferにてタンパクの抽出を行った。それぞれのサンプルをドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、ポリフッ化ビニリデン膜に転写した。3%ウシ血清アルブミンにてブロッキングの後、表1に示す条件で一次抗体の免疫ブロットを行った。それらを5000倍希釈抗ウサギ二次抗体(#7074, Cell Signaling Technology, Inc.)で反応させ、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (34076, Thermo Scientific)にて検出を行った。

表 1 ウエスタンブロットにおける一次抗体の条件

一次抗体	製品コード、メーカー	濃度
Wnt5a	ab174963、Abcam	1/500
GAPDH	#3683、Cell Signaling Technology	1/1000
E-cadherin	#3195、Cell Signaling Technology	1/1000
ZO-1	#8193、Cell Signaling Technology	1/1000
N-cadherin	ab76011、Abcam	1/5000
Vimentin	#5741、Cell Signaling Technology	1/1000
ROR2	PAB3385、abnova	1/1000

GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

細胞増殖アッセイ

96 ウェルプレートに細胞を 1 ウェルあたり 5×10^3 細胞播種した。生細胞の測定は CellTiter96 (G5430, Promega Corporation)を用いた比色定量を行った。3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)を 1 ウェルあたり 20μl 添加し、2 時間インキュベートして Varioskan(Thermo Fisher Scientific)にて測定を行った。測定は細胞播種時、24 時間後、48 時間後、72 時間後に行った。

細胞浸潤アッセイ

細胞浸潤アッセイには Matrigel invasion chamber 24-well 8μm (354480, Corning)を用いた。チャンバーを DMEM にて 2 時間水和し、それぞれの濃度に調整した細胞をインサートに入れた。24 時間インキュベートした後、綿棒で非浸潤細胞とマトリゲルを除去し、ディフ・クイック(16920, シスメックス)にて標本の固定、染色を行った。顕微鏡下に倍率 10 倍でランダムな 5 視野の細胞数を計測し、その平均を浸潤スコアとした。

Wnt5a リコンビナントタンパク(rWnt5a)を用いた治療実験

細胞株の培養液中に rWnt5a(ab204627, abcam)を 1.0μg/ml の濃度で添加し、上記の細胞増殖アッセイ、細胞浸潤アッセイにて対照群との比較を行った。

mRNA マイクロアレイ解析

HLF および HLF の Wnt5a 強制発現株のトータル RNA の精製を RNeasy Mini

(Qiagen)を用いて下記の手順で行った。細胞株を 10 ㎝培養ディッシュに播種し、80%コンフルエントの状態でトリプシン処理後に遠心しペレットを回収した。Buffer RLT を 600μl 添加して混和し、QIAshredder で 2 分間遠心してホモジナイズした。70%エタノールを添加し、RNeasy スピンカラムにアプライし、10000rpm で 15 秒間遠心した。Buffer RW1 を 700μl 添加し 15 秒間遠心した後、Buffer RPE を 500μl 添加して 15 秒間遠心した。さらに Buffer RPE を 500μl 添加して 2 分間遠心した。RNase フリー水 50μl をスピンカラムメンブレンに添加し、10000rpm で 1 分間遠心し、RNA を抽出した。SurePrint G3 Human 8×60K ver.3.0 (Agilent)を用いて HLF および HLF の Wnt5a 強制発現株の mRNA の発現を網羅的に比較を行った。発現量はノーマライズ後のシグナル値の HLF に対する HLF の Wnt5a 強制発現株の比で比較を行った。

統計解析

統計解析には EZR version 1.35 を用いた。臨床病理学的因子と Wnt5a もしくは ROR2 の発現の相関はフィッシャーの正確検定にて解析した。全生存と無再発生存曲線はカプランマイヤー法にてプロットし、2 群の比較にはログランク検定を用いた。多変量解析は Cox 比例ハザード分析を用いた。細胞実験においては 2 群の比較はスチューデントの t 検定を用いた。P 値が 0.05 以下を統計学的有意差ありとした。

【結果】

Ⅰ．肝細胞癌における Wnt5a の細胞質発現

はじめに、免疫染色の条件検討を行った。正常肝組織は Wnt5a が陰性であり、慢性肝炎の肝組織は Wnt5a 陽性となることが報告されており、これらをコントロールとして検討した。腫瘍組織 3 例、正常の肝組織 1 例、B 型肝炎ウイルスによる慢性肝炎を有する肝組織 1 例に対して抗 Wnt5a 抗体を 100 倍希釈で免疫染色を行ったところ、図 1 に示すように腫瘍組織、背景肝臓ともに染色され判定は不可能であった。そこでさらに一次抗体を 200 倍、400 倍、800 倍、1000 倍、2000 倍希釈で免疫染色を行った(図 2)。一次抗体のネガティブコントロールはすべて陰性であることを確認し、2000 倍希釈にて正常肝で陰性、慢性

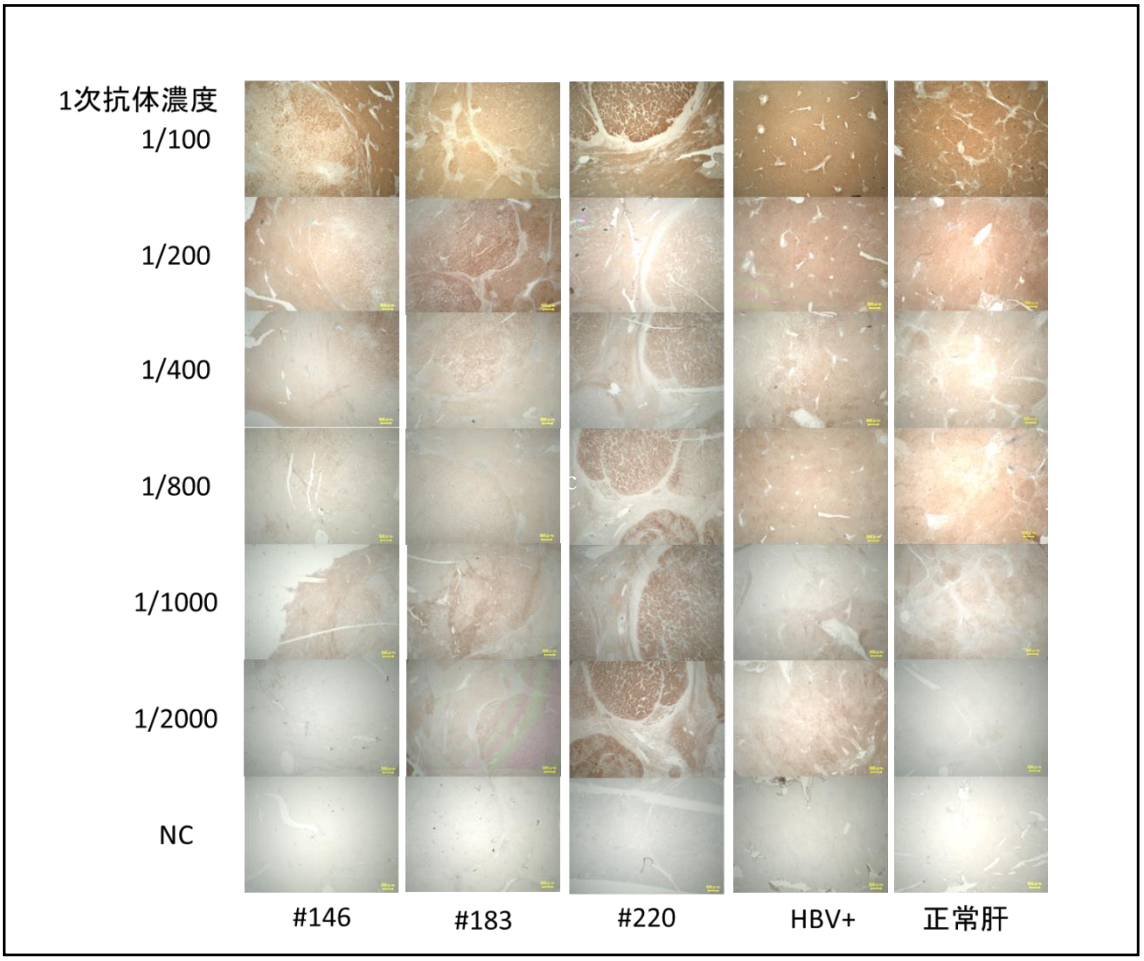

図 2　免疫染色の条件検討を腫瘍組織 3 例、正常肝 1 例、慢性肝炎 1 例を用いて行った(×10)。NC は一次抗体の negative control、HBV+は B 型肝炎を有する慢性肝炎の肝組織である。

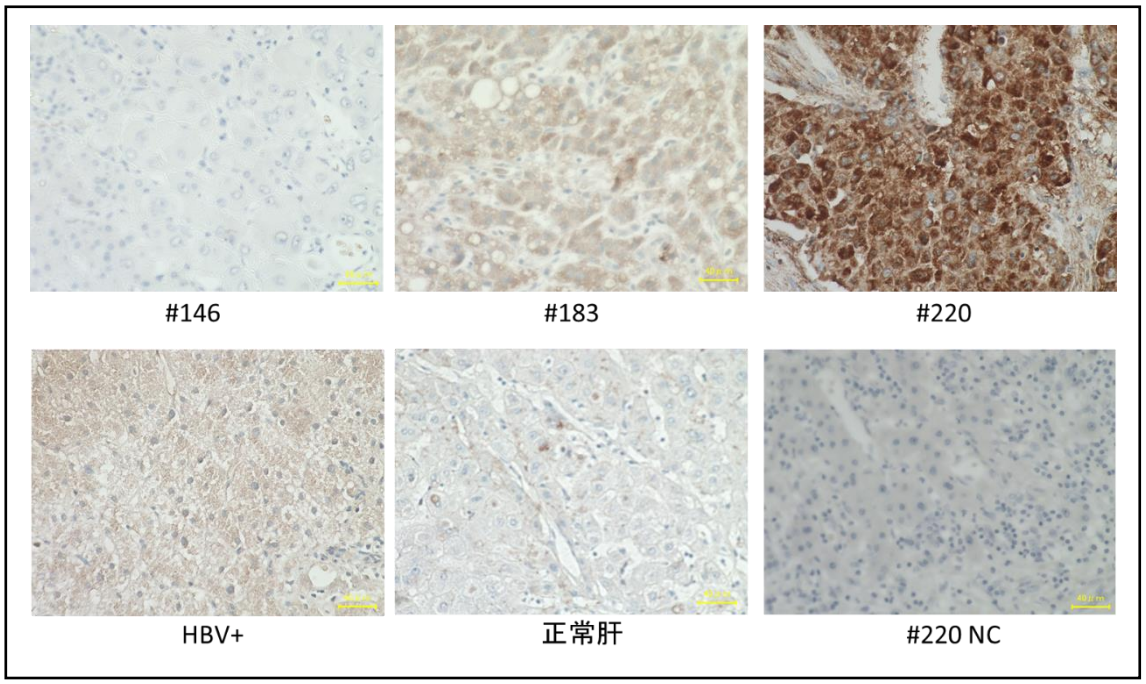

図 3　抗 Wnt5a 抗体 2000 倍希釈による免疫染色(×40)。正常肝で陰性、慢性肝炎で陽性を示し、腫瘍組織においても様々な染色度合いを示した。

肝炎で陽性を示し、また腫瘍組織においても陰性腫瘍(図 1 #146)と陽性腫瘍(図 1 #220)が認められ、これが最適な条件と考えられた。2000 倍希釈での強拡大像(×40)を図 3 に示す。この条件で 243 例に対して Wnt5a の免疫染色を行った。

免疫染色の判定は既報に従って、表 2 に示すように細胞質への染色性で評価を行った。それぞれの判定の代表的な顕微鏡像(×40)を図 4 に示す。判定の結果は表 2 の通りであり、臨床病理学的因子に関する解析の際にはスコア 0 および 1 を Wnt5a 細胞質陰性(n=79)、スコア 2 および 3 を Wnt5a 細胞質陽性(n=164)として解析を行った。

表 2　細胞質の染色性による免疫染色の判定と結果

染色スコア		n (%)
0	染色されない	38 (15.6)
1	0 と 2 の中間	41 (16.9)
2	薄く全体的にまたは濃く部分的に陽性	74 (30.5)
3	濃く全体的に陽性	90 (37.0)

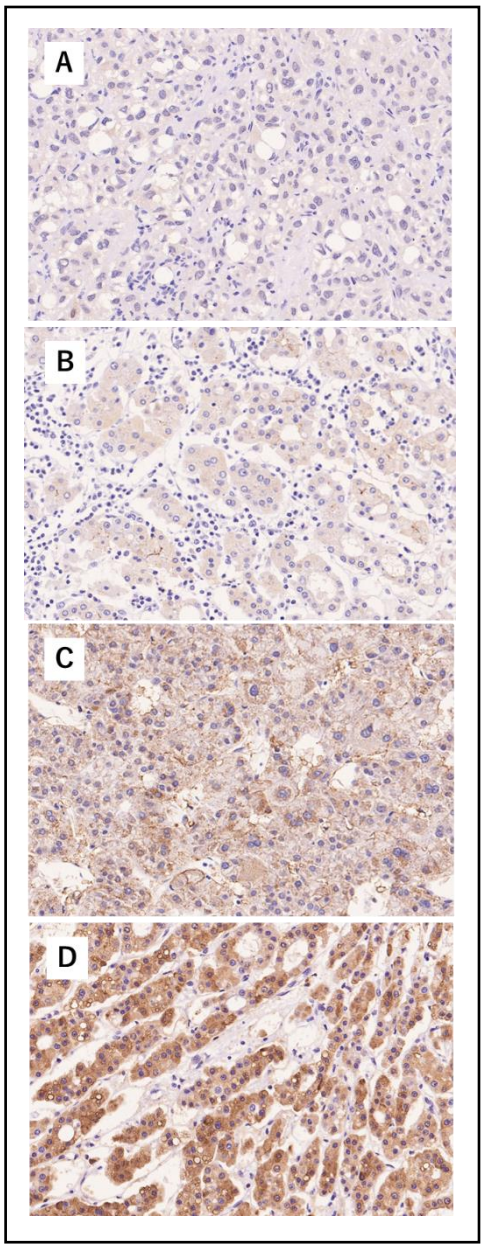

図 4　細胞質への染色性による免疫染色の判定。
A: Score 0, B: Score 1, C: Score 2, D: Score 3

表 3 243 例の患者背景

Characteristics	患者数 (%)
Sex	
Male	200 (82.3)
Female	43 (17.7)
Age median (range)	63 (35-82)
Viral infection	
HBV	90 (37.0)
HCV	92 (37.9)
HBV+HCV	8 (3.3)
NBNC	53 (21.8)
Child-Pugh class	
A	237 (97.5)
B	6 (2.5)
AFP (ng/mL)	
≤ 10	127 (52.3)
> 10	114 (46.9)
PIVKAII	
≤ 40	101 (43.2)
> 40	136 (56.0)
Differentiation	
Well	40 (16.5)
Moderate	156 (64.2)
Poor	47 (19.3)
Tumor number	
Solitary	187 (77.0)
Multiple	56 (23.0)
Tumor size (cm)	
≤ 2	36 (14.8)
2-5	137 (56.4)
5-10	51 (21.0)
> 10	19 (7.8)
Vascular invasion	
positive	39 (16.1)
negative	204 (83.9)
Lymph node metastasis	
positive	0 (0.0)
negative	243 (100.0)
pStage	
I	24 (9.9)
II	136 (56.0)
III	83 (34.2)
IVA	0 (0.0)
IVB	0 (0.0)
Non-cancerous liver	
Non-cirrhosis	157 (64.6)
Cirrhosis	86 (35.4)

243 例の患者背景を表 3 に示す。まず 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(表 4)。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。次に Wnt5a の発現と予後の関連について検討を行った(図 5)。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

表 4　Wnt5a の細胞質発現と臨床病理学的因子の相関

		Wnt5a-cytoplasm		P value
		Negative	Positive	
Gender	Male	62	138	0.286
	Female	17	26	
Age	≤ 60 yr	35	67	0.678
	> 60 yr	44	97	
HBV	Negative	45	100	0.576
	Positive	34	64	
HCV	Negative	45	98	0.679
	Positive	34	66	
AFP	≤ 10 ng/ml	31	96	**0.009**
	> 10 ng/ml	46	68	
PIVKAII	≤ 40 mAU/ml	36	65	0.402
	> 40 mAU/ml	41	95	
Differentiation	well-mod	52	142	**<0.001**
	por	27	22	
Tumor number	Solitary	68	119	**0.023**
	Maltiple	11	45	
Tumor size	≤ 5cm	51	114	0.464
	> 5cm	28	50	
Vascular invasion	Negative	60	144	**0.025**
	Positive	19	20	
Non-cancerous liver	Non-cirrosis	52	105	0.886
	Cirrosis	27	59	

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(表 5)。

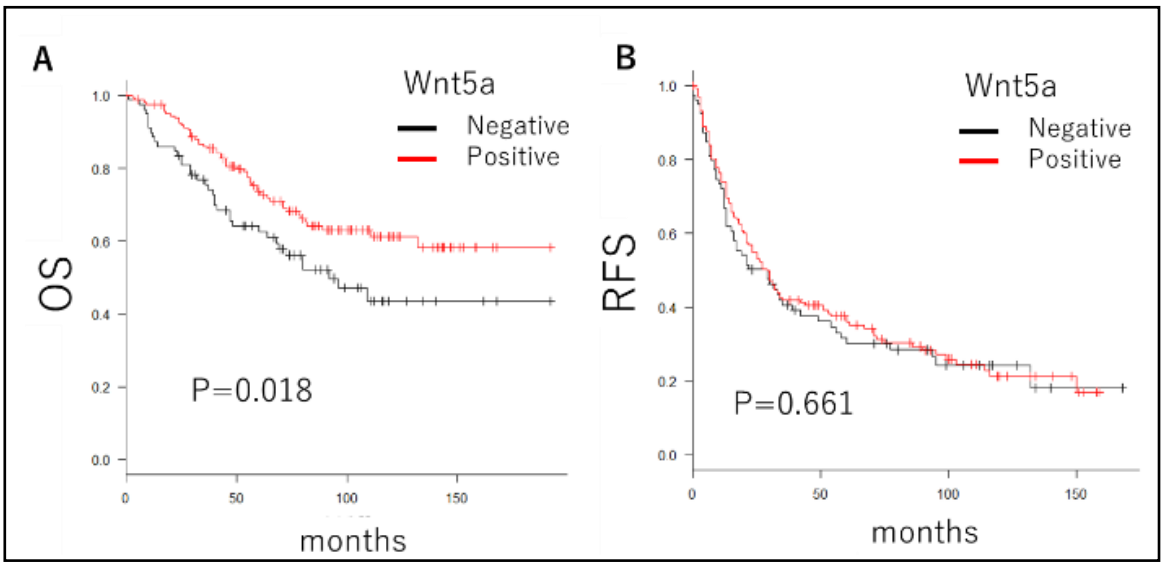

図 5　Wnt5a 細胞質発現による予後の比較
A: 全生存(OS)、B: 無再発生存(RFS)

表５　全生存についての予後因子の検討

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P value
Gender	1.030	0.581-1.823	0.921			
age ＞60 yr	1.426	0.926-2.196	0.107			
HBV	0.873	0.569-1.339	0.533			
HCV	1.132	0.743-1.724	0.565			
AFP＞10 ng/ml	1.668	1.090-2.553	**0.018**	1.446	0.936-2.297	0.095
PIVKAII＞40 mAU/ml	1.570	1.002-2.459	**0.049**	1.417	0.860-2.336	0.172
Tumor number	1.824	1.134-2.932	**0.013**	2.133	1.289-3.532	**0.003**
Tumor size＞5cm	2.110	1.384-3.218	**0.001**	1.818	1.115-2.965	**0.017**
Vascular invasion	2.630	1.645-4.205	**<0.001**	2.501	1.478-4.232	**0.001**
Differentiation (por)	1.361	0.826-2.241	0.226			
Non-cancerous liver (Cirrhosis)	1.721	1.130-2.623	**0.012**	1.655	1.062-2.579	**0.026**
Wnt5a-cytoplasm	1.656	1.086-2.525	**0.019**	1.506	0.944-2.385	0.086

Ⅱ. 肝細胞癌における Wnt5a の細胞膜発現

既報では Wnt5a の免疫染色の判定は細胞質の染色性で行われており、上記の検討でも Wnt5a の細胞質への発現で検討を行ったが、実際の免疫染色の組織像では細胞膜に染色されているものも含まれていた。そこで、細胞膜への発現に着目して検討を行った。図 6 に示すように、細胞質への染色性に関わらず、細胞膜に染色されるものを Wnt5a 細胞膜陽性と判定した。表 6 に免疫染色の判定とその内訳を示す。Wnt5a の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(表 7)。次に Wnt5a の膜発現と予後との関連を検討した(図 7)。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(表 8)。単変量解析の結果前述の 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)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 5 ㎝以上(HR: 1.999, 95% CI: 1.214-3.291, P=0.007)、脈管侵襲陽性(HR: 2.367, 95%

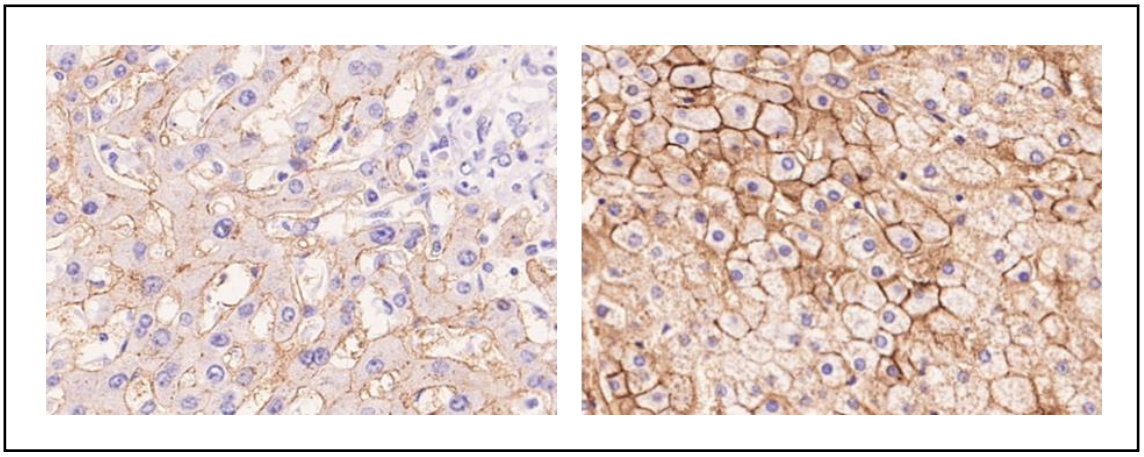

図 6　免疫染色により Wnt5a の細胞膜への発現を認めた症例の組織像(×40)。

表 6　細胞膜の染色性による免疫染色の判定と結果

判定		n (%)
陰性	細胞膜が染色されない	180 (74.1)
陽性	細胞膜が染色される	63 (25.9)

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。以上の検討より、Wnt5a の細胞質への発現よりも細胞膜への発現が予後に対してより有意な因子であると考えられた。

表 7　Wnt5a の細胞膜への発現と臨床病理学的因子の相関

		Wnt5a-membrane		P value
		Negative	Positive	
Gender	Male	145	55	0.256
	Female	35	8	
Age	≤ 60 yr	73	29	0.462
	> 60 yr	107	34	
HBV	Negative	110	35	0.459
	Positive	70	28	
HCV	Negative	97	46	**0.011**
	Positive	83	17	
AFP	≤ 10 ng/ml	87	40	0.056
	> 10 ng/ml	91	23	
PIVKAII	≤ 40 mAU/ml	77	24	0.652
	> 40 mAU/ml	99	37	
Differentiation	well-mod	135	59	**0.001**
	por	45	4	
Tumor number	Solitary	141	46	0.390
	Maltiple	39	17	
Tumor size	≤ 5cm	125	40	0.434
	> 5cm	55	23	
Vascular invasion	Negative	146	58	**0.046**
	Positive	34	5	
Non-cancerous liver	Non-cirrosis	118	39	0.647
	Cirrosis	62	24	

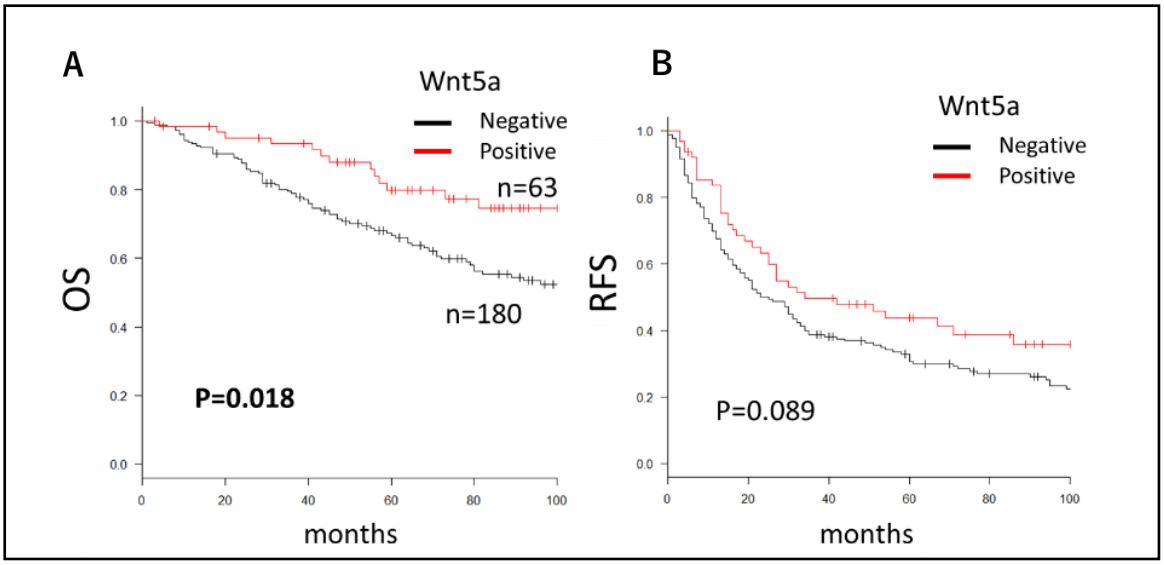

図 7　Wnt5a 細胞膜発現による予後の比較
A: 全生存(OS)、B: 無再発生存(RFS)

表 8　全生存についての予後因子の検討

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P value
Gender	1.030	0.581-1.823	0.921			
age ＞60 yr	1.426	0.926-2.196	0.107			
HBV	0.873	0.569-1.339	0.533			
HCV	1.132	0.743-1.724	0.565			
AFP ＞10 ng/ml	1.668	1.090-2.553	**0.018**	1.501	0.964-2.337	0.072
PIVKAII ＞40 mAU/ml	1.570	1.002-2.459	**0.049**	1.331	0.807-2.192	0.262
Tumor number	1.824	1.134-2.932	**0.013**	2.043	1.238-3.373	**0.005**
Tumor size ＞5cm	2.110	1.384-3.218	**0.001**	1.999	1.214-3.291	**0.007**
Vascular invasion	2.630	1.645-4.205	**<0.001**	2.367	1.390-4.029	**0.002**
Differentiation (por)	1.361	0.826-2.241	0.226			
Non-cancerous liver (Cirrhosis)	1.721	1.130-2.623	**0.012**	1.745	1.118-2.722	**0.014**
Wnt5a-membrane	1.933	1.109-3.368	**0.020**	1.895	1.053-3.409	**0.033**

再発についての検討

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。前項の検討で、Wnt5a の細胞膜への発現がより有意な因子となったので、再発について Wnt5a 細胞膜発現との関連を検討した。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(表 9)。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)(図 8)。

表 9　再発についての検討

	Wnt5a-membrane		P value
	Negative (n=133)	Positive (n=38)	
Location			
Intrahepatic	107 (80.5)	32 (84.2)	0.813
Extrahepatic	16 (12.0)	4 (10.5)	0.518
Both	9 (6.8)	2 (5.3)	1.000
Intrahepatic recurrence			
Tumor number	1.97±2.19	1.68±1.19	0.481
Tumor diameter (cm)	1.75±0.99	1.67±0.70	0.668
Management			
Resection	19 (14.8)	6 (16.7)	0.795
RFA (MCT, PEIT)	38 (29.7)	9 (25.0)	0.679
TAE	46 (35.9)	16 (44.4)	0.437
Chemotherapy	8 (6.3)	1 (2.8)	0.685
Radiotherapy	0 (0.0)	1 (2.8)	0.220
metastatic resection	13 (10.2)	3 (8.3)	1.000
BSC	4 (3.1)	0 (0.0)	0.577

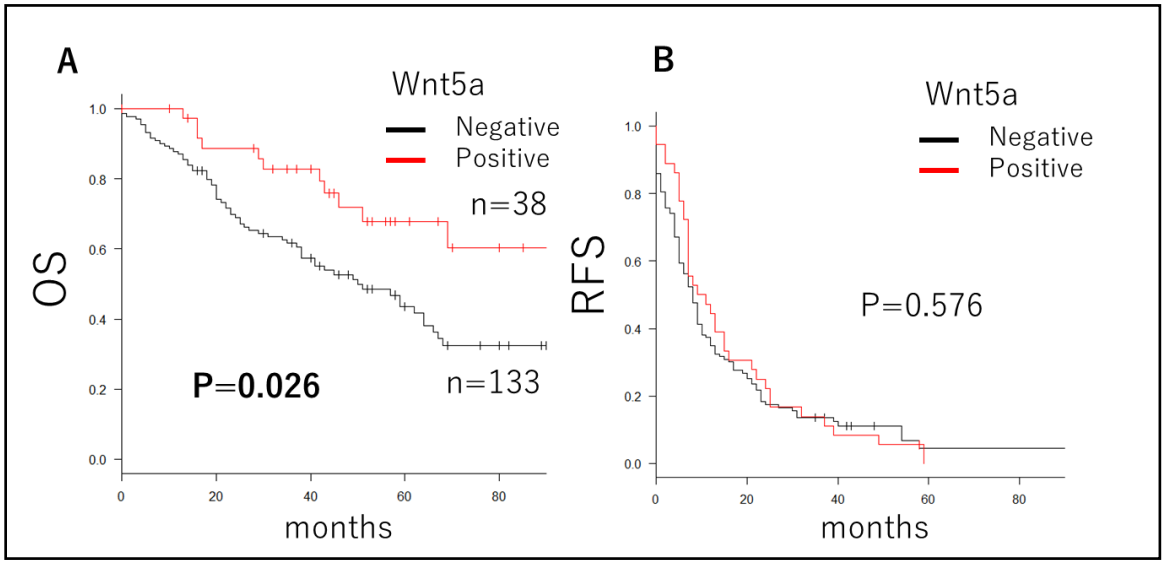

図 8　Wnt5a 細胞膜発現による再発後の予後の比較
A: 全生存(OS)、B: 無再発生存(RFS)

Ⅲ. 肝細胞癌における ROR2 の発現

Wnt5a は細胞外分泌タンパクであり、細胞膜に発現するレセプターに結合して、βカテニン非依存性経路を活性化させる。上記の Wnt5a の免疫染色の検討にて Wnt5a の発現は細胞質よりも細胞膜の発現でより有意であることがわかり、これは細胞膜のレセプターに結合した Wnt5a が染色されているのではないかと考えた。そこで、Wnt5a のレセプターに着目して検討を行った。そこで Wnt5a のレセプターである ROR2 の発現について検討を行った。はじめに、ROR2 の免疫染色の条件検討を行った。条件検討に用いたサンプルは Wnt5a の染色スコアが 0、2、3 であった 3 症例と膜発現陽性の 1 症例で、一次抗体を 50 倍、200 倍、500 倍、1000 倍、2000 倍希釈の条件で検討を行った(図 9)。500 倍希釈で Wnt5a の免染スコア 0 の腫瘍の染色が陰性となり、その他の腫瘍は薄く陽性となったので、この条件を用いることとした。Wnt5a 細胞膜陽性の症例においては、明確な膜陽性像は得られなかった(図 10)。免疫染色の判定は Wnt5a の判定と同様の基準で行った(表 10)。ROR2 の免疫染色においては明確な膜陽性像は得られなかったため、細胞質の染色性のみで評価を行った。

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(図 11)。染色スコア 0 および 1 を ROR2 陰性、2 および 3 を ROR2 陽性と定義して、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)に相関があることが分かった(表 11)。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(図 12)。

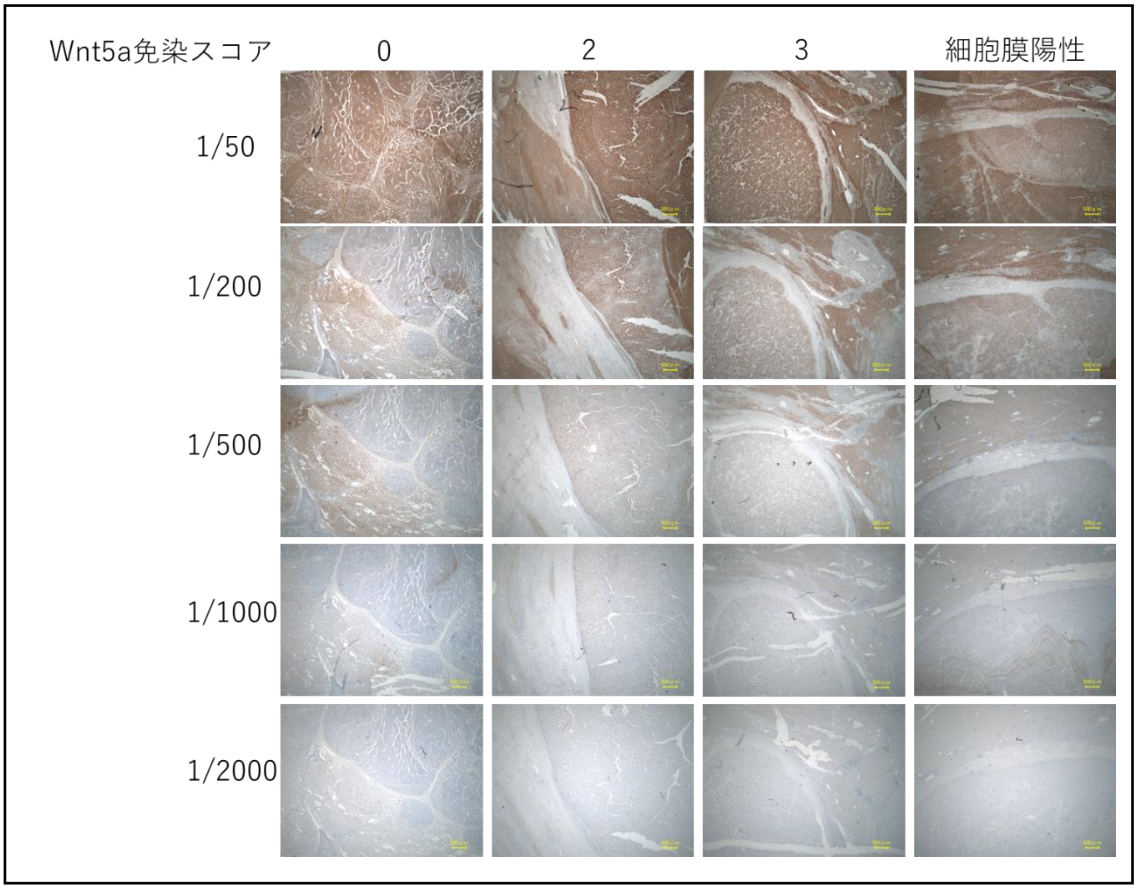

図 9　ROR2 の免疫染色の条件検討(×10)

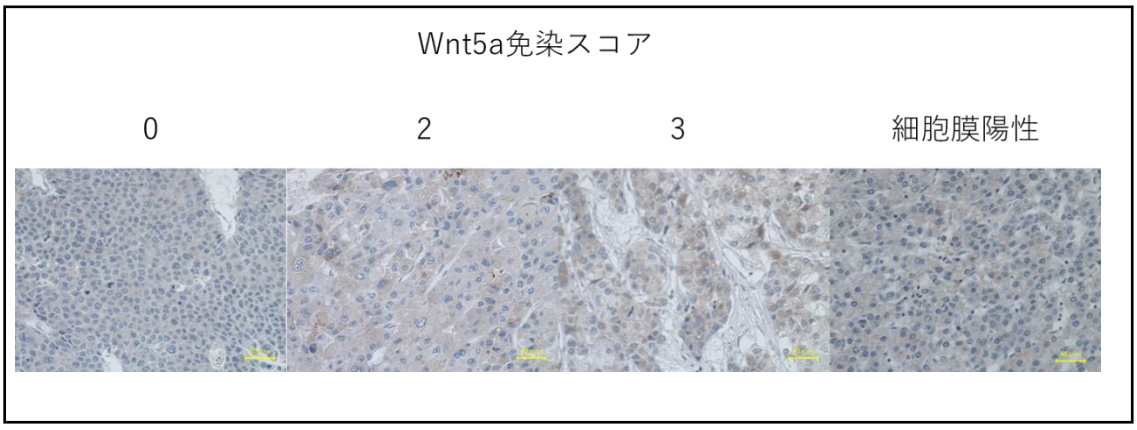

図 10　一次抗体 500 倍希釈による ROR2 の免疫染色像(×40)。細胞膜への明確な染色は認められなかった。

表 10　ROR2 の免疫染色の判定と結果

染色スコア		n（%）
0	染色されない	29（11.9）
1	0 と 2 の中間	67（27.6）
2	薄く全体的にまたは濃く部分的に陽性	105（43.2）
3	濃く全体的に陽性	42（17.3）

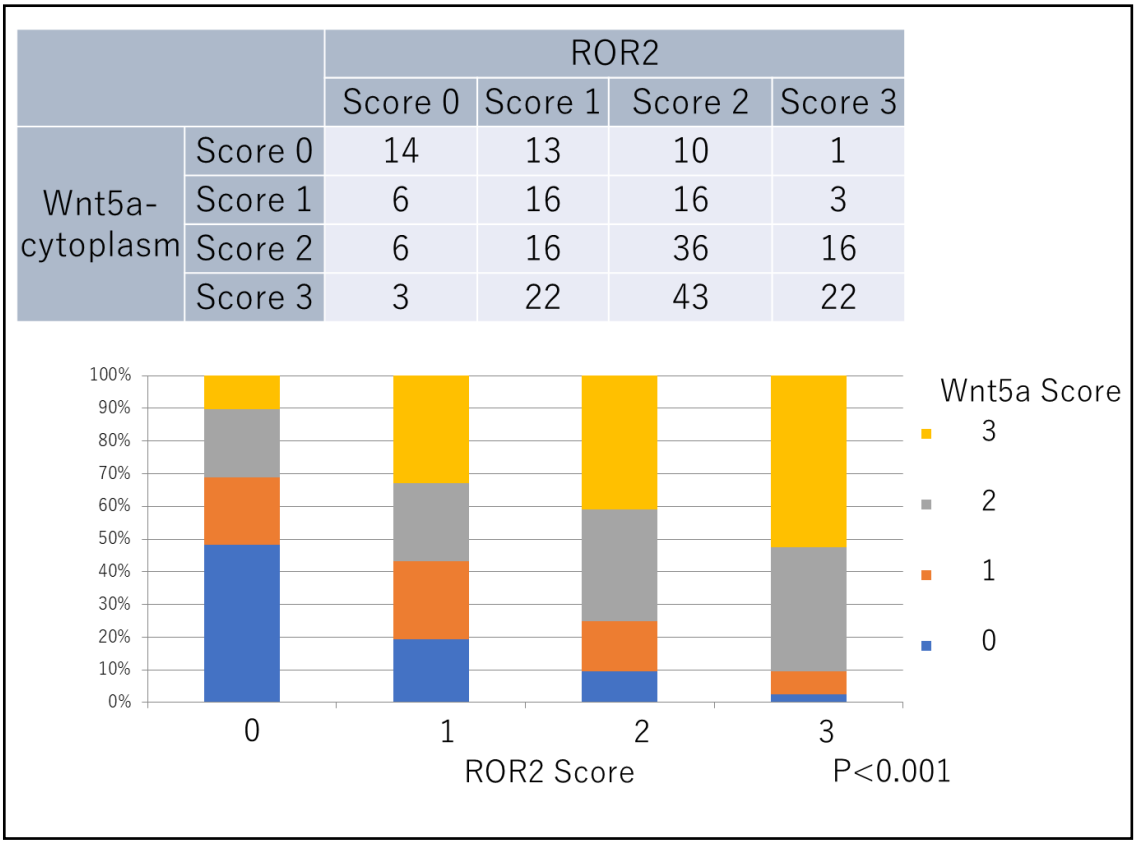

図 11　ROR2 と Wnt5a の細胞質発現の相関

表 11　ROR2 の発現と臨床病理学的因子との相関

		ROR2		P value
		Negative (n=96)	Positive (n=147)	
Gender	Male	74	126	0.089
	Female	22	21	
Age	≤ 60 yr	40	62	1.000
	> 60 yr	56	85	
HBV	Negative	56	89	0.789
	Positive	40	58	
HCV	Negative	52	91	0.234
	Positive	44	56	
AFP	≤ 10 ng/ml	39	88	**0.006**
	> 10 ng/ml	55	59	
PIVKAII	≤ 40 mAU/ml	41	60	0.893
	> 40 mAU/ml	53	83	
Differentiation	well-mod	69	125	**0.015**
	por	27	22	
Tumor number	Solitary	75	112	0.756
	Maltiple	21	35	
Tumor size	≤ 5cm	64	101	0.779
	> 5cm	32	46	
Vascular invasion	Negative	80	124	0.859
	Positive	16	23	
Non-cancerous liver	Non-cirrosis	62	95	1.000
	Cirrosis	34	52	

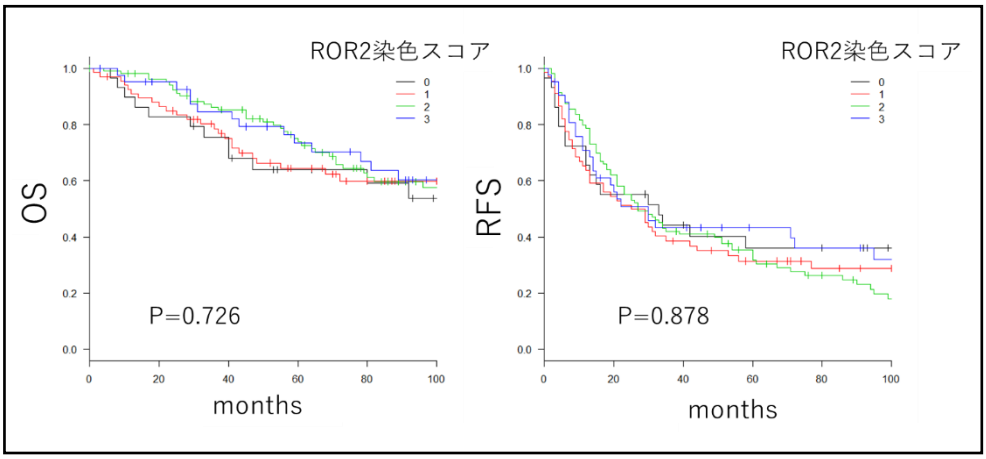

図 12　ROR2 の発現と予後

Ⅳ. 肝癌細胞株を用いた検討

肝癌細胞株における Wnt5a および ROR2 の発現

以上の臨床検体を用いた検討により、Wnt5a の細胞膜への発現が予後因子として有意であり、Wnt5a 陰性が低分化と脈管侵襲に関連していることがわかった。また、その細胞膜受容体である ROR2 は予後との関連はなかったが、Wnt5a の細胞質発現と相関があり、分化度とも相関があることがわかった。このことから、Wnt5a は肝細胞癌の腫瘍抑制因子である可能性が考えられ、その機序についてさらに検討を行うため細胞株を用いて検討を行った。

Wnt5a の発現が分化度に関連することから、低分化の肝細胞株として HLE、HLF を、高分化の肝細胞株として HepG2、Huh7 を選択し、ウエスタンブロットにてこれらの細胞株の Wnt5a タンパクおよび ROR2 タンパクの発現を検討した(図 13)。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。

Wnt5a ノックダウンおよび過剰発現による悪性度の変化

肝細胞癌における Wnt5a の機能を明らかにするために、Wnt5a 高発現である Huh7 の Wnt5a ノックダウンと Wnt5a 低発現である HLF の Wnt5a 強制発現による

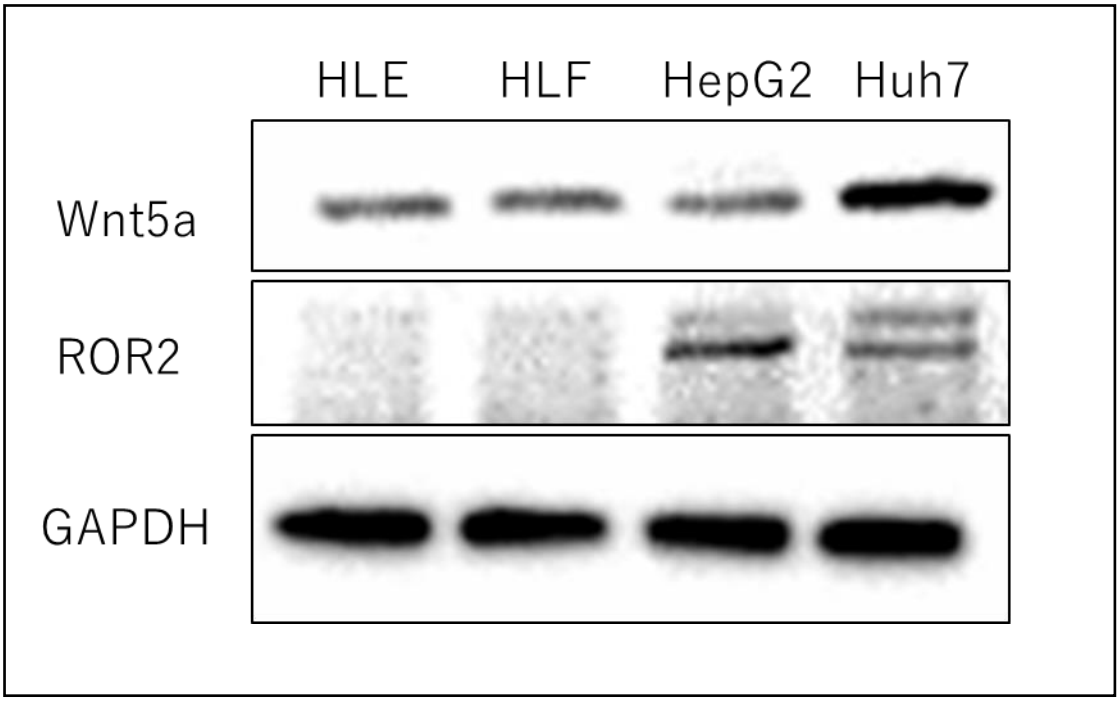

図 13　肝癌細胞株における Wnt5a および ROR2 のタンパク発現

増殖能と浸潤能の変化を検討した。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た(図 14)。また、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(図 15)。

Wnt5a ノックダウンおよび過剰発現による EMT 関連分子の変化

Wnt5a による増殖能、浸潤能の変化に関わる分子的な機序を明らかにするため、EMT に着目しその関連分子の変化を検討した。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(図 16A)。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(図 16B)。

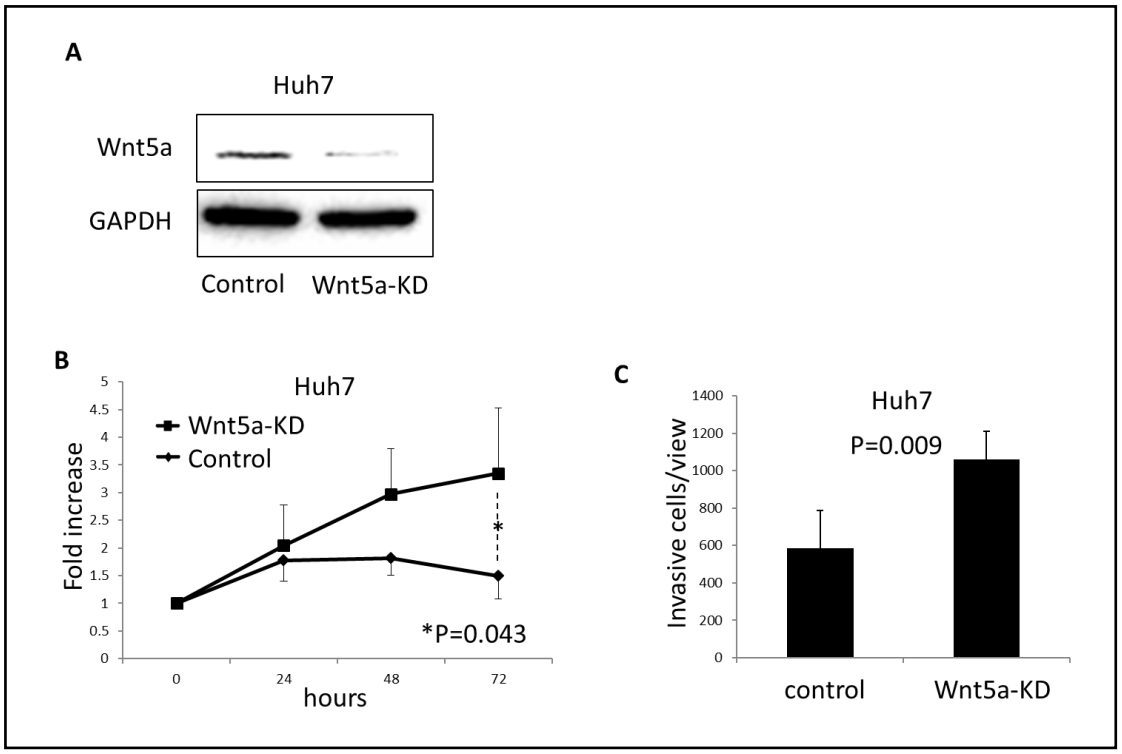

図 14　Huh7 における Wnt5a ノックダウンによる増殖能、浸潤能の変化。
A:shRNA により、Wnt5a タンパク発現は低下した。B:細胞増殖アッセイにて増殖能の増加が認められた。C:細胞浸潤アッセイにて浸潤能の増加が認められた。

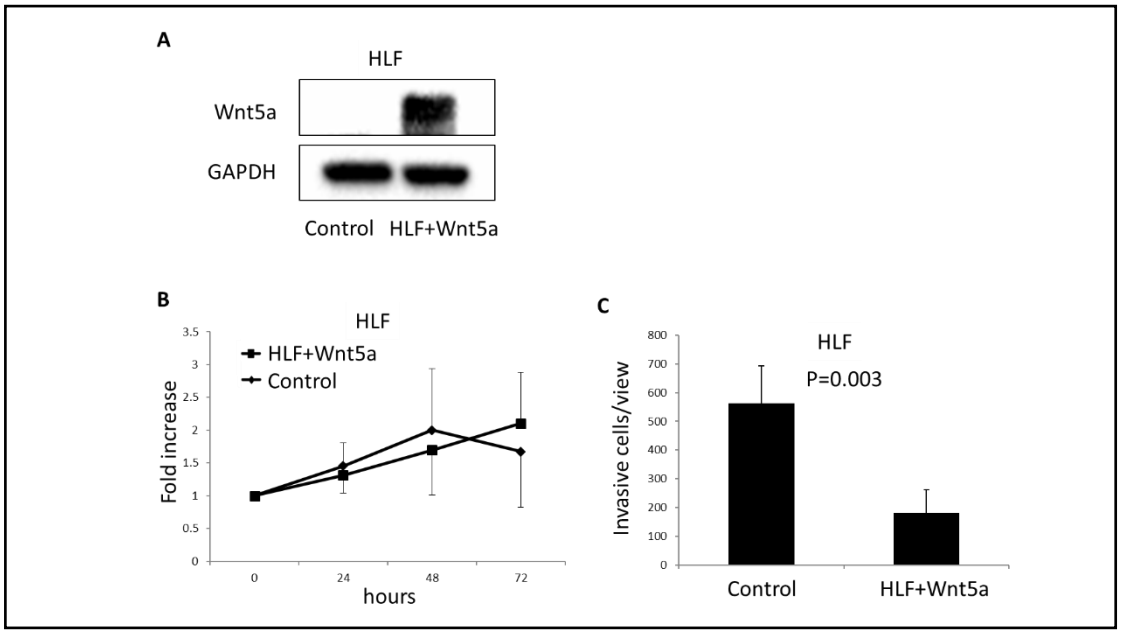

図 15　HLF における Wnt5a 強制発現による増殖能、浸潤能の変化。
A:発現ベクターの導入により、Wnt5a タンパク発現は増加した。B:細胞増殖アッセイにて増殖能の変化は認められなかった。C:細胞浸潤アッセイにて浸潤能の低下が認められた。

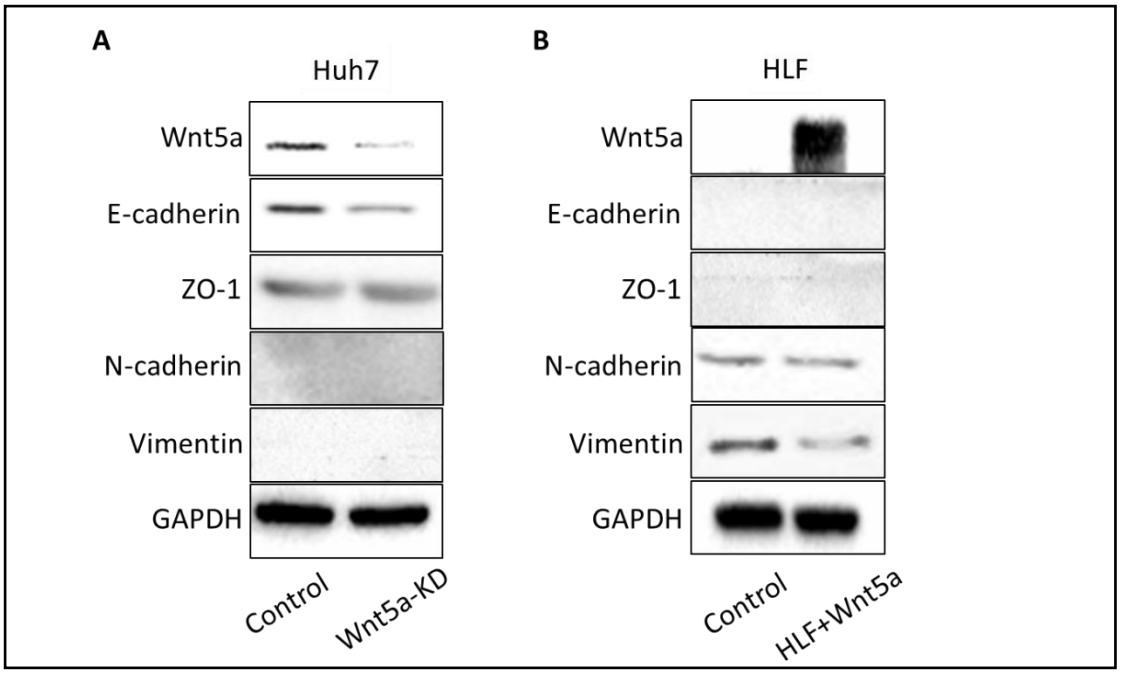

図 16　Wnt5a による EMT 関連分子の変化。A：Huh7 における Wnt5a ノックダウンにより、E-cadherin の低下が認められた。B：HLF における Wnt5a 強制発現により Vimentin の低下が認められた。

RNA マイクロアレイ解析による EMT 関連遺伝子の変化

さらに EMT の制御に関わる転写因子や癌細胞の浸潤に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の変化を RNA マイクロアレイ解析を用いて検討した。EMT 関連転写因子については、HLF において Wnt5a 強制発現により SNAI2、SNAI3 の低下が認められた(図 17)。MMP については MMP2、MMP7、MMP9、MMP10、MMP23B の発現低下が認められた(図 18)。

rWnt5a タンパクを用いた肝癌細胞株に対する治療実験

以上の検討から Wnt5a は肝細胞癌の腫瘍抑制因子である可能性が考えられた。Wnt5a タンパクは細胞外分泌タンパクであり、自己分泌もしくは傍分泌の形式で細胞膜受容体に結合し、βカテニン非依存性経路を活性化させる。これらのことから、外因性の Wnt5a タンパクによりβカテニン非依存性経路を活性化させ、腫瘍の進展を抑制できるのではないかと考えた。腫瘍の増殖能については、rWnt5a タンパクの添加により 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(図 19)。また、浸潤能については、rWnt5a タンパクの添加により 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(図 20)。

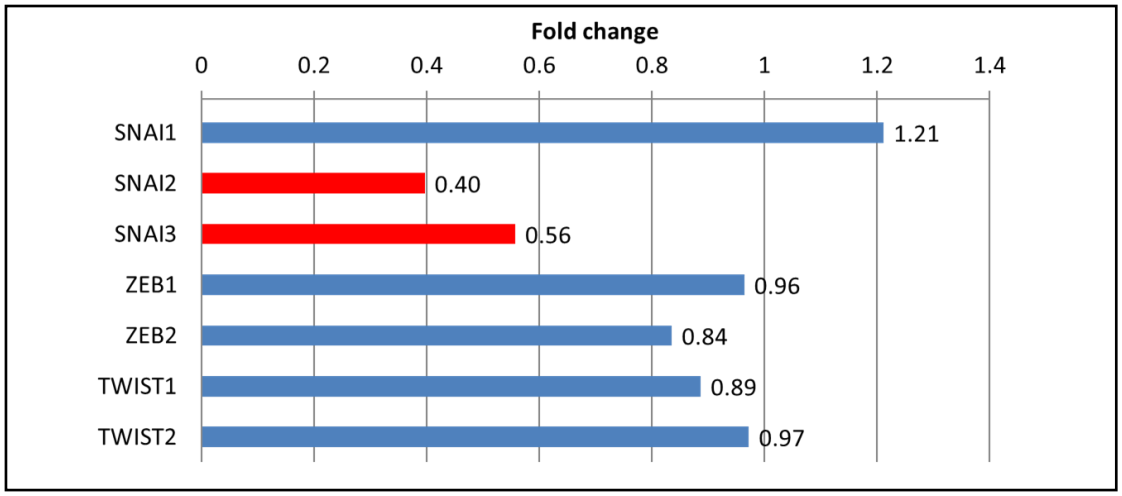

図 17　RNA マイクロアレイによる HLF における Wnt5a 強制発現による EMT 関連転写因子の変化。Wnt5a の強制発現により SNAI2、SNAI3 の発現が低下した。

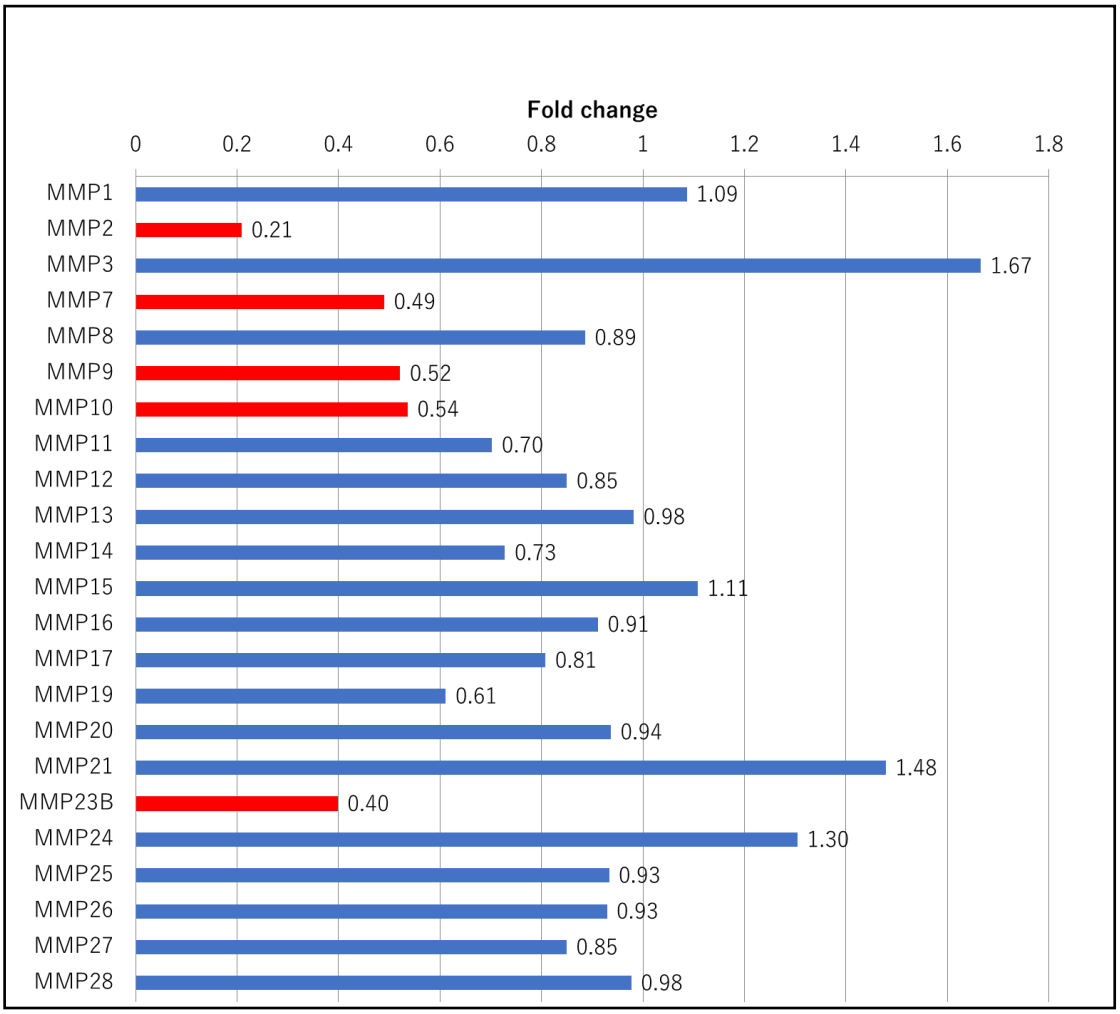

図 18　RNA マイクロアレイによる HLF における Wnt5a 強制発現による MMP ファミリー遺伝子の変化。腫瘍細胞の浸潤に関わるとされている MMP2、MMP9 の発現低下が認められた。

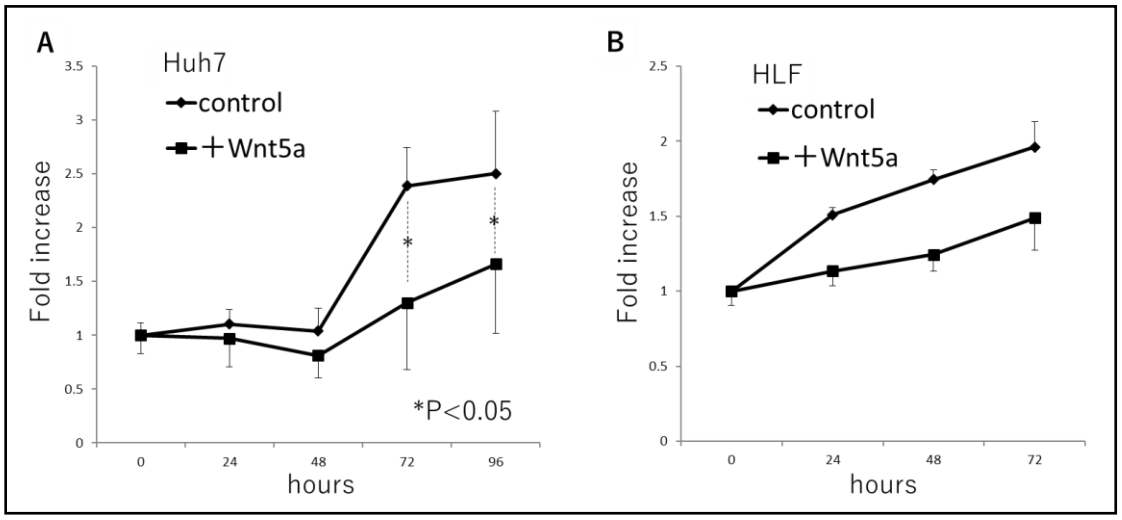

図 19　rWnt5a タンパクを用いた治療実験における肝癌細胞株の増殖能の変化。A:Huh7 において rWnt5a 添加により有意に増殖能の低下を認めた。B:HLF では増殖能は低下傾向であったが、有意差は認めなかった。

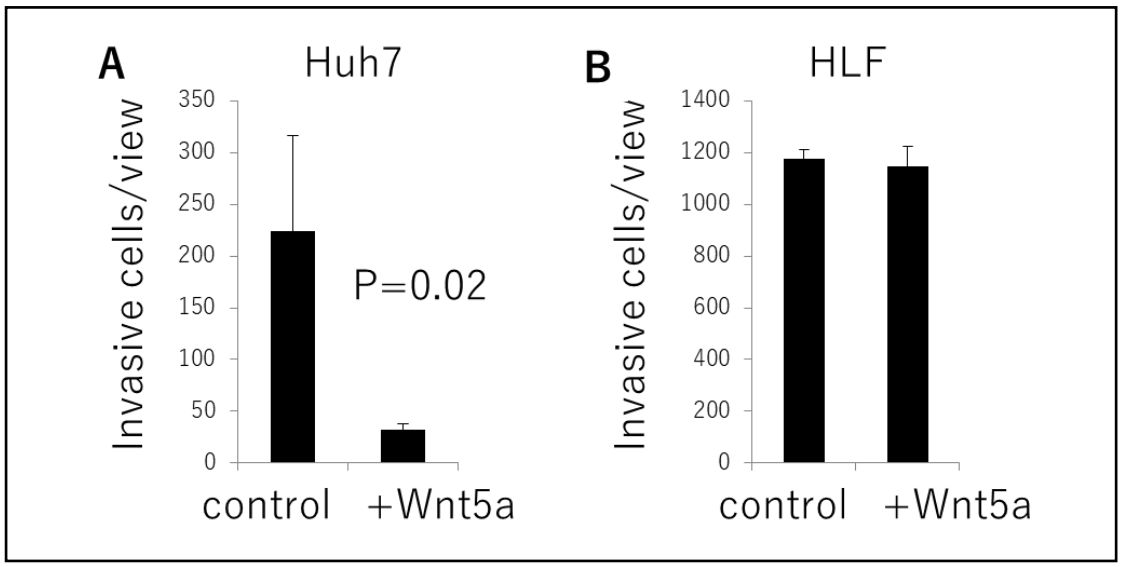

図 20　rWnt5a タンパクを用いた治療実験における肝癌細胞株の浸潤能の変化。A:Huh7 において rWnt5a 添加により有意に浸潤能の低下を認めた。B:HLF では増殖能に変化を認めなかった。

【考察】

本研究では肝細胞癌においてWnt5a細胞膜陰性が低分化、脈管侵襲と相関があり、独立した予後不良因子であった。また、免疫染色においてWnt5aの発現は細胞質よりも細胞膜への発現がより予後に対して有意な因子であった。また、再発症例においてWnt5a細胞膜陰性群と陽性群は再発形式や再発後の治療に差がないにもかかわらず、再発後の全生存はWnt5a陰性で優位に予後不良であった。Wnt5aの受容体であるROR2の発現とWnt5aの細胞質発現に相関を認め、ROR2の発現とAFP値、分化度に相関を認めたが、予後については関連が認められなかった。さらに細胞株を用いた検討では、高分化の細胞株であるHuh7においてWnt5aが高発現で、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、Eカドヘリンが低下した。また、低分化の細胞株であるHLFにおいてWnt5aが低発現で、Wnt5aの強制発現により浸潤能の低下が認められ、Vimentinが低下した。HLFにおいては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、これらの機序により浸潤能が抑制されると考えられた。以上より肝細胞癌においてWnt5aはEMTの抑制を介した腫瘍抑制因子であると考えられた。さらに、rWnt5a投与により腫瘍の浸潤能は抑制され、肝細胞癌の治療として有用である可能性が示唆された。

臨床検体の免疫染色の評価の方法として、これまでの報告では肝細胞癌以外の腫瘍における検討において、細胞質の染色性で評価が行われていた(Kim et al., 2015; Prgomet et al., 2017; Zhong et al., 2016)。本研究では免疫染色を行った過程で、細胞膜に特に強く染色される症例が存在し、これに着目して検討を行ったところ、細胞質よりも細胞膜への発現の方がより有意な因子である結果であった。そしてこれが意味することはWntシグナル伝達経路の機序から考えて、細胞膜の受容体に結合したWnt5aをみている、すなわちβカテニン非依存性経路がより活性化されている状態なのではないかと推測した。そこで、Wnt5aの受容体に着目して、そのひとつであるROR2も同様に免疫染色で検討を行ったところ、ROR2とWnt5aの細胞質発現の相関を認めたものの、ROR2自体は予後因子としては有意なものではなかった。これまでの報告では、Wnt5aの受容体としてROR2が最も関連が強いとされているが(Asem et al., 2016)(Yu et al., 2016)(Dai et al., 2017)、背景で述べたようにWnt5aの受容体は他にもFrz、LRP、Rykがあり(Asem et al., 2016)、肝細胞癌においてはROR2以外の受容体がβカテニン非依存性経路に強く関わっている可能性が考えられた。

Wnt5a の細胞膜発現と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、無再発生存については両群に有意差を認めなかった。全生存と無再発生存がこのようなパターンをとることは稀であると思われる。この理由について明らかにするために、再発形式や再発後の治療について検討を行ったが、これらについて両群で差は認めなかった。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、すなわち慢性肝炎や肝硬変など肝細胞癌の発生素因を有する残肝からの再発の頻度が高いと考えられており(Feo and Pascale, 2015; Tsuji et al., 2013; Yang et al., 2017)、初発の肝細胞癌の悪性度に関わらず、再発の頻度は高いと考えられる。これにより、両群の無再発生存の差は打ち消されたのではないかと考えられた。一方で、再発後の全生存に関しても、再発後の治療に両群で差がないにも関わらず、Wnt5a 細胞膜陰性が陽性よりも予後不良であり、Wnt5a の悪性度がより低いため、治療に対しての反応が良好であったことが示唆された。

以上のことから Wnt5a の細胞膜発現と肝細胞癌の悪性度に関連があると考えられ、その機序を解明するために細胞株を用いた検討を行った。はじめに肝癌細胞株毎の Wnt5a タンパクの発現をウエスタンブロットにて検討し、低分化の細胞株で発現が低く、高分化の細胞株で発現が高いことが分かった。この結果は、臨床検体を用いた検討において Wnt5a の細胞膜発現と高分化に相関があったという結果と合致していると考えられる。次に Wnt5a による細胞の悪性度の変化を検討するため、Wnt5a が高発現である Huh7 と低発現である HLF にそれぞれ Wnt5a のノックダウンと強制発現を行い、それぞれの増殖能と浸潤能の変化を検討した。この結果、Huh7 では増殖能と浸潤能が増加し、HLF では浸潤能が低下し、Wnt5a が肝細胞癌株においては抑制的に作用することが示唆された。これまでの報告では Huh7 における Wnt5a の強制発現により、増殖能が抑制されたという研究があり(Bi et al., 2014)、本研究の結果も Wnt5a が腫瘍に対して抑制的に作用するという点において同様の結果であると考えられる。

本研究における臨床検体を用いた検討では Wnt5a の細胞膜発現と脈管侵襲に相関があり、細胞株を用いた検討においても Wnt5a が肝癌細胞株の浸潤能を低下させた。Wnt5a は Wnt シグナル伝達経路において、βカテニン非依存性経路を介して細胞骨格や細胞運動に関わるとされている(Asem et al., 2016)。以上のことから Wnt5a が腫瘍を抑制する機序としてはβカテニン非依存性経路を活性化することで、細胞骨格や細胞運動が変化し、特に細胞の浸潤能を低下させているのではないかと考えた。癌細胞の浸潤の機序の一つとして EMT が報告されており(Jolly and Celià-Terrassa, 2019; Lamouille et al., 2014; Markopoulos et al., 2019)、Wnt5a が EMT の抑制を介して肝癌細胞株の浸潤能を抑制しているのではないかと考え、EMT 関連分子の変化を検討した。Wnt5 と

EMT の関連についての報告は、他の癌腫の細胞株において報告があるが(Qin et al., 2015; Xue et al., 2019)、肝細胞癌については報告がない。大腸癌細胞株における検討では、Wnt5a の過剰発現にて E カドヘリンの発現が増加し、ビメンチンの発現が低下した。さらに、EMT を促進する転写因子である ZEB1、TWIST の発現が低下したという報告がある(Cheng et al., 2014)。ウエスタンブロットによる本研究では HLF においては Wnt5a の強制発現で E カドヘリンの発現の上昇は認めなかったものの、ビメンチンの発現は低下した。さらに、Huh7 においては Wnt5a のノックダウンで間葉系マーカーの変化は認めなかったものの、E カドヘリンの発現が低下した。また、mRNA マイクロアレイ解析による EMT 関連転写因子については HLF の Wnt5a 強制発現において SNAI2、SNAI3 の発現が低下した。これらの EMT 関連因子、転写因子の発現の変化は肝細胞癌において Wnt5a が EMT の抑制を介して細胞の浸潤能を抑制していると考えられた。EMT 以外の細胞浸潤に関わる機序の一つとして、MMP が細胞外器質の分解を促進し、細胞の浸潤を促進することが報告されており、特に MMP2 や MMP9 が細胞浸潤に関与するとされている(Egeblad and Werb, 2002)。今回の検討においても MMP2 や MMP9 を含めた MMP の発現低下が認められ、Wnt5a による浸潤能の変化に EMT の他に MMP も関与している可能性が示唆された。

前述の通り、Wnt5a は細胞外分泌タンパクであり、細胞から分泌された Wnt5a は自己分泌もしくは傍分泌の形式で細胞膜の受容体に結合し、βカテニン非依存性経路を活性化させる(Asem et al., 2016)。以上の検討から、Wnt5a が腫瘍抑制因子であると考えられ、外因性の Wnt5a タンパクにより、腫瘍の抑制が可能ではないかと考え、rWnt5a タンパクによる治療実験を行った。この結果、Huh7 においては腫瘍の増殖能および浸潤能の低下が認められた。この結果は rWnt5a タンパクが肝細胞癌の治療に有用である可能性を示唆するものであると考えられる。しかし、HLF の Wnt5a 強制発現株では浸潤能に変化を認めたにも関わらず、治療実験では変化がなく、これに関しては添加した rWnt5a タンパクの濃度が関与している可能性がある。これまで肝細胞癌以外の癌腫の細胞株において rWnt5a タンパク添加による変化が報告されており、いずれの報告においても 0.4μg/ml 以上で細胞機能の変化が認められている(Dejmek et al., 2005; Prasad et al., 2016; Qin et al., 2015)。これに従い、本研究では rWnt5a タンパクの濃度を 1.0μg/ml として実験を行ったが、これが HLF にとっては適切な濃度ではなかった可能性があり、さらに検討をする必要があると考えられる。

本研究における問題点は、Wnt5a の受容体について十分に検討できていない点である。細胞株における ROR2 の発現も臨床検体を用いた検討と同様の傾向であり、低分化の細胞株で発現がなく、高分化で発現が認められた。このこと

からROR2の発現がないHLFではWnt5aの強制発現により、細胞機能に変化を認めない可能性が予想されたが、実際には細胞の浸潤能が変化し、EMT関連分子やMMPの変化を認めた。この結果はWnt5aによる細胞の浸潤能の制御には、ROR2以外の受容体がより強く関与している可能性があることを示唆している。今回の検討ではROR2以外の受容体について検討は行っておらず、今後の検討課題であると考えられる。さらに、JNKやROCK、Calmodulinなどのβカテニン非依存性経路に関わる分子の変化は検討しておらず、Wnt5aがどのようなシグナル伝達でEMTやMMPの変化を生じさせるのかについては明らかにはされておらず、これに関しても今後の検討課題である。また、rWnt5aタンパクによる治療実験については現段階ではその効果は限定的であり、前述の通り濃度を含めてさらに検討が必要であることに加え、臨床への応用のためにはin vivoでの検討が必要であると考えられる。

本研究では肝細胞癌においてWnt5a陰性が低分化、脈管侵襲と相関があり、独立した予後不良因子であることがわかり、Wnt5aの発現が予後についてのバイオマーカーとなる可能性が示唆された。また、Wnt5aがEMTやMMPの変化を介して細胞の浸潤能を抑制する腫瘍抑制因子であり、βカテニン非依存性経路への介入が肝細胞癌治療の治療に有用である可能性が示唆された。

【結論】

・肝細胞癌において Wnt5a 陰性が低分化、脈管侵襲と相関があり、独立した予後不良因子であった。

・免疫染色において Wnt5a の発現は細胞質よりも細胞膜への発現がより予後に対して有意な因子であった。

・高分化の細胞株である Huh7 において Wnt5a が高発現で、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、E カドヘリンが低下した。

・低分化の細胞株である HLF において Wnt5a が低発現で、Wnt5a の強制発現により浸潤能の低下が認められ、Vimentin が低下した。

・HLF においては 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。

・Huh7 において rWnt5a タンパクの添加により細胞の増殖能、浸潤能が低下した。

以上の知見により Wnt5a は肝細胞癌において EMT の抑制を介した腫瘍抑制因子であると考えられ、バイオマーカーとしての意義があり、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が期待される。

【謝辞】

稿を終えるにあたり、研究のご指導を頂きました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅰ武冨紹信教授、神山俊哉准教授に深く謝意を表します。また、貴重なご助言と技術的なご指導を賜りました同教室の皆様に厚く御礼申し上げます。本研究に同意を頂き、ご協力頂きました患者様に深く感謝申し上げます。本研究はAMEDの課題番号JP19fk0310111とJP19fk0210041、大鵬薬品学術研究助成の支援を受けた。

【利益相反】

開示すべき利益相反状態はない。

【引用文献】

Asem, M.S., Buechler, S., Wates, R.B., Miller, D.L., and Stack, M.S. (2016). Wnt5a signaling in cancer. Cancers (Basel). *8*, 79.

Bi, L., Liu, X., Wang, C., Cao, Y., Mao, R., Li, P., and Geng, M. (2014). Wnt5a involved in regulation of the biological behavior of hepatocellular carcinoma. Int. J. Clin. Exp. Pathol. *7*, 987-995.

Cheng, R., Sun, B., Liu, Z., Zhao, X., Qi, L., Li, Y., and Gu, Q. (2014). Wnt5a suppresses colon cancer by inhibiting cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition. J. Cell. Physiol. *229*, 1908-1917.

Dai, B., Yan, T., and Zhang, A. (2017). ROR2 receptor promotes the migration of osteosarcoma cells in response to Wnt5a. Cancer Cell Int. *17*, 1-9.

Dejmek, J., Dejmek, A., Säfholm, A., Sjölander, A., and Andersson, T. (2005). Wnt-5a protein expression in primary Dukes B colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis. Cancer Res. *65*, 9142-9146.

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer *2*, 161-174.

Feo, F., and Pascale, R.M. (2015). Multifocal hepatocellular carcinoma: Intrahepatic metastasis or multicentric carcinogenesis? Ann. Transl. Med. *3*, 1-5.

Galle, P.R., Forner, A., Llovet, J.M., Mazzaferro, V., Piscaglia, F., Raoul, J.L., Schirmacher, P., and Vilgrain, V. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. J. Hepatol. *69*, 182-236.

Geng, M., Cao, Y.C., Chen, Y.J., Jiang, H., Bi, L.Q., and Liu, X.H.

(2012). Loss of Wnt5a and Ror2 protein in hepatocellular carcinoma associated with poor prognosis. World J. Gastroenterol. *18*, 1328-1338.

Huynh, K.T., Van Zuylen, W.J., Ford, C.E., and Rawlinson, W.D. (2019). Selective modulation of wnt-binding receptor tyrosine kinase ROR2 expression by human cytomegalovirus regulates trophoblast migration. J. Gen. Virol. *100*, 99-104.

Jin, F., Qu, X., Fan, Q., Wang, L., Tang, T., Hao, Y., and Dai, K. (2013). Regulation of prostate cancer cell migration toward bone marrow stromal cell-conditioned medium by Wnt5a signaling. Mol. Med. Rep. *8*, 1486-1492.

Jolly, and Celià-Terrassa (2019). Dynamics of Phenotypic Heterogeneity during EMT and Stemness in Cancer Progression. J. Clin. Med. *8*, 1542.

Kamiyama, T., Nakanishi, K., Yokoo, H., Kamachi, H., Tahara, M., Suzuki, T., Shimamura, T., Furukawa, H., Matsushita, M., and Todo, S. (2009). Recurrence patterns after hepatectomy of hepatocellular carcinoma: Implication of Milan criteria utilization. Ann. Surg. Oncol. *16*, 1560-1571.

Kanzawa, M., Semba, S., Hara, S., Itoh, T., and Yokozaki, H. (2013). WNT5A is a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human gastric carcinoma cells. Pathobiology *80*, 235-244.

Kim, Y., Hong, M., Do, I.G., Ha, S.Y., Lee, D., and Suh, Y.L. (2015). Wnt5a, Ryk and Ror2 expression in glioblastoma subgroups. Pathol. Res. Pract. *211*, 963-972.

Kremenevskaja, N., Von Wasielewski, R., Rao, A.S., Schöfl, C., Andersson, T., and Brabant, G. (2005). Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. Oncogene *24*, 2144-2154.

Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of

epithelial-mesenchymal transition. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 178-196.

Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). the Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *20*, 781-810.

Markopoulos, G.S., Roupakia, E., Marcu, K.B., and Kolettas, E. (2019). Epigenetic Regulation of Inflammatory Cytokine-Induced Epithelial-To-Mesenchymal Cell Transition and Cancer Stem Cell Generation. Cells *8*, 1143.

Nusse, R., and Clevers, H. (2017). Wnt/β-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. Cell *169*, 985-999.

Prasad, C.P., Chaurasiya, S.K., Guilmain, W., and Andersson, T. (2016). WNT5A signaling impairs breast cancer cell migration and invasion via mechanisms independent of the epithelial-mesenchymal transition. J. Exp. Clin. Cancer Res. *35*, 1-15.

Prgomet, Z., Andersson, T., and Lindberg, P. (2017). Higher expression of WNT5A protein in oral squamous cell carcinoma compared with dysplasia and oral mucosa with a normal appearance. Eur. J. Oral Sci. *125*, 237-246.

Qin, L., Yin, Y.T., Zheng, F.J., Peng, L.X., Yang, C.F., Bao, Y.N., Liang, Y.Y., Li, X.J., Xiang, Y.Q., Sun, R., et al. (2015). WNT5A promotes stemness characteristics in nasopharyngeal carcinoma cells leading to metastasis and tumorigenesis. Oncotarget *6*, 10239-10252.

The Liver Cancer Study Group of Japan (2015). The General Rules for the Clinical and Pathological Study of Primary Liver Cancer (Tokyo: KANEHARA & Co., LTD.).

Tsuji, N., Ishiguro, S., Sasaki, Y., and Kudo, M. (2013). CD34 expression in noncancerous liver tissue predicts multicentric recurrence of hepatocellular carcinoma. Dig. Dis. *31*, 467-471.

Wang, B., Tang, Z., Gong, H., Zhu, L., and Liu, X. (2017). Wnt5a promotes epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in non-small-cell lung cancer. Biosci. Rep. *37*, BSR20171092.

Weeraratna, A.T., Jiang, Y., Hostetter, G., Rosenblatt, K., Duray, P., Bittner, M., and Trent, J.M. (2002). Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. Cancer Cell *1*, 279-288.

Wend, P., Holland, J.D., Ziebold, U., and Birchmeier, W. (2013). Wnt signaling in stem and cancer stem cells. Curr. Opin. Cell Biol. *25*, 254-264.

Wu, X., Yan, T., Hao, L., and Zhu, Y. (2019). Wnt5a induces ROR1 and ROR2 to activate RhoA in esophageal squamous cell carcinoma cells. Cancer Manag. Res. *11*, 2803-2815.

Xue, Y., Zhang, L., Zhu, Y., Ke, X., Wang, Q., and Min, H. (2019). Regulation of proliferation and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of gastric cancer by ZEB1 via modulating Wnt5a and related mechanisms. Med. Sci. Monit. *25*, 1663-1670.

Yang, S. lan, Luo, Y. ying, Chen, M., Zhou, Y. ping, Lu, F. rong, Deng, D. fang, and Wu, Y. ran (2017). A systematic review and meta-analysis comparing the prognosis of multicentric occurrence and vs. intrahepatic metastasis in patients with recurrent hepatocellular carcinoma after hepatectomy. Hpb *19*, 835-842.

Yu, J., Chen, L., Cui, B., Widhopf, G.F., Shen, Z., Wu, R., Zhang, L., Zhang, S., Briggs, S.P., and Kipps, T.J. (2016). Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. J. Clin. Invest. *126*, 585-598.

Zhong, Z., Shan, M., Wang, J., Liu, T., Shi, Q., and Pang, D. (2016). Decreased Wnt5a Expression is a Poor Prognostic Factor in Triple-

Negative Breast Cancer. Med. Sci. Monit. *22*, 1-7.

Zhou, Y., Kipps, T.J., and Zhang, S. (2017). Wnt5a Signaling in Normal and Cancer Stem Cells. Stem Cells Int. *2017*, 5295286.