



Title	肝細胞癌における癌微小環境を構成する癌関連線維芽細胞に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	加藤, 紘一
Description	配架番号 : 2754
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15436号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89883
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KATO_Koichi_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 加藤 紘一

学位論文題名

肝細胞癌における癌微小環境を構成する癌関連線維芽細胞に関する研究
(Studies on cancer-associated fibroblasts that constitute the tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma)

【背景と目的】肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma; HCC) は、原発性肝悪性腫瘍のうち 90% を占め、原因としてウイルス性肝炎やアルコール性肝炎がある。近年、新規抗ウイルス薬の登場でウイルス性肝炎からの発癌は少なくなっているものの、メタボリック症候群や肥満でみられる非アルコール性脂肪性肝疾患に伴う発癌が増えている。また HCC の根治治療として外科的切除があるが、根治手術をしても 5 年以内に約 70% が再発するとされ、他のがん腫と比べても再発率が高く予後不良な疾患であることが社会的問題である。有効な抗がん剤が少なかったが、最近では癌細胞ではなくがん微小環境内の T リンパ球を標的としたアテゾリマブ+ベバシズマブ療法が、これまでの分子標的薬に比べて効果が高く注目されている。

近年がんの増殖・転移などの悪性化や治療抵抗性には、がん細胞そのものが有する遺伝的もしくはゲノムの後成的変化等の内因性因子だけではなく、がん微小環境内の間質細胞との細胞間相互作用が影響されていることがわかってきた。特にがん微小環境内にある線維芽細胞は癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts; CAFs) と呼ばれ、がん細胞と相互作用しさまざまなサイトカインや成長因子などを産生し、がん細胞の増殖・浸潤や治療抵抗性に影響を与えると報告がある。しかし、HCC での CAFs の報告は少なく、HCC での CAFs の詳細な機能は不明である。

本研究では、がん細胞と CAFs との相互作用を制御することによりがん悪性度の増強を阻害できると仮説を立てた。CAFs ががん悪性度を増強させる責任分子を探索し、発現制御することにより悪性度増強が阻害できることを明らかにすることを本研究の目的とした。

【対象と方法】

- 1) 初代培養細胞の作成・機能解析：初代培養細胞の作成は北海道大学病院で外科的切除された HCC22 検体で試みた。癌部組織より CAFs、同一患者の癌辺縁より 5cm 以上離れた非癌部組織より非癌部線維芽細胞 (Non-cancerous fibroblasts; NFs) を初代培養した。CAFs と NFs の馴化培地 (Conditioned medium; CM) を作成し、2 種類の肝癌細胞株 (HuH-7, HLF) に添加することで、肝癌細胞株の癌増殖能・遊走能・浸潤能を評価した。
- 2) 網羅的プロテオーム解析：同一患者から初代培養した CAFs と NFs の 3 ペアを用いて、液体クロマトグラフ質量分析 (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry; LC-MS/MS) をおこない、CAFs で高発現しているタンパク質を探索した。
- 3) 免疫組織化学染色：HCC 患者 239 例の手術検体の Tissue microarray を用い、CAFs で発現亢進していた Versican (VCAN) の免疫染色をおこなった。間質と上皮の VCAN の発現をそれぞれ

れ評価し、臨床病理学的因子・生存期間との関連について統計学的に解析した。

- 4) HCC が CAFs に与える影響：共培養 Dish を用いて、96 時間培養することで CAFs の CAFs マーカー・VCAN の発現の変化を評価した。
- 5) CAFs における VCAN の機能解析：CAFs を用いて、VCAN の small interfering RNA (siRNA) によるノックダウンをおこない、VCAN の癌増殖能・遊走能・浸潤能における変化を評価した。

【結果】

- 1) 初代培養細胞の作成・機能解析：CAFs で 5/18 例 (27.8%)、NFs で 11/16 例 (68.8%) の初代培養細胞を作成した。CAFs と NFs を比較すると、共に紡錘形の細胞で形態学的に差を認めなかった。qPCR では既存の報告の同じく CAFs で活性化線維芽細胞のマーカーである α -SMA・FAP の発現が高かった。それぞれの CM を肝癌細胞株に添加すると、HuH-7 と HLF の両方で NFs の CM 群に比べて CAFs の CM 群で増殖能・浸潤能・遊走能が有意に亢進した。
- 2) 網羅的プロテオーム解析：LC-MS/MS を用いて CAFs と NFs を比較し $P < 0.01$ のタンパク質を抽出した。CAFs で高発現しているタンパク質 35 個、低発現しているタンパク質 56 個を同定した。そのうち分泌タンパク質である VCAN をがん悪性度に関与する CAFs 特異的タンパク質として選定した。
- 3) 免疫組織化学染色：HCC 患者 239 例で間質と上皮の VCAN の発現をそれぞれ評価し、発現強度を高発現群と低発現群に分類した。間質部において VCAN 高発現群は 79 例 (33.1%)、低発現群は 160 例 (66.9%) で、上皮において VCAN 高発現群は 58 例 (24.3%)、低発現群は 181 例 (75.7%) であった。臨床病理学的に間質 VCAN 高発現群は低分化癌・脈管侵襲陽性が有意に多かったが、上皮 VCAN の発現差では有意な臨床病理学的因子は認めなかった。生存時間解析では間質 VCAN 高発現群は再発率が高く、予後不良であった。上皮 VCAN の発現では生存時間解析では明らかな有意差を認めなかった。多変量解析では間質 VCAN 高発現は独立した予後予測因子であった。
- 4) HCC が CAFs に与える影響：分化型の細胞株である HuH-7 との共培養では CAFs マーカー・VCAN の発現は明らかな有意差を認めなかった。低分化型の細胞株である HLF との共培養では CAFs マーカーおよび VCAN は有意な発現上昇した。
- 5) CAFs における VCAN の機能解析：CAFs の VCAN をノックダウンすることで、HuH-7 と HLF の両方で有意に遊走能・浸潤能が低下した。増殖能に関しては、HuH-7 では有意に低下したが、HLF では有意差を認めなかった。

【考察】本研究は、HCC における CAFs の CM にはがん細胞の悪性を促進している液性因子が含まれていること、CAFs では NFs と比較すると VCAN が高発現していることを示した。また、臨床検体を用いた予後解析から、HCC における間質 VCAN 高発現は独立した予後不良因子であったが、上皮 VCAN 高発現は予後を規定しなかった。細胞実験において CAFs の VCAN ノックダウンすることでがん細胞の遊走能・浸潤能が低下した。また、臨床病理学的因子の検討でも間質 VCAN 高発現群は脈管侵襲陽性例が有意に多かった。このことは CAFs から分泌される VCAN が癌細胞の遊走能・浸潤能を亢進し予後不良につながる可能性が示唆された。本研究の結果から、更なる機序の解明は必要であるが HCC において VCAN は治療標的の一つとなり、特に低分化癌や脈管侵襲陽性例において治療効果が期待されると考えられた。

【結論】

HCC の CAFs では VCAN は高発現しており、独立した予後予測因子であることを示した。さらに、CAFs から分泌される VCAN はがん細胞の遊走能・浸潤能を亢進させることが示された。この結果から、HCC において VCAN は治療標的分子として期待できる。