



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
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
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15436">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15436</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/89974">https://hdl.handle.net/2115/89974</a>
Type	doctoral thesis
File Information	KATO_Koichi.pdf



# 学 位 論 文

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)

2023年3月

北 海 道 大 学

加 藤 紘 一

Koichi Kato



# 学 位 論 文

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)

2023年3月

北 海 道 大 学

加 藤 紘 一

Koichi Kato

## 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	7 頁
方法	12 頁
結果	27 頁
考察	49 頁
結論	53 頁
謝辞	54 頁
利益相反	55 頁
引用文献	56 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

1. Koichi Kato, Moto Fukai, Kanako C. Hatanaka, Akira Takasawa, Tomoyuki Aoyama, Takahiro Hayasaka, Yoshihiro Matsuno, Toshiya Kamiyama, Yutaka Hatanaka, Akinobu Taketomi  
Versican secreted by cancer-associated fibroblasts is a poor prognostic factor in hepatocellular carcinoma  
Ann Surg Oncol. 2022 Oct;29(11):7135-7146. doi: 10.1245/s10434-022-11862-0. Epub 2022 May 11. PMID: 35543908

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 加藤紘一、深井原、柴田賢吾、小林希、早坂孝宏、神山俊哉、武富紹信  
肝細胞癌における癌関連線維芽細胞と癌細胞の相互作用の検討  
第120回 日本外科学会定期学術集会、2020年8月13-15日、横浜
2. 加藤紘一、深井原、小林希、早坂孝宏、神山俊哉、武富紹信  
網羅的プロテオーム解析を用いた肝細胞癌微小環境における新規治療ターゲットの探索  
第29回 日本癌病態治療研究会、2021年1月14-15日、高崎
3. 加藤紘一、深井原、坂本譲、旭火華、長津明久、折茂達也、柿坂達彦、蒲池浩文  
神山俊哉、武富紹信  
肝細胞癌における間質Versicanの発現と予後に関する検討  
第121回 日本外科学会定期学術集会、2021年4月8-10日、千葉

## 要 旨

### 【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、他の癌種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。有効な抗癌剤が少なかったが、最近では癌細胞ではなく癌微小環境内の 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。

近年癌の増殖・転移などの悪性化や治療抵抗性には、癌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、癌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。特に癌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、癌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、癌細胞の増殖・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、癌細胞と CAFs との相互作用を制御することにより癌悪性度の増強を阻害できると仮説を立てた。CAFs が癌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) 初代培養細胞の作製・機能解析：初代培養細胞の作製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) を作製し、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、CAF<sub>s</sub> 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 CAF<sub>s</sub> に与える影響 : 共培養 Dish を用いて、96 時間培養することで CAF<sub>s</sub> の CAF<sub>s</sub> マーカー・VCAN の発現の変化を評価した。
- 5) CAF<sub>s</sub> における VCAN の機能解析 : CAF<sub>s</sub> 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) 初代培養細胞の作製・機能解析 : CAF<sub>s</sub> で 5/18 例 (27.8%)、NF<sub>s</sub> で 11/16 例 (68.8%) の初代培養細胞を作製した。
- 2) CAF<sub>s</sub> と NF<sub>s</sub> 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。Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) では既存の報告の同じく CAF<sub>s</sub> で活性化線維芽細胞のマーカーである  $\alpha$ -SMA と 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 NF<sub>s</sub> の CM 群に比べて CAF<sub>s</sub> の CM 群で増殖能・浸潤能・遊走能が有意に亢進した。
- 3) 網羅的プロテオーム解析 : LC-MS/MS を用いて CAF<sub>s</sub> と NF<sub>s</sub> を比較し  $P < 0.01$  のタンパク質を抽出した。CAF<sub>s</sub> 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 を癌悪性度に関与する CAF<sub>s</sub> 特異的タンパク質の候補として選定した。
- 4) 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、
- 5) HCC が CAF<sub>s</sub> 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 CAF<sub>s</sub> 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 CAF<sub>s</sub> マーカーおよび VCAN は有意な発現上昇した。
- 6) CAF<sub>s</sub> における VCAN の機能解析 : CAF<sub>s</sub> 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 には癌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。

細胞実験において CAFs の VCAN ノックダウンすることで癌細胞の遊走能・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 は癌細胞の遊走能・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。

## 略 語 表

本文中および図表に記載した略語は以下の通りである。

(50 音順)

AFP	alpha fetoprotein
CAFs	cancer-associated fibroblasts
CCK-8	Cell Counting Kit-8
cDNA	complementary DNA
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DFS	disease-free survival
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	deoxyribonucleic acid
ECM	extracellular matrix
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAP	fibroblast activation protein
FBS	fetal bovine serum
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
HBV	hepatitis B virus
HCC	hepatocellular carcinoma
HCV	hepatitis C virus
JCRB	Japanese Collection of Research Bioresources
LC-MS/MS	Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry
mRNA	messenger RNA
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
NBNC	non-B non-C
NC	negative control
NFs	noncancerous fibroblasts
OS	overall survival
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PIVKA-II	protein induced vitamin K absence or antagonist-II
PVDF	polyvinylidene difluoride
qPCR	quantitative PCR

RFS	relapse-free survival
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SE	standard error
siRNA	small interfering RNA
TBS-T	tris-buffered saline with Tween 20
THBS2	thrombospondin 2
UICC	Union for International Cancer Control
VCAN	versican core protein
WB	western blotting
$\alpha$ -SMA	alpha-smooth muscle actin

## 緒 言

### 1. 肝細胞癌の疫学

世界保健機関の付属組織である国際癌研究機関の GLOBOCAN 2018 の集計によれば、原発性肝癌の罹患者数は 841,000 人と全癌の中で第 6 位 (4.7%) である。また、死亡者数は 782,000 人と第 3 位 (8.2%) と罹患者数に対する死亡率が高く、全癌の中でも予後不良疾患の一つである。特に男性においては、女性に比べると罹患者率と死亡率ともに 2-3 倍高く、男性の死亡原因の第 2 位の癌である (Bray et al., 2018)。

(図 1)

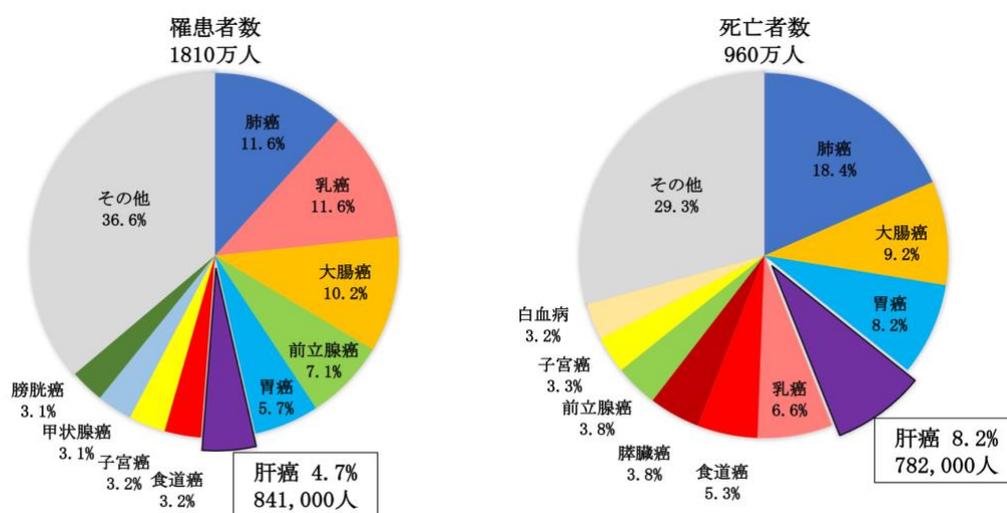


図 1 世界における癌の罹患者数と死亡者数の統計

原発性肝癌の新規罹患者は 841,000 人 (4.7%) と全癌種の中で第 6 位。また、新規死亡者数は 782,000 人 (8.2%) と全癌種の中で第 3 位である。 (Bray et al., 2018) より引用、一部改変

世界では肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) は原発性肝癌のうち約 90% と頻度が多い (European Association for the Study of the Liver. Electronic address and European Association for the Study of the, 2018)。本邦では 93.3% と大部分が HCC である。HCC の危険因子としては B 型肝炎 (Hepatitis B virus, HBV) や C 型肝炎 (Hepatitis C virus, HCV) などのウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、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

(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) など、慢性炎症が HCC の発癌に大きく関与している。本邦では HCV からの発癌が多く占められている。しかし、近年では HCV に対する直接作用型抗ウイルス薬の登場などの肝炎ウイルス治療薬の進歩により、ウイルス性肝炎からの HCC 患者は減少傾向である (Ioannou et al., 2017)。その

一方で、NAFLD を含む非ウイルス性の慢性肝疾患を背景とした HCC が増えており、今後 HCC の主要な原因になることが見込まれる (Said and Ghufuran, 2017; Tateishi et al., 2019)。 (図 2)

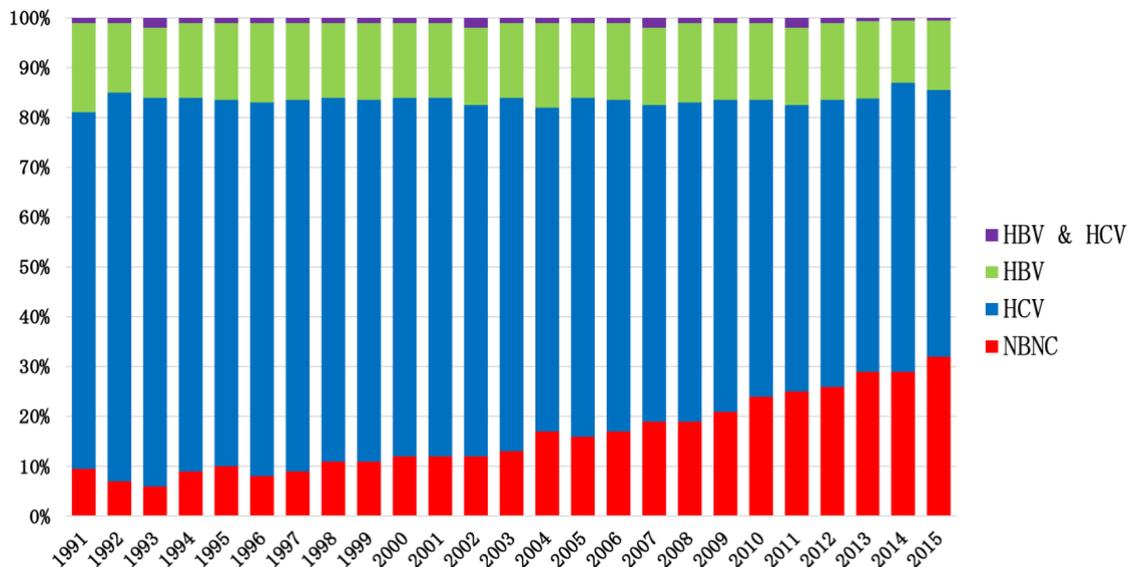


図 2 本邦における肝細胞癌の背景肝疾患の推移

C 型肝炎患者の割合が低下している一方で、非ウイルス性の患者が増加している。(Tateishi et al., 2019) より引用、一部改変

## 2. 肝細胞癌の治療・予後

本邦の HCC の治療は、肝障害度、腫瘍数、腫瘍径、転移の有無によって、手術療法、焼灼療法、塞栓療法、化学療法、肝移植、緩和ケアに決められる。限局した HCC の場合、肝臓切除やラジオ波焼灼療法・肝動脈化学塞栓療法が選択される。しかし、根治手術をしたとしても、HCC は 5 年以内に約 70% が再発するとされ、他の癌種と比べても再発率は高い (Kamiyama et al., 2009; Tabrizian et al., 2015)。局所療法ができない進行した HCC では化学療法が選択されるが、肝細胞癌は化学療法抵抗性の高い腫瘍の一つとして認識されている (European Association for the Study of the Liver. Electronic address and European Association for the Study of the, 2018)。生存期間中央値は手術療法で 96.9 ヶ月、焼灼療法で 81.4 ヶ月、塞栓療法で 46.1 ヶ月であるが、化学療法では 6.5 から 13.6 ヶ月と他の治療に比べても予後が不良である (Cheng et al., 2009; Kudo et al., 2018; Llovet et al., 2008)。しかし、最近では癌細胞ではなく癌微小環境内の 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 (Finn et al., 2020)。HCC の生命予後改善には癌微小環境内の進展のメカニズムの解明と治療標的となる分子を探索することが重要である。

### 3. 癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts; CAFs)

癌組織は、癌細胞だけではなく、線維芽細胞、リンパ球、マクロファージ、血管内皮細胞、細胞外マトリックス (Extracellular matrix; ECM) などの癌細胞をとりまく様々な細胞を認め、これらによって癌微小環境が構築されている (Liu et al., 2019)。癌の増殖・転移などの悪性化や治療抵抗性には、癌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、癌細胞の周囲をとりまく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 (Quail and Joyce, 2013)。間質細胞のなかでも線維芽細胞は、癌組織を充填する重要な細胞で CAFs と呼ばれている (Hanahan and Coussens, 2012)。

CAFs の起源は現時点では完全に解明されていないが、癌微小環境の確立と維持において重要な役割を担っている。CAFs は癌細胞に様々なサイトカインや成長因子を産生し、癌細胞の増殖・浸潤・転移を促進させる (Ishii et al., 2016; Kalluri and Zeisberg, 2006)。また、CAFs から分泌されるサイトカインは癌細胞だけではなく免疫細胞にも作用し、癌が発育するのに有利な免疫微小環境を整える (Mhaidly and Mehta-Grigoriou, 2020)。CAFs から分泌される ECM によって、癌微小環境内の ECM のリモデリングがおこなわれ、化学療法抵抗性にも関与する (Liu et al., 2019; Petersen et al., 2020; Pickup et al., 2014)。これらの報告のように、CAFs が癌の進展に直接的または間接的に働いているということは明白である (図 3)。

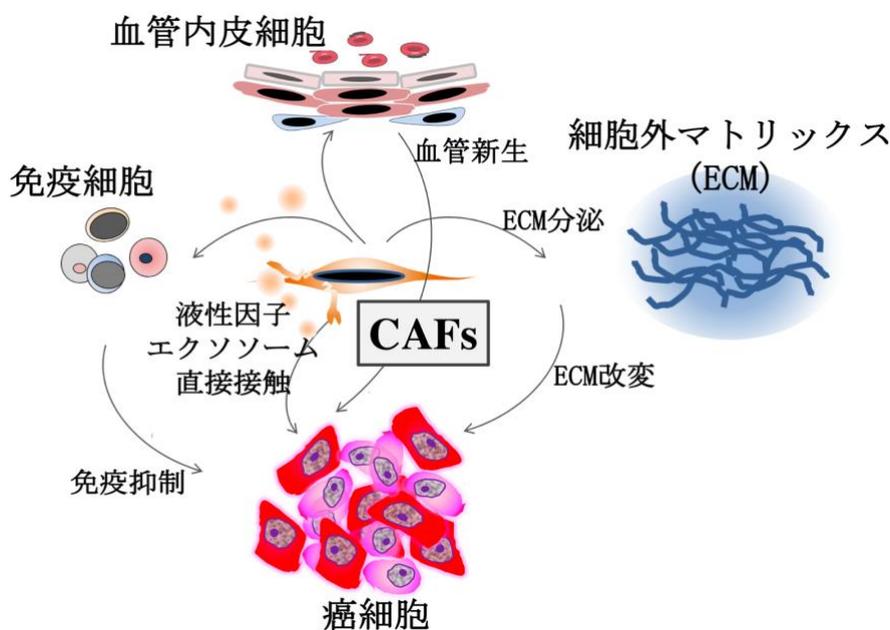


図 3 癌微小環境内での CAFs の相互作用

CAFs は癌細胞への液性分子などの直接接触を介して、癌細胞の増殖と浸潤に影響を与える。また、CAFs は他の間質細胞にも作用し間接的に癌細胞に影響を与える。(Ishii et al., 2016)より引用、一部改変

既報では CAFs のマーカーとして  $\alpha$ -smooth muscle action ( $\alpha$ -SMA)、fibroblast activated protein (FAP)、fibroblast specific protein (S100A4/FSP1)、Integrin  $\beta$ 1 (CD29)、platelet derived growth factor receptor  $\alpha$  or  $\beta$  (PDGFR  $\alpha/\beta$ ) や podoplanin (PDPN) などが報告されている (Ostman, 2017; Park et al., 1999; Sugimoto et al., 2006)。しかし、癌細胞と同様に CAFs 自体も複数の起源細胞が存在し不均一な集団であるとされ、単一の CAFs マーカーの同定が困難である (Sahai et al., 2020)。さらに最近では、癌を促進するとされてきた CAFs の中に、癌を抑制する CAFs の存在するという報告もあり、CAFs 研究を複雑化させている (Mizutani et al., 2019)。それゆえ 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。

#### 4. Versican (VCAN)

VCAN はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの一種であり、臓器の発育に重要な役割を持つとされている (Wight et al., 2020)。プロテオグリカンは ECM の主要な構成成分であり、細胞の動的挙動、骨格形成、細胞間情報伝達などの様々な細胞機能を制御している (Cox, 2021)。VCAN のコアタンパク質は、N 末端の G1 ドメイン、C 末端の G3 ドメイン、2 つのコンドロイチン硫酸鎖結合領域から構成される。2 つのコンドロイチン硫酸鎖結合領域の有無によって V0 から V4 までの 5 つのスプライスバリエーションが存在する (Wight, 2002; Wight et al., 2020)。

VCAN は多くの癌種で発現が観察されており、発現の上昇と予後不良との関連が報告されている (Hanahan and Weinberg, 2011)。VCAN は癌細胞の細胞接着、増殖、アポトーシス、遊走、血管新生、浸潤、転移などの多くの細胞プロセスを制御している (Papadas and Asimakopoulos, 2020)。しかし、癌微小環境における VCAN を分泌する細胞は、癌細胞、間質細胞、骨髄系細胞、リンパ系細胞の少なくとも 4 つあると考えられている (Papadas and Asimakopoulos, 2020)。

膀胱癌 (Said and Theodorescu, 2012)、卵巣癌 (Li et al., 2013)、平滑筋肉腫 (Keire et al., 2014)、肝細胞癌 (Xia et al., 2014)、大腸癌 (Bogels et al., 2012)、神経膠腫 (Hu et al., 2015) では癌細胞の VCAN が癌悪性を促進させたという報告がある。その一方で、乳癌 (Takahashi et al., 2012)、大腸癌 (Chida et al., 2016)、卵巣癌 (Yeung et al., 2013) では間質細胞の VCAN が癌悪性を促進したという報告がある。しかし、癌細胞と間質細胞をそれぞれ検証している報告は少ない。既存の報告に共通していることは、癌組織には VCAN は発現しているが、正常組織にはほとんど発現をしていない点である。しかし、癌組織中の VCAN の多くが癌細胞から分泌されるのか、間質細胞から分泌されるのか、またどちらが予後に関与するのかは不明である。

## 5. 本研究の目的

これまでの抗癌剤治療や研究は癌細胞そのものを標的にしてきたものが多かった。しかし、癌微小環境の解明とともに、免疫チェックポイント阻害薬をはじめ、癌細胞以外の癌微小環境構成細胞を標的とした治療が成果をあげてきた。本研究では、HCCの癌微小環境を構成するCAFsに着目し、癌細胞とCAFsとの相互作用を制御することにより癌悪性度の増強を阻害できると仮説を立てた。HCCのCAFsが癌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。

## 方 法

### 1. 患者

臨床検体の解析においては、HCC 患者由来の肝臓組織を使用した。初代培養細胞の作製は、2018年4月から2019年11月までに北海道大学消化器外科 I で HCC に対して肝切除を施行した 22 症例で実施した。また免疫組織化学染色は、2005年1月から2010年12月までに北海道大学消化器外科 I で HCC に対して肝切除を施行した 265 症例を対象とした。手術時遠隔転移陽性例（12 症例）、病理学的断端陽性例（12 症例）、検体状態により評価が困難な症例（2 症例）を除外した 239 症例を解析に選択した。

本研究は、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」の対象となり、あらかじめ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った（承認番号：医 16-063）。文書による同意あるいは研究参加の同意を得ることが困難な場合は、オプトアウトにて拒否する機会を設けるため北海道大学病院ホームページにて情報公開を行った。

### 2. 初代培養方法

CAFs と非癌部線維芽細胞 (Noncancerous fibroblasts, NFs) は当科で手術を施行された HCC 患者の組織から初代培養をおこなった。癌部組織より CAFs、癌辺縁から 5cm 以上離れた非癌部組織から NFs をそれぞれ初代培養した。それぞれの組織は剪刀を用いて 2-3 mm の大きさに細切した。細切した組織片は Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) に 1 mg/ml の濃度になるように Collagenase type II (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) を溶解したコラゲナーゼ溶液にいれ、37°C で 1 時間振盪させた。単細胞混濁液は 70  $\mu$ m のセルストレーナー (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) で濾過し、300  $\times$  g で 10 分間遠心分離をおこなった。上清を捨て、細胞ペレットを 10% 不活化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) と 100U/ml ペニシリンおよび 100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (Nacalai Tesque) を添加した DMEM で再懸濁し、5% CO<sub>2</sub> を含む 37°C のインキュベーターで培養した。3 継代まで培養できたものを凍結保存した。その後の実験では、3-8 継代の細胞のみを使用した。

### 3. 使用した細胞株、細胞培養法

本実験においては、4種のヒトHCC細胞株（HuH-7、Li-7、HLE、HLF）を使用した（表1）。HuH-7、HLEおよびHLFはJapanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB, Osaka, Japan) から、Li-7は理化学研究所バイオリソース研究センター (RIKEN BRC, Tsukuba, Japan) から購入した（表1）。HuH-7、HLEおよびHLFはDMEMで、Li-7は、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Nacalai Tesque) で培養し、各培地には10% FBSおよび100U/ml ペニシリンおよび100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを添加した。すべての細胞株は5% CO<sub>2</sub>を含む37°Cのインキュベーターで培養した。

表1. HCC細胞株とその情報

細胞株	番号	分化度	年齢	性別	人種
HuH-7	JCRB0403	well	57	M	Asian
Li-7	RCB1941	NA	45	M	NA
HLE	JCRB0404	por	68	M	NA
HLF	JCRB0405	por	68	M	NA

NA not applicable

### 4. 免疫細胞染色

CAFs・NFsの活性化マーカーの発現強度と線維芽細胞の純度を確認するために免疫細胞染色をおこなった。実際の手順と使用した抗体は表2、3の通りである。染色後の細胞は蛍光顕微鏡BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan) で観察した。

表 2. 免疫細胞染色の手順

手順	
1	5.0×10 <sup>4</sup> 個の細胞を Culture Slide 4 well (Corning, Corning, NY) に播種し、24 時間前培養
2	95%エタノールを用いて細胞を固定
3	PBS で洗浄 (5 分×3 回)
4	Blocking One Histo (Nacalai Tesque) を用いて 25°C で 30 分ブロッキング
5	TBS-T で洗浄 (5 分×3 回)
6	1 次抗体を細胞上に滴下し、4°C で 18 時間インキュベート
7	TBS-T で洗浄 (5 分×3 回)
8	2 次抗体を細胞上に滴下し、遮光し 25°C で 1 時間インキュベート
9	TBS-T で洗浄 (5 分×3 回)
10	DAPI を含有した封入剤 (ProLong Diamond Antifade Mountant; Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて封入

表 3. 免疫細胞染色に用いた抗体

	標的	由来種	メーカー	番号	希釈倍率
一次抗体	α-SMA	mouse	Dako (Glostrup, Denmark)	M0851	1 : 100
	FAP	rabbit	Abcam (Cambridge, UK)	ab28244	1 : 100
	Hep-Par1	mouse	Dako	M7158	1 : 50
二次抗体	mouse	goat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)	A11029	1 : 5000
	rabbit	goat	Thermo Fisher Scientific	A32731	1 : 5000

5. 定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Quantitative polymerase chain reaction, qPCR)  
 細胞における messenger RNA (mRNA) の発現レベルの定量は PCR を用いて測定した。細胞からの total RNA の抽出は RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を使用した。PCR の手順と使用したプライマーは表 4、5 の通りである。RNA 発現量については  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法を用いて計算した。定量補正にはハウスキーピング遺伝子である GAPDH を用いた。各サンプルは 2 回ずつ測定し、その平均値を結果として採用した。

表 4. total RNA の抽出と PCR の手順

	手順
1	Dish の細胞を Buffer RLT 350 $\mu$ l を添加して細胞を回収
2	QIA shredder スピンカラムに添加し、10,000 $\times g$ で 2 分間遠心分離
3	70%エタノール 350 $\mu$ l を添加し、ピペッティング
4	RNeasy スピンカラムに添加し、8,000 $\times g$ で 15 秒間遠心分離
5	Buffer RW1 700 $\mu$ l を添加し、8,000 $\times g$ で 15 秒間遠心分離
6	DNase 80 $\mu$ l をカラムの中心に添加し、室温で 15 分間静置
7	Buffer RW1 350 $\mu$ l を添加し、8,000 $\times g$ で 15 秒間遠心分離
8	Buffer RPE 500 $\mu$ l を添加し、8,000 $\times g$ で 15 秒間遠心分離
9	Buffer RPE 500 $\mu$ l を添加し、8,000 $\times g$ で 2 分間遠心分離
10	RNeasy スピンカラムを新しいコレクションチューブに装着し、12,500 $\times g$ で 1 分間遠心分離
11	蒸留水 30 $\mu$ l を添加し、8,000 $\times g$ で 1 分間遠心分離し total RNA を抽出
12	抽出した total RNA を逆転写酵素 (ReverTra Ace; Toyobo, Osaka, Japan) を用いて cDNA に逆転写
13	cDNA、プライマー、TB Green Premix EX Taq II (Takara, Kusatsu, Japan) を混和
14	Light Cycler 2.0 (Roche, Basel, Switzerland) を用いて qPCR を施行

表 5. プライマーの一覧

Target	Sequence	
	Forward	Reverse
<i>ACTA2</i> ( $\alpha$ SMA)	5' -CTGAGCGTGGCTATTCCTC-3'	5' -CTGAAGGGAGGATGAGGATG-3'
<i>FAP</i>	5' -GAACTGGATGGGCTGGTG-3'	5' -TGTTTGTAGCCATCCTTGTCAC-3'
<i>VCAN</i>	5' -CGGTGCTTAGGAAATGGAAG-3'	5' -AATTGTCCTTTGCTGATGAGG-3'
<i>THBS2</i>	5' -TCCCTCAAGGTGGTGAATC-3'	5' -AGTCCTCCAGCCAATGTTTC-3'
<i>ANKH</i>	5' -TCTGCATGGCTCTGTCACTC-3'	5' -GTTCTGCAAAGGCAAAGTCC-3'
<i>ICAM1</i>	5' -AGCTTCTCCTGCTCTGCAAC-3'	5' -GTCTGCTGGGAATTTTCTGG-3'
<i>LPCAT2</i>	5' -TGCGAGTTCCTCAAAAGGAG-3'	5' -GCCAGGCCAATCACATACTC-3'
<i>TOE1</i>	5' -CCTGATACAGCATGGCTTCA-3'	5' -GACTGGCTCTGGCTCTCATC-3'
<i>NMT</i>	5' -AGCTGGAGAAGTGGCTGAAG-3'	5' -CTCCTTCTCTGGACCCTTGA-3'
<i>AKR1C1</i>	5' -TGCTGGATTTCTGCAAGTCA-3'	5' -AAAGGACTGGGTCTCCAAG-3'
<i>CAVIN2</i>	5' -AAGTCCGAGAGGGAGAAAGC-3'	5' -TCCTCTCCTGGTCATTTGG-3'
<i>BST1</i>	5' -ACATGGGGTTCCAGTACAGC-3'	5' -GCCGACTTTAAGGCACAGTC-3'
<i>GPX1</i>	5' -CGGGACTACACCCAGATGAA-3'	5' -TCTCTCGTTCTTGGCGTTC-3'
<i>CDH2</i>	5' -GGACCGAGAATCACCAAATG-3'	5' -AACACTTGAGGGGCATTGTC-3'
<i>DNASE2</i>	5' -AGAGCTTTGCCAAGTTCAGC-3'	5' -AGCAGTTAGAGGGCAGGATG-3'
<i>PLSCR3</i>	5' -TACAGACCTGGCATCCCTTC-3'	5' -GGATTCATCCCGAGTCTTCA-3'
<i>MRC2</i>	5' -CAGAGCTATGAGGGCCAGAG-3'	5' -GCCCCAGTTGGAGTAGTTC-3'
<i>GAPDH</i>	5' -CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'	5' -GCCATCCACAGTCTTCTGG-3'

## 6. 馴化培地 (Conditioned medium; CM) の作製

線維芽細胞が癌細胞に及ぼす影響を調べるために、線維芽細胞の CM を作製した。まず、6-well プレートに  $1 \times 10^5$  個の初代培養した CAFs および NFs を播種した。24 時間の前培養を行い、PBS で軽く洗浄後に FBS を含まない DMEM を 2ml 添加し、72 時間培養した。培養上清を回収し、細胞片を除去するために  $1,000 \times g$  で 10 分間遠心分離した。上清のみを回収し、CM とした。

## 7. 細胞増殖能アッセイ

細胞増殖能はCell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)を用いて評価した。まず、96-wellプレートに $5 \times 10^3$ 個のヒト肝癌細胞株 (HuH-7, HLF) を播種した。4時間の前培養を行い、細胞がプレートに接着しているのを確認し、2% FBSを添加した培養液 (各CM、DMEM) に交換した (この時点をも0hとした)。0h、24時間後 (24h)、48時間後 (48h) にCCK-8溶液を用いて450nmの吸光度をVarioskan Flash (Thermo Fisher Scientific)で測定した。各測定については6回ずつ行い、数値は平均値と標準誤差で記述した。

## 8. 細胞遊走能アッセイ

細胞遊走能はwound-healing assayを用いて評価した。まず、24-wellプレートに $2 \times 10^5$ 個のヒト肝癌細胞株 (HuH-7, HLF) を播種した。24時間の前培養を行い、細胞が単層の90%コンフルエント状態になっていることを確認した。200 $\mu$ lピペットチップの先端でスクラッチし細胞欠損部を作製し、PBSで洗浄後に、2% FBSを添加した培養液 (各CM、DMEM) に交換した (この時点をも0hとした)。0hと24時間後 (24h) の時点での欠損部の面積を測定し細胞遊走率を算出した。細胞の面積は3つのランダムな顕微鏡視野 (100 $\times$ 倍率) で撮影し、ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて算出した。各測定については3回ずつ行い、数値は平均値と標準誤差で記述した。

## 9. 細胞浸潤能アッセイ

細胞浸潤能は24-well Matrigel invasion chambers with 8- $\mu$ m pores (Corning)を用いて評価した。まず、upper chamberにFBSを含まないDMEM下に $5 \times 10^4$ 個のヒト肝癌細胞株 (HuH-7, HLF) を播種した。続いて、lower chamberには10% FBSを添加した培養液 (各CM、DMEM) に交換した (この時点をも0hとした)。細胞を24時間インキュベートした後、upper chamberの上面を綿棒で拭き取り、浸潤した細胞をDiff-Quick細胞染色キット (Sysmex, Kobe, Japan) を用いて固定し染色した。浸潤細胞の数は5つのランダムな顕微鏡視野 (200 $\times$ 倍率) を計測した。各測定については3回ずつ行い、数値は平均値と標準誤差で記述した。

## 10. 液体クロマトグラフ質量分析 (Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry; LC-MS/MS)

CAFs に特異的に発現上昇しているタンパク質を同定するために質量分析を用いて網羅的解析をおこなった。CAFs および NFs が同一患者から初代培養できた 3 症例を対象とした (表 6)。

細胞からのタンパク質抽出およびペプチド生成は、Pierce™ Mass Spec Sample Prep Kit for Cultured Cells (Thermo Fisher Scientific) を使用し、表 7 の通りに行った。

質量分析は、ナノスプレーイオン源 (Q Exactive Plus, Thermo Fisher Scientific) を搭載し、ナノフロー高速液体クロマトグラフィー (EASY-nLC 1000 system, Thermo Fisher Scientific) に接続したオービトラップ質量分析計を使用した。各測定について 3 回ずつ行い、数値は平均値とした。

表 6. 質量分析した症例の臨床情報

症例	年齢 (歳)	性別	背景 肝	AFP (ng/ml)	PIVKA-II (mAU/ml)	腫瘍径 (cm)	分化度	脈管浸潤	UICC Stage
1	74	男	HBV	244.8	28	7.6	Poor	陽性	II
2	75	女	NBNC	224.8	1506	7.8	Moderate	陽性	II
3	63	男	HBV	13.5	55320	16.5	Poor	陽性	IIIa

表7. 細胞からのタンパク質の抽出およびペプチド生成の手順

手順	
1	10cm dish で培養した細胞を PBS で洗淨
2	Cell Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific) を添加し、スクレーパーでマイクロチューブに回収
3	エッペンチューブを 95°C で 5 分間煮沸
4	4°C、16,000× <i>g</i> で 5 分間遠心分離し、上清を回収
5	タンパク質濃度を BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) で測定
6	最終タンパク質濃度が 1mg/ml となるように Cell Lysis Buffer を添加し調整
7	100 μl のサンプルに 0.5 μg の Pierce Digestion Indicator (Thermo Fisher Scientific) を添加
8	ジスルフィド結合を還元するために、2.1 μl のジチオスレイトール (Thermo Fisher Scientific) を添加し、50°C で 45 分間インキュベート
9	アルキル化するために、11.5 μl のインドール酢酸 (Thermo Fisher Scientific) を添加し、室温で 20 分間インキュベート
10	4 倍量の -20°C のアセトンを添加し、タンパク質を沈降させ、アセトンのみを除去
11	100 μl の Digestion Buffer (Thermo Fisher Scientific) を添加し、タンパク質を再溶解
12	タンパク質を分解するために、2 μl のリシルエンドペプチターゼ (Thermo Fisher Scientific) と 40 μl のトリプシン (Thermo Fisher Scientific) を添加し、37°C で一晩インキュベート
13	分解を停止させるために、-80°C で凍結
13	生成されたペプチドを脱塩するために、GL-Tip SDB および GL-Tip GC (GL Sciences, Tokyo, Japan) を用いて、3,000× <i>g</i> で遠心分離
14	溶出したペプチドは遠心濃縮機を用いて乾固させ、測定まで -80°C で保管

## 11. 免疫組織染色

ヒト肝細胞癌組織検体の Versican 発現と予後解析は、組織マイクロアレイ (Tissue microarray; TMA) を用いた免疫組織化学的染色により解析をおこなった。TMA は北海道大学病院消化器外科教室 I で手術した HCC 手術検体から構成され、当教室と遺伝子コンパニオン部で過去に作製したものである。HCC の formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) ブロックを用いて、1 症例につき非癌部のコア 1 箇所と癌部のコア 2 箇所が含まれている (図 4)。コアの直径は 1.5mm である。実際の手順は表 8 の通りである。

VCAN の抗体を 3 種類 (抗体 1 : Ab177480、抗体 2 : Ab19345、抗体 3 : HPA004726) 使用。また、間質部の染色を確認するにあたり  $\alpha$ -SMA の抗体を 2 種類 (抗体 1 : M0851、抗体 2 : A2547) 使用 (表 9)。VCAN の染色性を確認するにあたり、細胞株の公共データベースである Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE, <https://sites.broadinstitute.org/ccle/>) より VCAN の各種細胞株の遺伝子発現を調べ、高発現の細胞株として PK45H と LK2 を、低発現の細胞株として KATOIII と MKN74 を抗体の染色性の検証をおこなった。

免疫染色の評価法として Versican の染色強度を①スコア 0 (染色領域を確認できない場合)、②スコア 1 (強拡大で染色領域を確認できる場合)、③スコア 2 (スコア 1 とスコア 3 の中間の染色強度の場合)、④スコア 3 (弱拡大で強く染色領域を確認できる場合) の 4 段階に分け、癌部の上皮と間質部をそれぞれ評価した。これらの実験における免疫組織化学染色のスコア化は、臨床情報を把握しない 2 人の独立した実験者によって行われた。

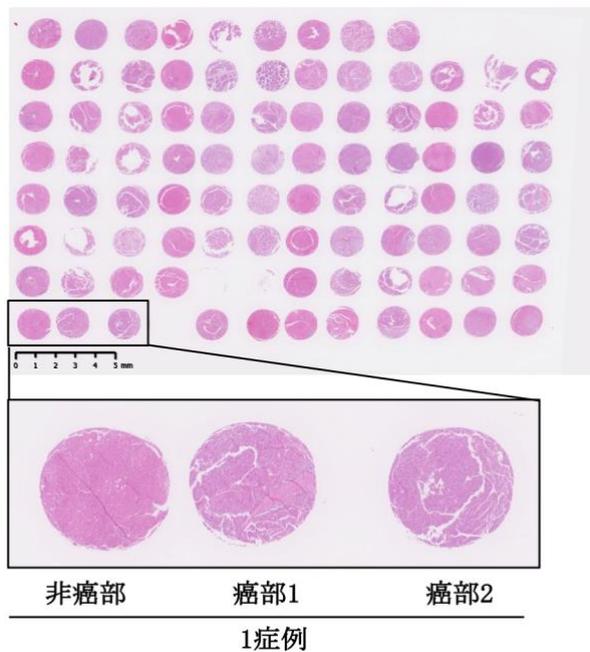


図4 当科で作製したTMAのスライドの代表例（ヘマトキシリン・エオジン染色）  
 当科で手術したHCC切除検体から癌部を2箇所、非癌部から1箇所から構成される。1枚のスライドで31症例の標本が貼り付けられている。

表8. 免疫組織染色の手順

手順	
1	4 $\mu$ mに薄切したTMAは段階的エタノールを用いて脱パラフィン
2	pH 9.0の溶液中で賦活化装置(PH Link, DAKO)を用いて熱処理法による抗原賦活化
3	内因性ペルオキシダーゼのブロッキングはPeroxidase-Blocking Regent (SM801, Dako)を用いて室温で5分間反応
4	一次抗体は表9に示した濃度でDako REAL Antibody Diluent (S2022, Dako)で希釈し、室温で30分間反応
5	二次抗体はEnvision FLEX HRP (SM802, Dako)を用いて室温で30分間反応
6	Envision FLEX DAB+ CHROMOGENをEnvision FLEX SUBSTRATE BUFFER (SM803, Dako)し室温で10分間反応させ発色
7	ヘマトキシリンを用いて10秒間核染色をおこない、水洗したのちマリノールで封入

表 9. 免疫組織染色に用いた抗体

標的	由来種	メーカー	製品番号	希釈倍率
Versican	rabbit	Abcam	Ab177480	1 : 200
Versican	rabbit	Abcam	Ab19345	1 : 400
Versican	rabbit	Sigma-Aldrich	HPA004726	1 : 100
$\alpha$ -SMA	mouse	Dako	M0851	1 : 200
$\alpha$ -SMA	mouse	Sigma-Aldrich	A2547	1 : 1000

## 12. 共培養

6-well プレート用の ThinCert 細胞培養インサート (Greiner Bio-One) を使用した。まず lower chamber に  $1 \times 10^5$  個の CAFs を播種した。続いて、 $0.2 \mu\text{m}$  のポアの開いた upper chamber に  $1 \times 10^5$  個のヒト肝癌細胞株 (HuH-7, HLF) を播種、lower chamber に装着し培養液が移動できる状態にした。細胞を 96 時間インキュベートした後、lower chamber の CAFs を回収した。各種遺伝子の発現を qPCR で測定した。各測定については 6 回ずつ行い、数値は平均値と標準誤差で記述した。

## 13. VCAN 遺伝子ノックダウン細胞の作製

6-well プレートに  $3.0 \times 10^5$  個の細胞を播種し、24 時間前培養した。培養後 7 割程度の細胞密度の状態を確認。Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) に、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)  $7.5 \mu\text{l}$  と siRNA 25 pmol を溶解した  $250 \mu\text{l}$  の溶液を細胞へ添加した。VCAN を標的とした 2 種類の siRNA (siVCAN1 ; s229334, siVCAN2 ; s229335, Thermo Fisher Scientific) と、nontargeting siRNA (siNC ; 4390843, Thermo Fisher Scientific) を用いた。細胞に siRNA を導入し培養開始後、24、48、72 時間に細胞を回収しノックダウン効率を確認した。本実験は北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定に従って実施した。

## 14. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

培養上清中の VCAN 濃度は、ELISA で測定した。市販の ELISA キット (OKCD07688, Aviva Systems Biology, San Diego, CA) を用い、以下の手順で測定した (表 10)。各サンプルは 2 回ずつ測定し、その平均値を結果として採用した。

表 10. ELISA での VCAN 濃度測定手順

手順	
1	標準品 (Lyophilized VCAN Standard) とサンプル 100 $\mu$ l を各 well に添加
2	室温で 1 時間インキュベート
3	標準品とサンプルを完全に除去
4	Biotinylated VCAN Detector Antibody 100 $\mu$ l を各 well に添加
5	室温で 1 時間インキュベート
6	Wash Buffer を用いてプレートを 3 回洗浄
7	Avidin-HRP Conjugate 100 $\mu$ l を各 well に添加
8	室温で 30 分インキュベート
9	Wash Buffer を用いてプレートを 5 回洗浄
10	TMB Substrate 90 $\mu$ l を各 well に添加
11	遮光して室温で 10 分インキュベート
12	Stop Solution 50 $\mu$ l を各 well に添加し、発色を停止
13	プレートリーダーを用いて 450nm の吸光度を測定
14	標準品の吸光度から標準曲線を描き、サンプルの濃度を計算

#### 15. Western blotting (WB)

細胞および CM のタンパク質発現レベルの解析には WB を用いた。細胞からのタンパク質の抽出・調整手順は表 11、CM からのタンパク質の抽出・調整手順は表 12、WB の手順は表 13 に通りに行った。実際に使用した抗体は表 14 に記載した。タンパク量は GAPDH をコントロールとしてシグナルの強度を比較した。

表 11. 細胞からのタンパク質の抽出・調整手順

手順	
1	10cm dish で培養した細胞を PBS で洗浄
2	Lysis buffer (組成 : Tris-HCl (pH7.5) 25mM, NaCl 150mM, Sodium Deoxycholate 0.5%, EDTA/2Na 1mM, Octylphenoxypolyethoxyethanol 0.5%, NaF 5mM, Sodium Orthovanadate 5mM, protease inhibitor cocktail 1%) を添加し、スクレーパーでマイクロチューブに回収
3	30 分間氷上に静置
4	4°C、12,000× <i>g</i> で 10 分間遠心し、上清を回収
5	上清中のタンパク質濃度を BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) で測定
6	最終タンパク質濃度が 20 μg/12 μl となるように Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA) と 2-メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich) を添加し調整
7	95°C で 5 分間煮沸
8	調整したサンプルは使用まで -80°C で保管

表 12. CM からのタンパク質の抽出・調整手順

手順	
1	CM 1000 μl を回収
2	Vivaspin6 100K (Sartorius Lab Instruments, Goettingen, Germany) に CM を添加
3	4°C、2500× <i>g</i> で 20 分間遠心し、限外濾過で約 1/10 に濃縮
6	濃縮液を Laemmli sample buffer (Bio-Rad) と 2-メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich) を添加し調整
7	95°C で 5 分間煮沸
8	調整したサンプルは使用まで -80°C で保管

表 13. WB の手順

手順	
1	ゲル (Mini-Protean TGX Gels 7.5%; Bio-Rad) の各 well に調整した抽出液を 12 $\mu$ l アプライ
2	100V で 60 分間泳動
3	100V で 60 分間、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Bio-Rad) に転写
4	3% non-fat dry milk で 60 分間ブロッキング
5	TBS-T で 5 分 3 回洗浄
6	1 次抗体に 4°C で 16 時間震盪しながらインキュベート
7	TBS-T で 5 分 3 回洗浄
8	2 次抗体に室温で 1 時間震盪しながらインキュベート
9	TBS-T で 10 分 3 回洗浄
10	メンブレンに化学発光試薬 (Clarity Western ECL substrate; Bio-Rad) をアプライ
11	イメージャー (ChemiDoc XRS+; Bio-Rad) でシグナルを検出

表 14. WB に用いた抗体

	標的	由来種	メーカー	製品番号	希釈倍率
一次抗体	VCAN	rabbit	Abcam	ab19345	1 : 1000
	GAPDH	rabbit	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)	#5174	1 : 1000
二次抗体	rabbit	goat	Cell Signaling Technology	#7074	1 : 5000

## 16. 統計解析

患者データは当教室で維持・保管しているデータベースから収集した。連続変数の比較には Student の  $t$  検定を用い、カテゴリー変数に Pearson のカイ二乗検定を用いた。多群間の比較には Turkey-Kramer 法を用いた。全生存期間(Overall survival; OS)は手術日から原因を問わず死亡した日まで、無再発生存期間(Relapse-free survival; RFS)は手術日から死亡または肝細胞癌の再発を確認した日までと定義した。生存曲線の解析は Kaplan-Meier 法で求め、Log-rank 検定で比較した。単変量および多変量の生存時間解析には Cox 比例ハザードモデルを用いた。多変量解析における共変量は、単変量解析で有意差のあった変数から選択した。統計解析の際はいずれも  $P < 0.05$  を統計学的有意差ありと定義した。統計解析には JMP Pro version 14.3.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC)を用いた。

## 結 果

### 1. 初代培養した CAFs および NFs の形態と遺伝子発現

2018年4月から2019年11月の期間でHCC患者22例より初代培養を試みた。CAFsは癌部の腫瘍が少ない症例が4例を除いた18例で、NFsは癌辺縁から5cm離れた非癌部を確保できない6例を除いた16例でおこなった。3継代後に凍結できた症例を初代培養成功とした。CAFsで5/18例(27.8%)、NFsで11/16例(68.8%)の成功例であり、NFsに比べるとCAFsでの成功率は低かった。CAFsおよびNFsともに紡錘状の形態をした細胞で、形態学的に差は認めなかった(図5)。

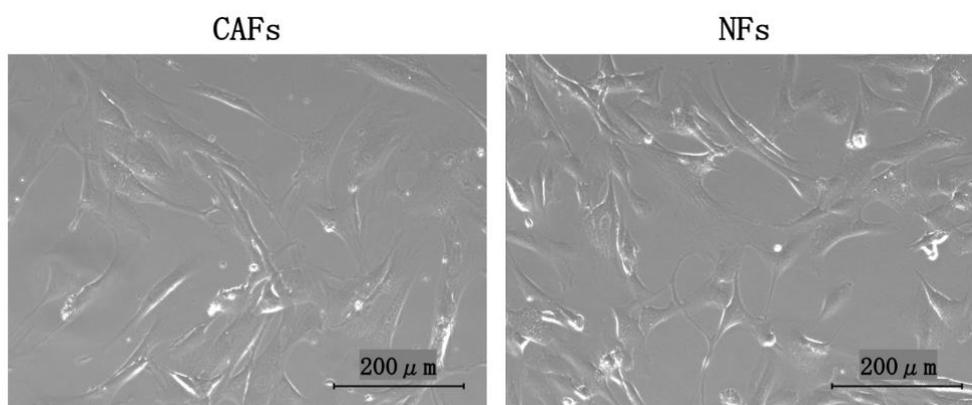


図5 初代培養した CAFs および NFs の代表像

HCC 検体の癌部から初代培養した CAFs、癌辺縁より 5cm 以上離れた非癌部から初代培養した NFs の位相差顕微鏡での観察像。Scale bar=200 μm。

初代培養した細胞のタンパク質発現を評価、および癌細胞の混入を確認するために免疫細胞染色をおこなった。既存の報告で CAFs のマーカーとして報告が多い  $\alpha$ -SMA および FAP の染色をした。初代培養した細胞は肝細胞癌細胞で陽性となる Hep-Par1 はすべての細胞で陰性で、癌細胞の混入がないことを確認した(図6)。 $\alpha$ -SMA に関しては NFs に比べて CAFs で発現が強いものの、FAP に関しては CAFs と NFs で同程度の発現の強さであった(図6)。

CAFs と NFs の CAFs マーカーの遺伝子発現を評価するために、qPCR をおこなった。対象は同一患者から CAFs と NFs をともに初代培養できた4症例とした。既存の報告と同様に、ACTA2 ( $\alpha$ -SMA の遺伝子名) および FAP ともに NFs に比べて CAFs で有意に発現量が高かった(図7)。

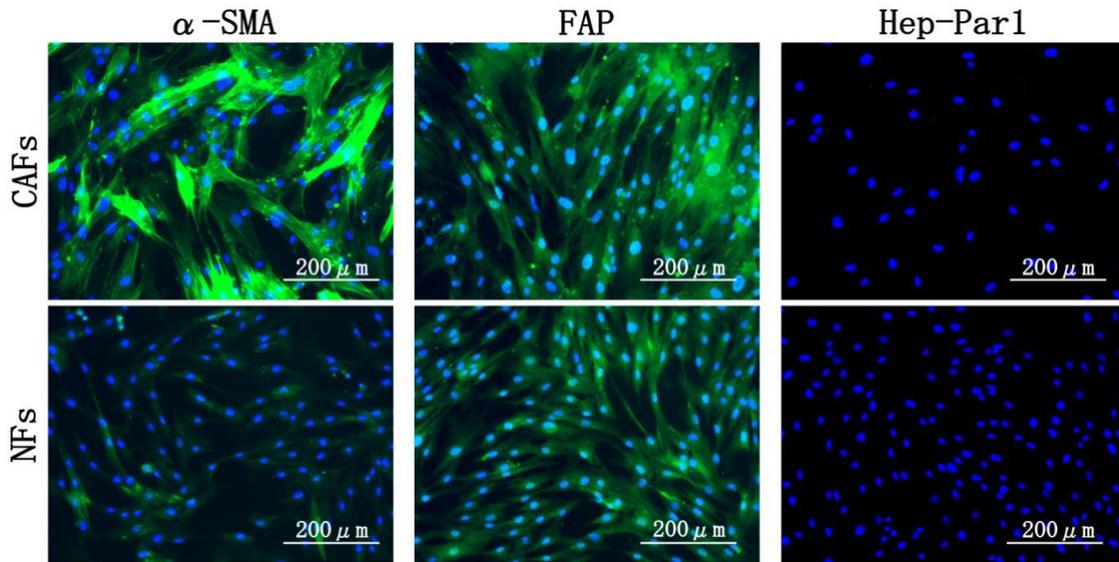


図6 CAFs およびNFs の免疫細胞染色

CAF<sub>s</sub> およびNF<sub>s</sub> でのCAF<sub>s</sub> マーカー ( $\alpha$ -SMA、FAP) と肝細胞癌細胞マーカー (Hep-Par1) の免疫細胞染色。NF<sub>s</sub> に比べてCAF<sub>s</sub> で $\alpha$ -SMA の発現が高い。Scale bar=200  $\mu$ m。

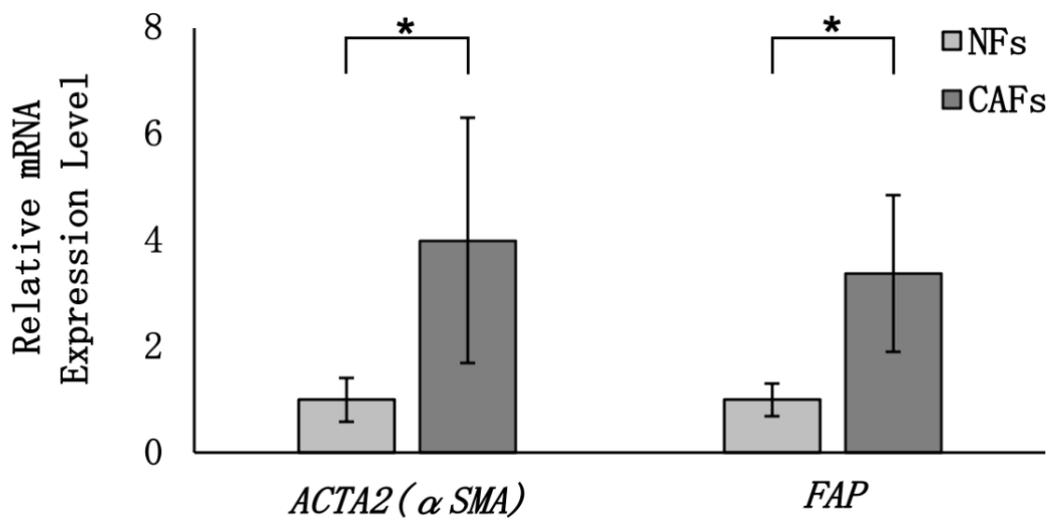


図7 qPCRによるCAF<sub>s</sub> マーカー遺伝子発現の評価

NFs に比べてCAF<sub>s</sub> では *ACTA2* ( $\alpha$ -SMA)、*FAP* の発現上昇を認めた。各群間を Student の t 検定により検定し、\* $P$  < 0.05 として示した。

## 2. CAFs および NFs における肝癌細胞への影響

CAFs および NFs が癌細胞へ与える影響を評価するために、それぞれの CM を作製した。CM は初代培養細胞を前培養した後に、FBS を含まない培養液で 3 日間培養したものである。3 日間の FBS を含まない培養液で培養しても、初代培養細胞の形態が変化しないことを確認した (図 8)。

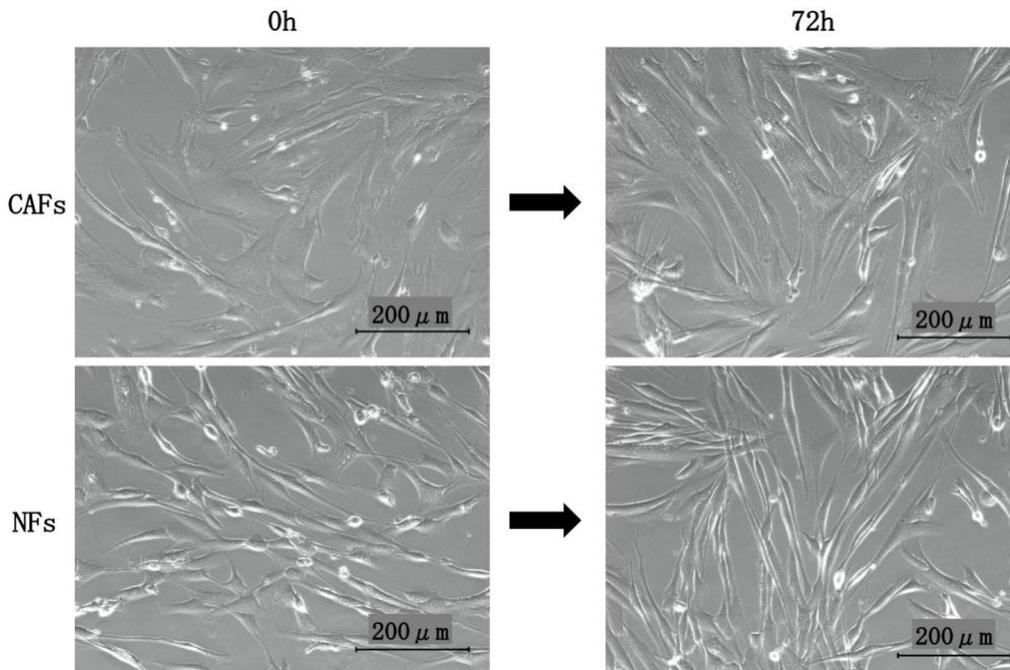


図 8 FBS を含まない培養液で培養した前後の CAFs および NFs の観察像

CM を作製の際の CAFs および NFs の観察像。FBS を含まない培養液で 3 日間培養しても細胞の形態学変化は確認されなかった。Scale bar=200 μm。

続いて、CAFs と NFs の CM とコントロールとして通常の DMEM の 3 種類を用いて、肝癌細胞株 (HuH-7、HLF) の増殖能・遊走能・浸潤能に与える影響を評価した。

CAFs の CM 群は NFs の CM 群とコントロール群と比べて、HuH-7 と HLF の増殖能を有意に亢進させた。一方で、NFs の CM は HuH-7 でのみ DMEM に比べて有意に増殖能を亢進したが、HLF では明らかな有意差はなかった (図 9)。遊走能においては HuH-7 と HLF の両細胞で、CAFs-CM > NFs-CM > DMEM の順に有意に遊走能が増加する結果となった (図 10)。浸潤能においても HuH-7 と HLF の両細胞で、CAFs-CM > NFs-CM > DMEM の順に有意に浸潤能が増加する結果となった (図 11)。以上の結果から、NFs に比べると CAFs の CM 中には肝癌細胞株を有意に増殖能・遊走能・浸潤能を増加させる因子が含まれることが考えられた。

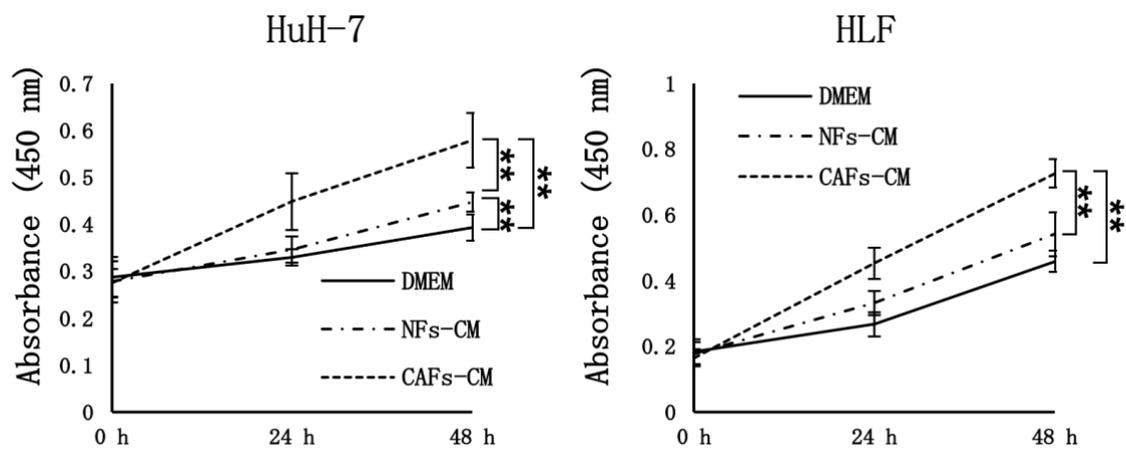


図9 CMを用いた肝癌細胞株の増殖能の評価

CAFsのCM群はHuH-7およびHLFでNFsのCM群とコントロール群に比べて増殖能が亢進した。HuH-7ではNFsのCM群はコントロール群に比べて増殖能が亢進したが、HLFでは明らかな有意差はなかった。各群間をTurkey-Kramer法により検定し、\*\* $P < 0.01$ として示した。

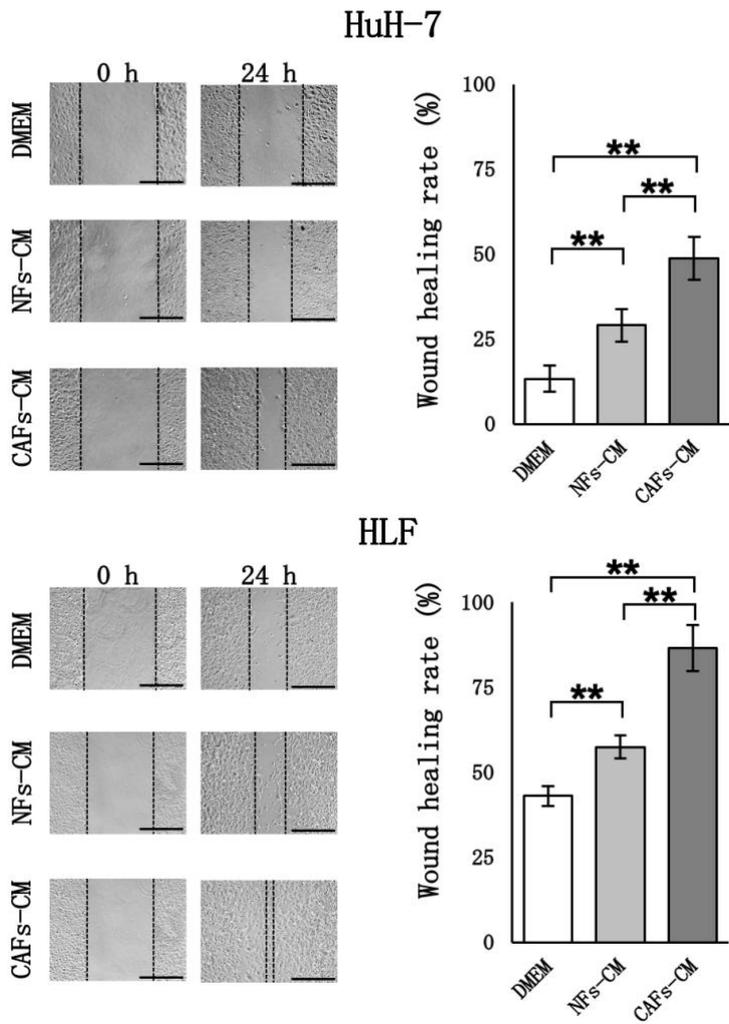


図10 CMを用いた肝癌細胞株の遊走能の評価

CAFsのCM群はHuH-7およびHLFでNFsのCM群とコントロール群に比べて遊走能が亢進した。NFsのCM群はHuH-7およびHLFでコントロール群に比べて遊走能が亢進した。各群間をTurkey-Kramer法により検定し、\*\* $P < 0.01$ として示した。Scale bar=200  $\mu$ m

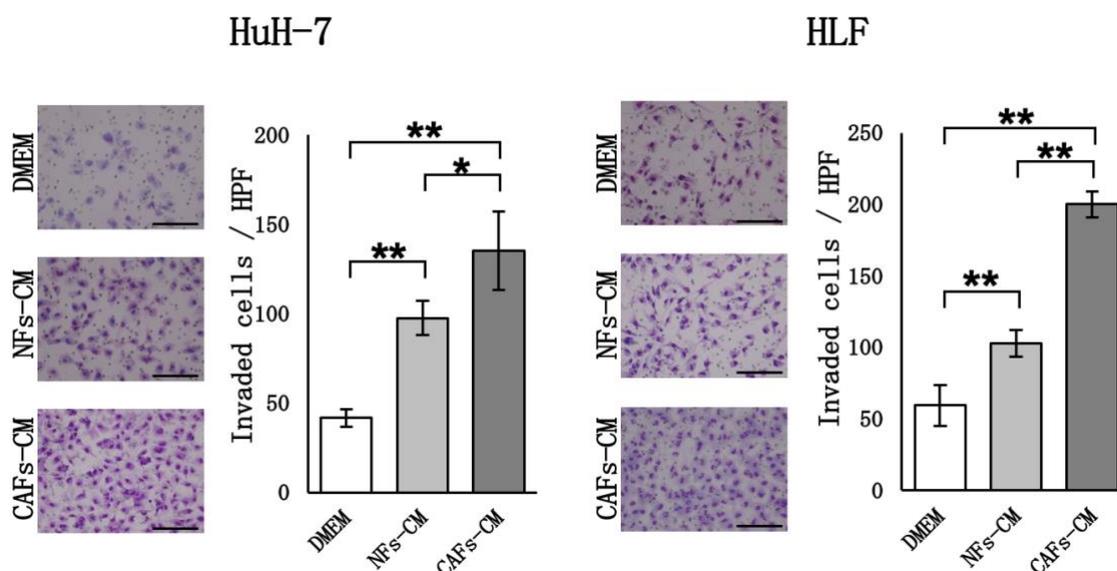


図 11 CM を用いた肝癌細胞株の浸潤能の評価

CAFs の CM 群は HuH-7 および HLF で NFs の CM 群とコントロール群に比べて浸潤能が亢進した。NFs の CM 群は HuH-7 および HLF でコントロール群に比べて浸潤能が亢進した。各群間を Turkey-Kramer 法により検定し、 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$  として示した。Scale bar=200  $\mu\text{m}$ 。

### 3. 癌悪性化に関与する CAFs 特異的タンパク質の同定

CAFs は NFs と比べて癌細胞の増殖・遊走・浸潤能を有意に亢進させていた。そこで CAFs で特異的に発現上昇し、癌悪性化に関与している分子を同定するために、LC-MS/MS で網羅的プロテオーム解析をおこなった。本実験では同一患者から初代培養した CAFs と NFs の 3 ペアを対象とした (表 6)。LC-MS/MS では 3488 のタンパク質を同定可能であった。主成分分析および階層クラスタリング解析をおこなうと、同一患者の CAFs と NFs よりも他の患者の CAFs 同士がより近い集団であることがわかった (図 12)。

続いて、CAFs と NFs の 2 群間で p 値が 0.01 以下のものを抽出すると、CAFs で発現増加しているタンパク質が 35 個、発現低下しているタンパク質が 56 個同定した (図 13)。

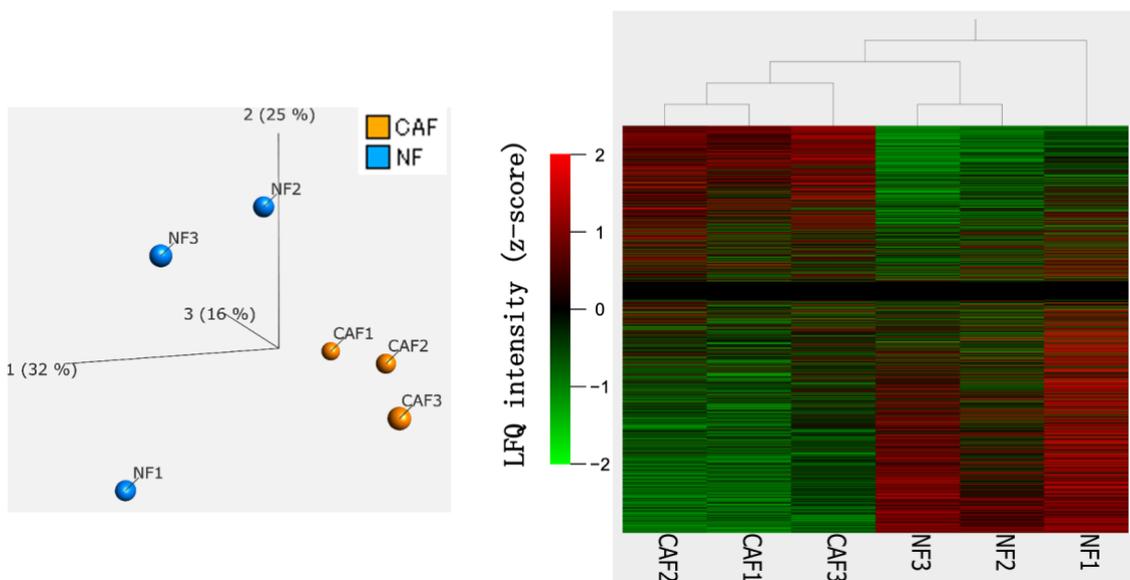


図 12 LC-MS/MS での主成分分析および階層クラスタリング解析

LC-MS/MS した CAFs および NFs の分析結果。CAFs 同士はより近い集団であった。

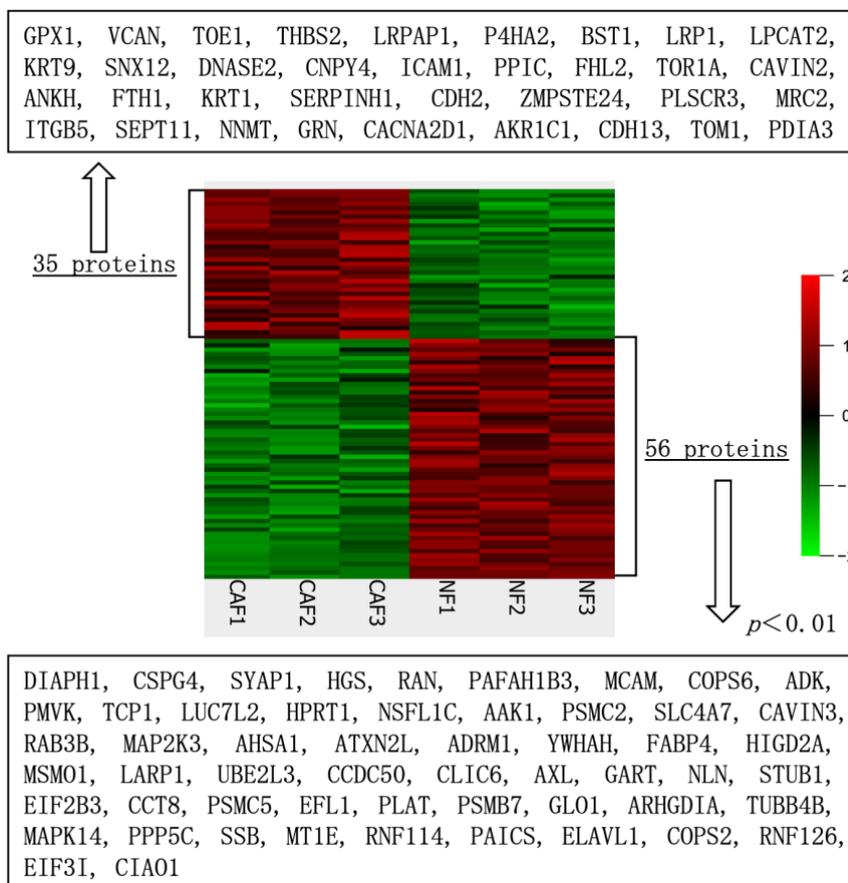


図 13 LC-MS/MS での  $P < 0.01$  で発現増減しているタンパク質の一覧

CAFs と NFs の 2 群間で  $P < 0.01$  で発現増減しているもの抽出した。

本実験では同一患者の CAFs と NFs を用いているため、患者それぞれの CAFs/NFs 比率をそれぞれ算出した。各タンパク質の平均 CAFs/NFs を対数変換し、増減しているタンパク質の上位 15 個を表記した (図 14)。CM を用いた実験で癌の増殖・遊走・浸潤能を亢進させていることより、CAFs から分泌されているものが影響を与えると考えられた。発現増加しているタンパク質のうち、分泌タンパク質である versican core protein (VCAN) と thrombospondin-2 (THBS2) を癌悪性度増加に関わる CAFs 特異的タンパク質の候補として選定した。

続いて、The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org>) を使用し、それぞれのタンパク質の発現情報を RNA-seq データを調べた。ヒト正常細胞の中では VCAN と THBS2 は共に線維芽細胞での発現が高いものの、VCANの方がより細胞特異度が高いことが判明した (図 15)。さらに線維芽細胞と肝癌細胞株 (HuH-7、Li-7、HLE、HLF) との発現量を比較するために、qPCR をおこなった。VCAN は 4 種類すべての肝癌細胞株と比較しても CAFs での発現が有意に高いものの、THBS2 は HLE 以外の 3 種類のみ有意に発現が高かった (図 16)。以上の結果より、VCAN を CAFs が癌悪性度に関与する候補タンパク質として選定した。

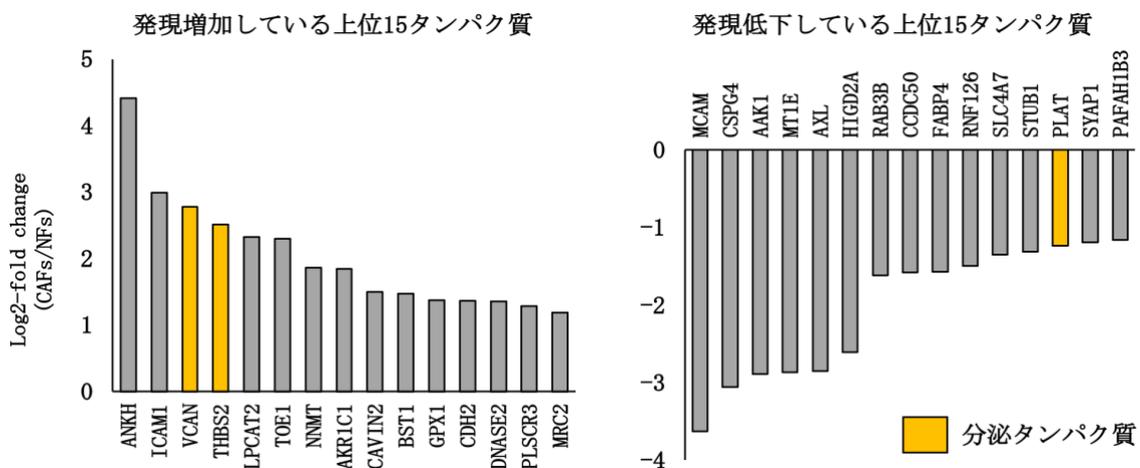


図 14 LC-MS/MS での同一患者 CAFs/NFs の発現増減しているタンパク質一覧

発現増減しているタンパク質を同一患者の CAFs/NFs を計算し平均した。発現増加・発現低下しているタンパク質の上位 15 を対数変換し表示した。その中で分泌タンパク質であるものを黄色で記載している。

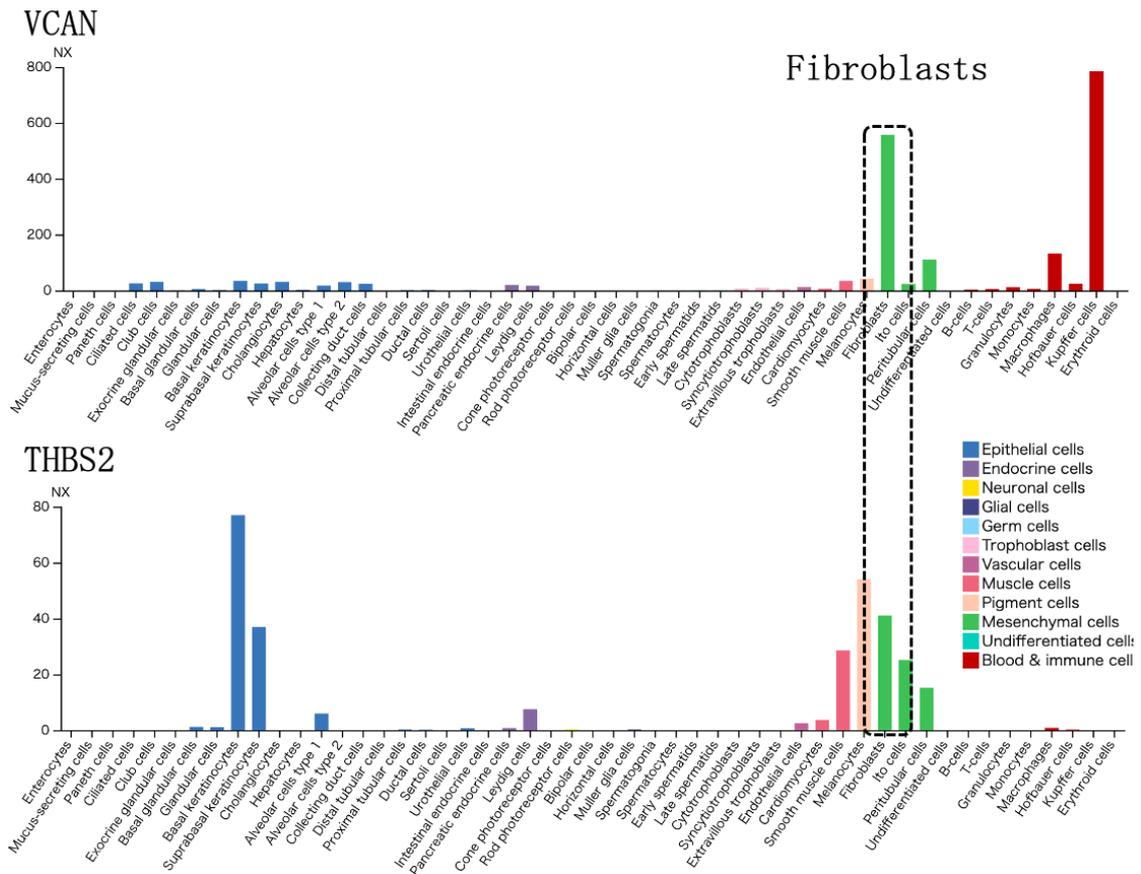


図15 VCAN と THBS2 のヒト正常細胞での遺伝子発現情報

The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org>) より引用

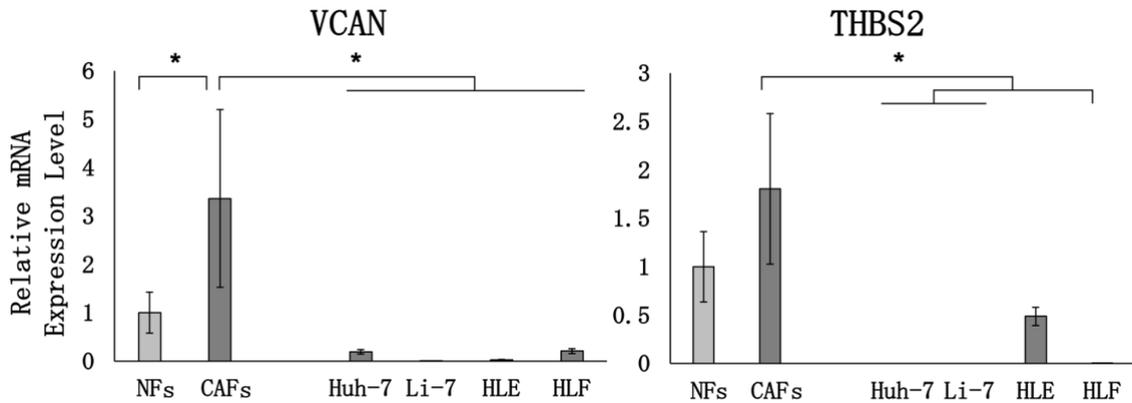


図16 qPCRによる VCAN と THBS2 の遺伝子発現の評価

NFs と CAFs と 4 種類の肝癌細胞株 (HuH-7, Li-7, HLE, HLF) の VCAN と THBS2 の発現量を評価した。VCAN はすべての肝癌細胞株に比べて CAFs で発現増加していた。

THBS2 は CAFs と HLE では有意差はなかったが、HuH-7・Li-7・HLF では有意に発現増加していた。各群間を Turkey-Kramer 法により検定し、\* $P < 0.05$  として示した。

#### 4. ヒト HCC 検体組織における VCAN の発現量と予後との関連

VCAN は多くの癌種で発現が観察されており、癌の悪性度との関連が注目されている。しかし、癌細胞の VCAN の発現が悪性度に関わるのか、癌部の間質の VCAN の発現が悪性度に関わるのかは一定の見解を得ていない。本研究では、ヒト HCC 組織における VCAN の発現を癌細胞と癌部間質をそれぞれ評価検討した。対象となった症例の患者背景を表 15 に示す。

表 15. 対象の HCC 患者の臨床病理学的初見

因子	全症例 (n=239)
年齢 (歳)	65 (57-72)
性別 (男性/女性)	197 (82.4) / 42 (17.6)
HBs Ag (無/有)	142 (59.4) / 97 (40.6)
HCV Ab (無/有)	164 (68.6) / 75 (31.4)
NBNC/HBV/HCV/HBV and HCV	70 (29.3) / 94 (39.3) / 72 (30.1) / 3 (1.3)
分化度 (高および中分化/低分化)	163 (68.2) / 76 (31.8)
腫瘍径 (cm)	4.5 (2.8-7.5)
腫瘍個数 (単発/多発)	145 (60.7) / 94 (39.3)
脈管侵襲 (無/有)	172 (72.0) / 67 (28.0)
UICC Stage (I/II/III/IV)	108 (45.2) / 74 (31.0) / 56 (23.4) / 1 (0.4)
AFP (ng/ml)	21.2 (4.5-288.1)
PIVKA-II (mAU/ml)	241.5 (33.8-3913.8)
Child Pugh (A/B/C)	233 (97.5) / 6 (2.5) / 0
肝硬変 (無/有)	159 (66.5) / 80 (33.5)

データは n (%) もしくは中央値 (四分位範囲) で記述

VCAN 抗体 1 では本来発現が低い MKN74 が高発現株である PK45H よりも染色強度が高くなっており不適とした。VCAN 抗体 2 および抗体 3 はともに低発現株である KATO III と MKN74 はほとんど染色されなかったが、高発現株である PK45H と LK2 でより染色された抗体 3 を本実験で使用した (図 17)。 $\alpha$ -SMA の染色では、抗体 2 では本来染色されない腎臓および肝臓上皮組織も染色されてしまうことより、抗体 1 を本実験で使用した (図 18)。

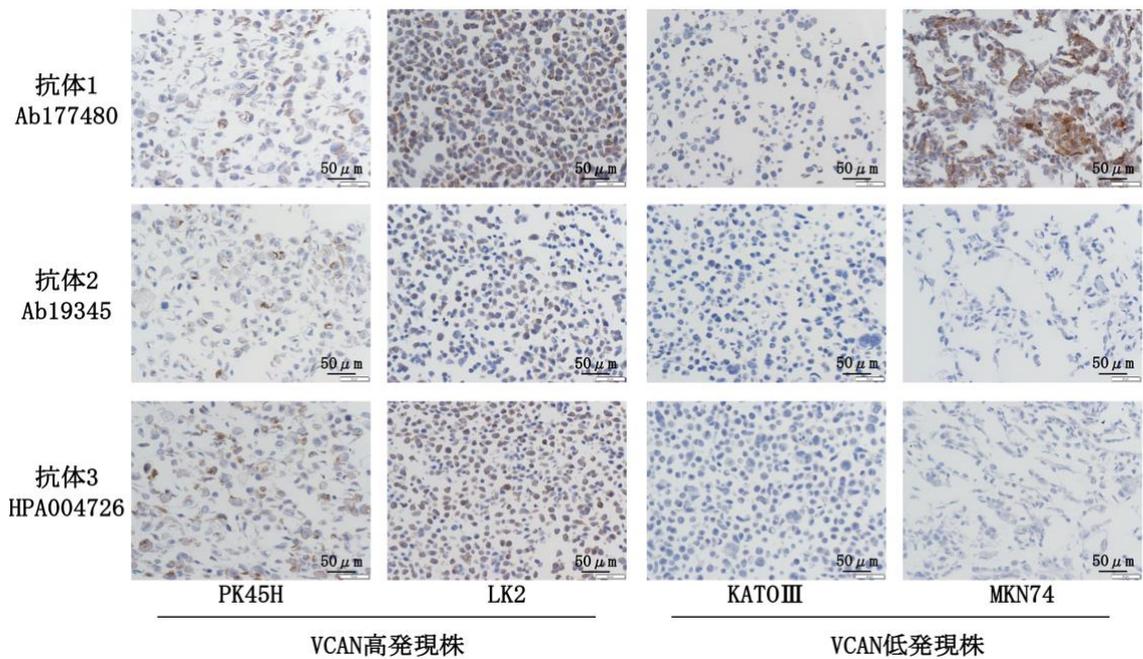


図 17 各種細胞株における VCAN の免疫染色像

VCAN 高発現株 (PK45H, LK2) と VCAN 低発現株 (KATOIII, MKN74) を 3 種類の抗 VCAN 抗体による免疫染色像。抗体 1 は低発現であるはずの MKN74 が強く染色されている。抗体 2 および 3 は低発現細胞株の染色は低く、高発現細胞株は染色された。Scale bar = 50  $\mu$ m。

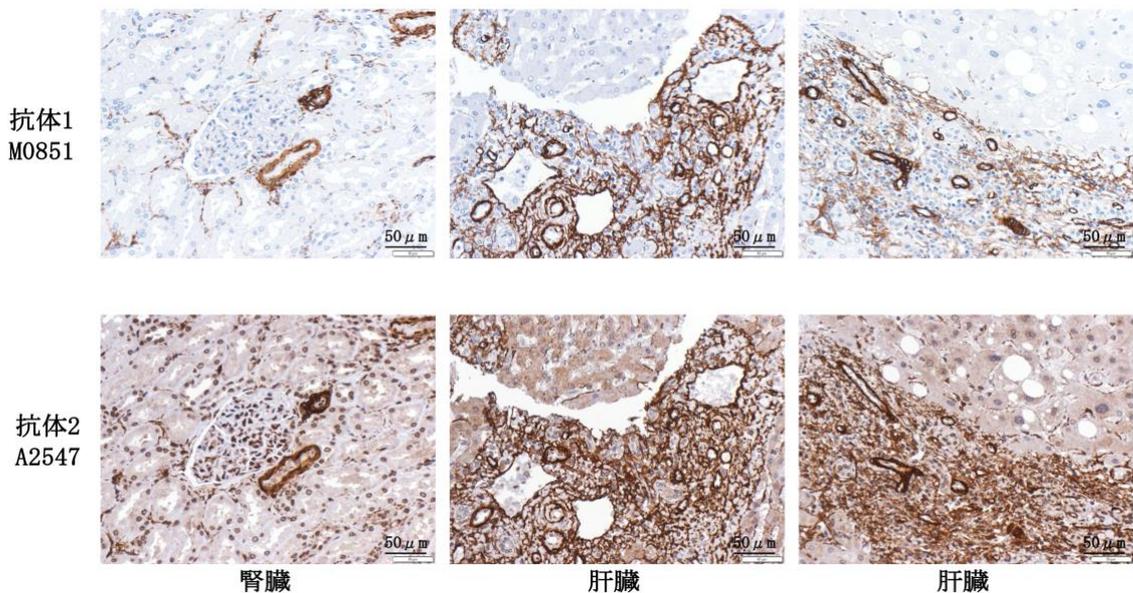


図 18 正常腎臓組織および肝臓組織における  $\alpha$ -SMA の免疫染色像

抗体 1 では上皮細胞は染色されず、間質のみ強く染色した。抗体 2 では間質は強く染色されるものの、上皮細胞も弱く染色された。Scale bar = 50  $\mu$ m。

癌部および非癌部のVCANと $\alpha$ -SMAの免疫組織染色をおこなった。癌部の上皮と間質部をそれぞれ発現強度によって4群に分類をおこなった。全く発現のないものをスコア0 (Negative)、わずかに染色されるものをスコア1 (Weak)、強く染色されるものをスコア3 (Strong)とし、スコア1とスコア3の中間のものをスコア2 (Moderate)とした(図19、図20)。癌間質部でVCANが強く染色される領域は、 $\alpha$ -SMAも染色されており、HCC組織内でのCAFsにVCANが高発現していると考えられた(図20)。一方で、非癌部では $\alpha$ -SMAが染色されている領域では、VCANはほとんど染色されず、非癌部線維芽細胞でのVCAN発現は低いと考えられた。また、非癌部組織の類洞内に強く染色されている細胞があり、クッパー細胞と考えられた。実際に、The Human Protein AtlasのVCAN発現情報では線維芽細胞以外にクッパー細胞で発現が高いとされていた(図15)。上皮細胞の染色強度に関しても、間質と同様に4群に分類をおこなった(図20)。TMAを使用しており、1患者からは2つの癌組織があるため、2つの癌組織の間質と上皮をそれぞれスコア化し平均とした。平均スコアが1.5以上のものをVCAN高発現群、1.5未満のものをVCAN低発現群として2群に分けて検討をおこなった。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。

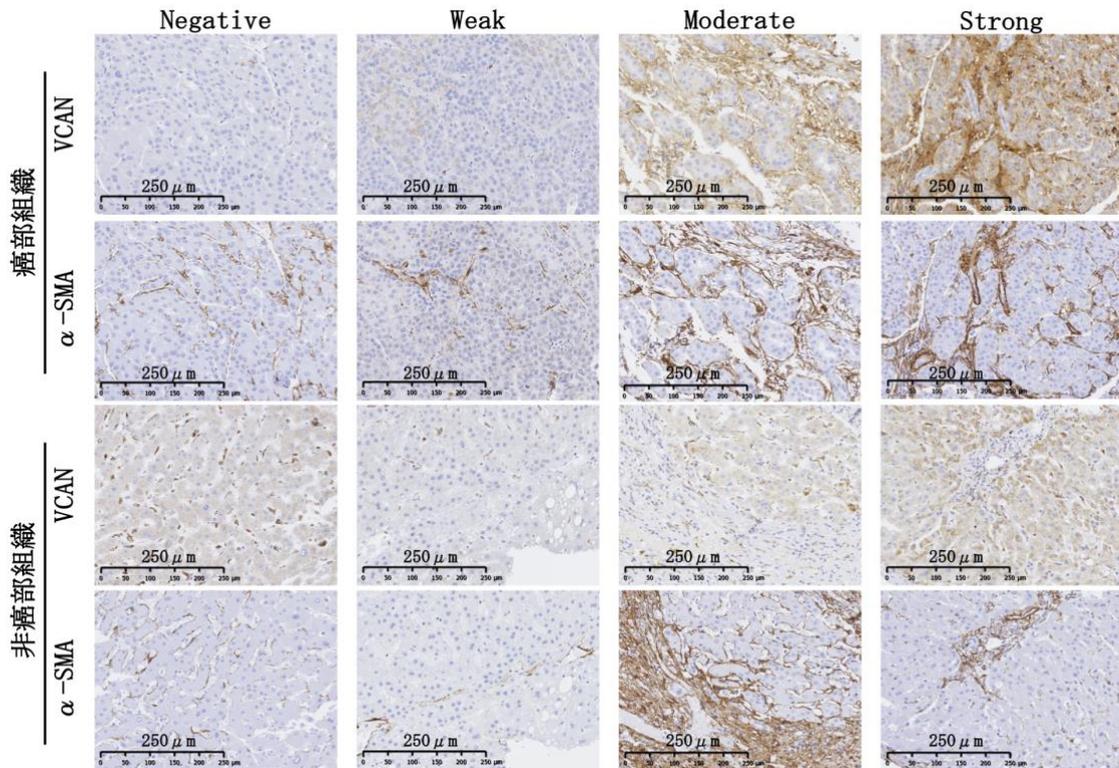


図 19 癌部と非癌部組織における間質 VCAN の免疫染色像、および染色強度  
HCC 検体の癌部と非癌部の VCAN と  $\alpha$ -SMA の染色像。癌部では  $\alpha$ -SMA が染色される領域（間質部）では VCAN の発現が高いが、非癌部は間質部でも VCAN は染色されない。間質部の VCAN の染色強度を 4 段階で評価をした。癌部と非癌部の上下ペアは同一症例である。Scale bar=250  $\mu$ m。

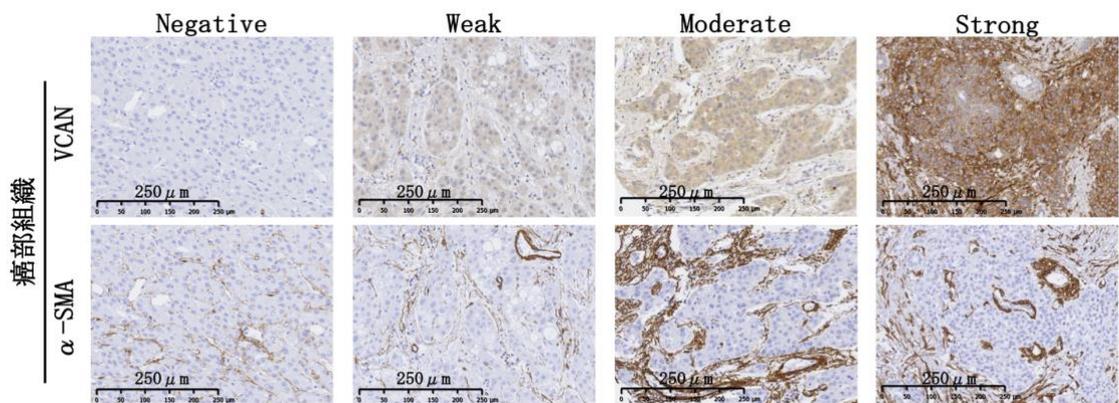


図 20 癌部組織における上皮 VCAN の免疫染色像、および染色強度  
HCC 検体の癌部と非癌部の VCAN と  $\alpha$ -SMA の染色像。上皮細胞の VCAN の染色強度を 4 段階で評価をした。Scale bar=250  $\mu$ m。

次に、癌間質部と上皮のVCANの高発現群と低発現群に分けてそれぞれ患者背景と臨床病理学的因子について検討した。間質VCAN高発現群では低分化癌 ( $p = 0.009$ )、脈管侵襲陽性 ( $p = 0.003$ ) が有意に多かった。しかし、ステージ分類に関連する腫瘍径と腫瘍個数では有意差がなく、間質VCAN高発現群でステージが高いということはなかった(表16)。一方で、上皮の発現強度における2群間の比較では、有意差のある因子はみられなかった(表17)。

表 16. 癌部間質VCAN低発現群・高発現群の臨床病理学的因子

因子	間質VCAN低発現群 (n=160)	間質VCAN高発現群 (n=79)	p-value
年齢(歳)	65(57.3-72)	62(55-71)	0.170
性別(男性/女性)	132(82.5)/28(17.5)	65(82.3)/14(17.7)	0.966
HBs Ag(無/有)	95(59.4)/65(40.6)	47(59.5)/32(40.5)	0.986
HCV Ab(無/有)	111(69.4)/49(30.6)	53(67.1)/26(32.9)	0.720
NBNC/HBV/HCV/HBV and HCV	49(30.0)/63(39.3)/47(29.4)/2(1.3)	22(27.9)/31(39.2)/25(31.6)/1(1.3)	0.982
分化度(高および中分化/低分化)	118(73.8)/42(26.2)	45(57.0)/34(43.0)	<b>0.009</b>
腫瘍径(cm)	4.5(3-7.4)	4.6(2.7-7.5)	0.846
腫瘍個数(単発/多発)	98(61.2)/62(38.8)	47(59.5)/32(40.5)	0.794
脈管侵襲(無/有)	125(78.1)/35(21.9)	47(59.5)/32(40.5)	<b>0.003</b>
UICC Stage(I/II/III/IV)	79(49.4)/46(28.7)/35(21.9)/0	29(36.7)/28(35.4)/21(26.6)/1(1.3)	0.160
AFP(ng/ml)	19.9(4.5-181.3)	21.6(5.8-536.7)	0.645
PIVKA-II(mAU/ml)	288(35-4167)	216(31-2381)	0.548
Child Pugh(A/B/C)	156(97.5)/4(2.5)/0	77(97.5)/2(2.5)/0	0.988
肝硬変(無/有)	104(65.0)/56(35.0)	55(69.6)/24(30.4)	0.476

データはn(%)もしくは中央値(四分位範囲)で記述

表 17. 癌部上皮 VCAN 低発現群・高発現群の臨床病理学的因子

因子	上皮 VCAN 低発現群 (n=181)	上皮 VCAN 高発現群 (n=58)	p-value
年齢 (歳)	64(56.5-72)	65(56.8-71)	0.990
性別 (男性/女性)	154(85.1)/27(14.9)	43(74.1)/15(25.9)	0.057
HBs Ag (無/有)	106(58.6)/75(41.4)	36(62.1)/22(37.9)	0.636
HCV Ab (無/有)	129(71.3)/52(28.7)	35(60.3)/23(39.7)	0.119
NBNC/HBV/HCV/HBV and HCV	55(30.4)/74(40.9)/51(28.2)/1(0.6)	15(25.9)/20(34.5)/21(36.2)/2(3.5)	0.200
分化度(高および中分化/低分化)	125(69.1)/56(30.9)	38(65.5)/20(34.5)	0.614
腫瘍径 (cm)	4.5(3-7.5)	4.5(2.5-7.5)	0.243
腫瘍個数 (単発/多発)	112(61.9)/69(38.1)	33(56.9)/25 (43.1)	0.499
脈管侵襲 (無/有)	132(72.9)/49(27.1)	40(69.0)/18(31.0)	0.559
UICC Stage ( I / II / III / IV)	83(45.9)/56(30.9)/41(22.7)/1(0.6)	25(43.1)/18(31.0)/15(25.9)/0	0.899
AFP (ng/ml)	18.6(4.3-317.3)	23.6(6.9-274.2)	0.742
PIVKA-II (mAU/ml)	259(35-4260.8)	220(31.8-1969.3)	0.713
Child Pugh (A/B/C)	177(97.8)/4(2.2)/0	56(96.6)/2(3.5)/0	0.600
肝硬変 (無/有)	118(65.2)/63(34.8)	41(70.7)/17(29.3)	0.440

データはn (%) もしくは中央値 (四分位範囲) で記述

続いて、癌部の間質 VCAN と上皮 VCAN の発現でそれぞれ 2 群に分けて予後との比較をおこなった。間質 VCAN の発現において、全生存期間 (Overall survival; OS) は低発現群 (5 年生存率 : 70.9%) にくらべて高発現群 (5 年生存率 : 53.2%) で有意に予後不良であった (図 21)。また、無再発生存期間 (Relapse-free survival; RFS) は低発現群 (5 年無再発率 : 27.2%) にくらべて高発現群 (5 年無再発率 : 12.9%) で有意に再発率が高かった (図 21)。しかし、上皮 VCAN の発現での 2 群間では OS および RFS とともに明らかな有意差は認めなかった (図 22)。

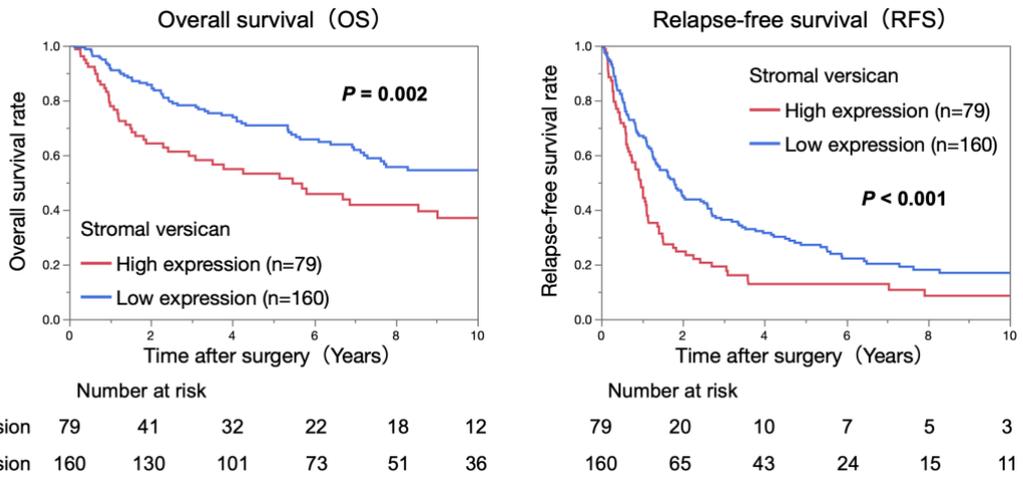


図 21 間質 VCAN 発現による HCC 患者の生存解析

HCC 患者 239 名の間質 VCAN の発現による 2 群における OS および RFS の Kaplan-Meier 曲線。間質 VCAN 高発現群は低発現群と比べると、OS および RFS の両方で有意に予後不良であった。

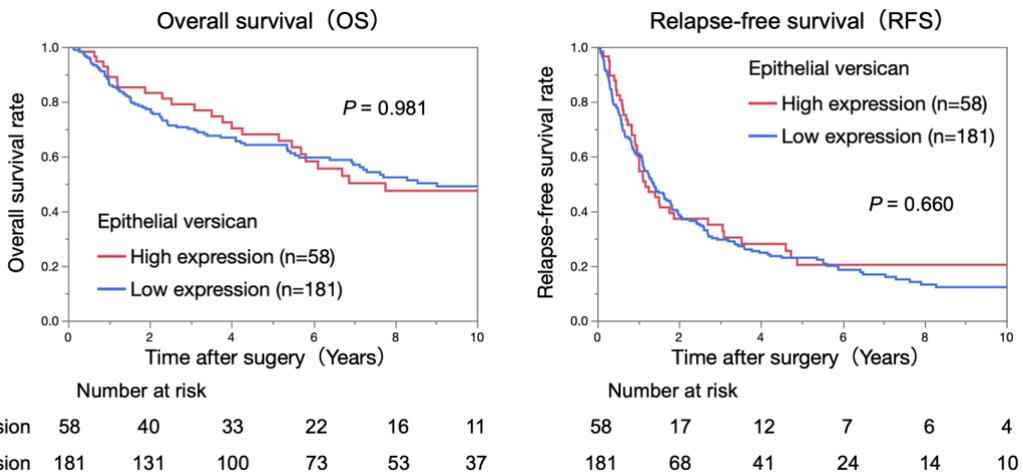


図 22 上皮 VCAN 発現による HCC 患者の生存解析

HCC 患者 239 名の上皮 VCAN の発現による 2 群における OS および RFS の Kaplan-Meier 曲線。上皮 VCAN の発現による 2 群では OS および RFS の両方で有意差を認めなかった。

次に、予後に影響を及ぼすと考えられる臨床病理学的因子と間質VCAN発現、上皮VCAN発現に関して、各因子の生存期間に与える影響の独立性をCox比例ハザードモデルで解析した。単変量解析で有意差のある因子を多変量解析の共変量とした。OSでは低分化癌 (p = 0.025)、腫瘍多発 (p < 0.001)、脈管侵襲陽性 (p = 0.011) とともに間質VCAN高発現 (p = 0.030) は独立した後予測因子であった (表18)。また、RFSでは腫瘍多発 (p = 0.001)、脈管侵襲陽性 (p = 0.001)、AFP ≥20ng/ml (p = 0.014) とともに間質VCAN高発現 (p = 0.014) は独立した再発予測因子であった (表19)。

表18. HCC患者のOSに影響を及ぼす要因の単変量および多変量解析

因子		単変量解析			多変量解析		
		HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
年齢	65歳以上	0.828	0.562-1.216	0.337			
性別	男性	1.231	0.735-2.212	0.446			
HBs Ag	陽性	0.699	0.462-1.041	0.078			
HCV Ab	陽性	1.345	0.892-1.999	0.155			
分化度	低分化	2.077	1.403-3.051	<0.001	1.649	1.066-2.538	<b>0.025</b>
腫瘍径	≥5cm	1.995	1.358-2.945	<0.001	1.230	0.747-2.039	0.418
腫瘍個数	多発	2.174	1.479-3.204	<0.001	2.013	1.355-2.998	<0.001
脈管侵襲	陽性	2.755	1.837-4.080	<0.001	1.788	1.144-2.771	<b>0.011</b>
AFP	≥20ng/ml	1.799	1.223-2.668	<b>0.003</b>	1.337	0.881-2.039	0.172
PIVKA-II	≥200mAU/ml	2.107	1.423-3.156	<0.001	1.355	0.825-2.235	0.231
肝硬変	陽性	1.149	0.768-1.695	0.494			
間質VCAN	高発現	1.882	1.227-2.683	<b>0.003</b>	1.565	1.044-2.324	<b>0.030</b>
上皮VCAN	高発現	1.006	0.652-1.607	0.981			

表 19. HCC 患者の RFS に影響を及ぼす要因の単変量および多変量解析

因子		単変量解析			多変量解析		
		HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
年齢	65 歳以上	0.838	0.632-1.111	0.220			
性別	男性	0.964	0.655-1.378	0.846			
HBs Ag	陽性	0.930	0.694-1.238	0.619			
HCV Ab	陽性	1.225	0.904-1.643	0.189			
分化度	低分化	1.314	0.969-1.764	0.079			
腫瘍径	≥5cm	1.275	0.959-1.691	0.094			
腫瘍個数	多発	1.940	1.442-2.600	<0.001	1.661	1.227-2.241	0.001
脈管侵襲	陽性	2.083	1.509-2.839	<0.001	1.746	1.249-2.410	0.001
AFP	≥20ng/ml	1.665	1.254-2.214	<0.001	1.449	1.078-1.947	0.014
PIVKA-II	≥200mAU/ml	1.667	1.256-2.217	<0.001	1.339	0.991-1.810	0.057
肝硬変	陽性	1.236	0.915-1.657	0.166			
間質 VCAN	高発現	1.724	1.279-2.308	<0.001	1.457	1.072-1.966	0.017
上皮 VCAN	高発現	1.079	0.776-1.532	0.658			

#### 4. 肝癌細胞株から CAFs への影響

癌微小環境下では癌細胞と CAFs は相互作用するとの報告がある。また、免疫組織染色の結果から、分化度の違いによって VCAN の発現差があったことより、癌細胞にも CAFs を規定する因子があると考えられた。癌細胞から分泌される液性因子によって CAFs の活性化マーカー ( $\alpha$ SMA、FAP) や VCAN の発現が変化するのかわを確認するために、共培養モデルを使用した。高分化型の肝癌細胞株である HuH-7 と共培養した CAFs はコントロール群と比較しても活性化マーカーと VCAN は明らかな有意差を認めなかった。しかし、低分化型の肝癌細胞株である HLF と共培養した CAFs はコントロール群と比較して活性化マーカーと VCAN が有意に発現の上昇を認めた (図 23)。

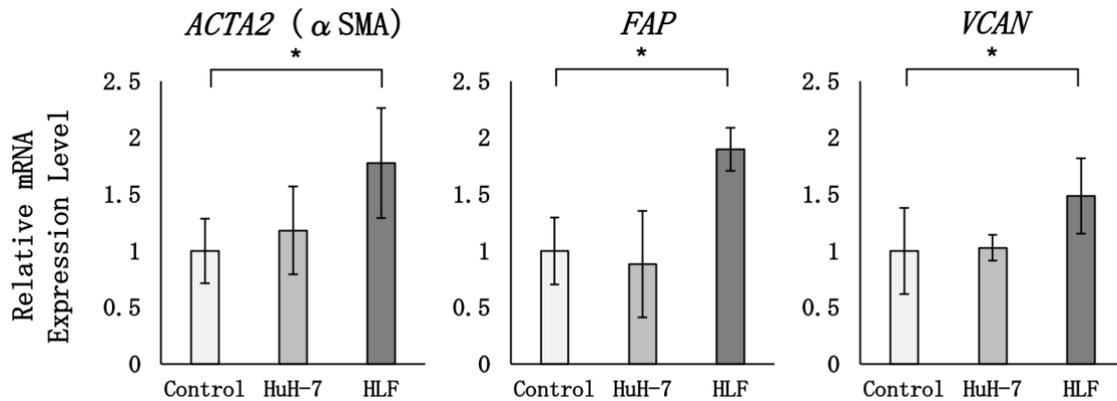


図 23 共培養による CAFs 活性化マーカーと VCAN の遺伝子発現の評価

HuH-7 ではコントロール群に比べて *ACTA2* ( $\alpha$ -SMA)、*FAP*、*VCAN* の有意な発現差は認めなかった。HLF ではコントロール群に比べて *ACTA2* ( $\alpha$ -SMA)、*FAP*、*VCAN* の有意に発現上昇を認めた。各群間を Turkey-Kramer 法により検定し、\* $P < 0.05$  として示した。

### 5. CAFs の VCAN をノックダウンした時の肝癌細胞株への影響

上記より、間質 VCAN の発現が HCC 患者の再発・予後に深く関わることがわかった。実際に VCAN の発現を抑制した CAFs が癌悪性度を低下させるかを確認するために、siRNA のトランスフェクションを試みた。初代培養した CAFs に 2 種類の siRNA (siVCAN1; s229334、siVCAN2; s229335) と Negative control (NC) として nontargeting siRNA (siNC, 4390843) をトランスフェクションした。qPCR では NC に比べて siVCAN1 と siVCAN2 が共に有意差をもって発現が低下していることを確認した (図 24a)。次にタンパクレベルでも発現が低下していること、分泌されている CM 中にも VCAN の分泌量が低下していることを確認するために、細胞・CM 中の WB と CM の ELISA をおこなった。WB では siVCAN1 では細胞および CM 中の VCAN の発現は NC と変わらなかったが、siVCAN2 では細胞および CM 中の VCAN の発現が低下していることを確認した (図 24b)。ELISA でも CM 中の VCAN の濃度を測定したが、siVCAN1 は NC と明らかな有意差はなかったが、siVCAN2 はすべてにおいて検出限度以下でありノックダウンされていることを確認した (図 24c)。siVCAN1 は RNA レベルでは発現が低下していたが、タンパク質レベルでは発現低下が確認できず不適と判断し、その後の実験では siNC と siVCAN2 を用いて実験を進めていくこととした。

VCAN をノックダウンすることで、今回 LC-MS/MS で CAFs に高発現していたタンパク質 (図 15) の発現が変動しているかの確認を qPCR でおこなった。VCAN を除いた CAFs で高発現していたタンパク質と CAFs のマーカーである  $\alpha$ SMA と FAP の測定をおこなったが、有意差のある分子はなかった (図 25)。

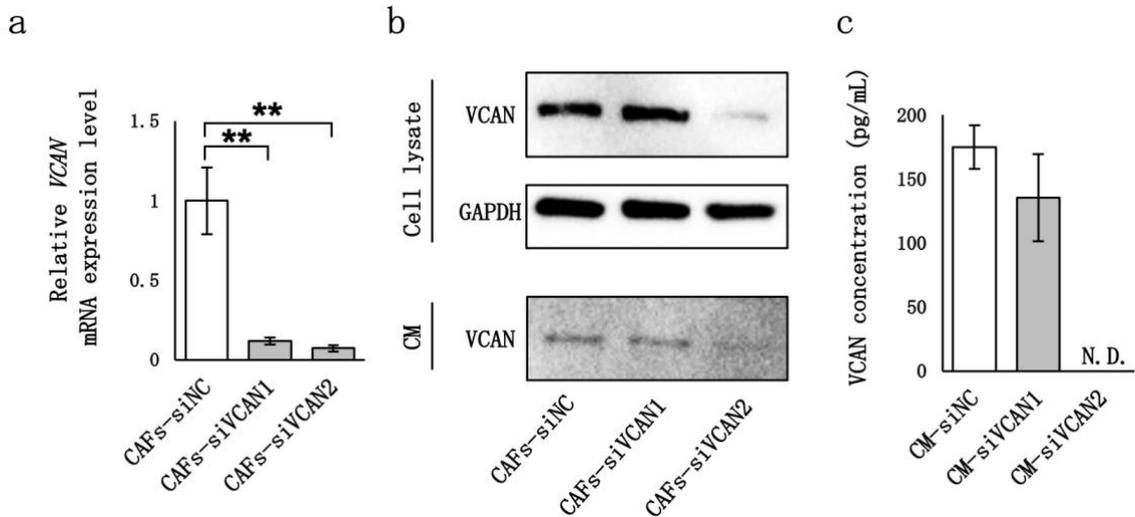


図24 siVCANによるVCANのmRNA・タンパク質発現の変化

a) mRNAレベルではNCと比べると、siVCAN1とsiVCAN2の両方で有意に発現が低下していた。b) WBでは細胞レベルではsiVCAN2のみが発現低下を認めたが、siVCAN1は発現低下を認めなかった。CM中のVCANも同様に、siVCAN2のみ分泌低下していた。c) ELISAでもWBと同様にsiVCAN2は測定限度以下であるが、siVCAN1は明らかな分泌量の低下を認めなかった。各群間をTurkey-Kramer法により検定し、\*\* $P < 0.01$ として示した。

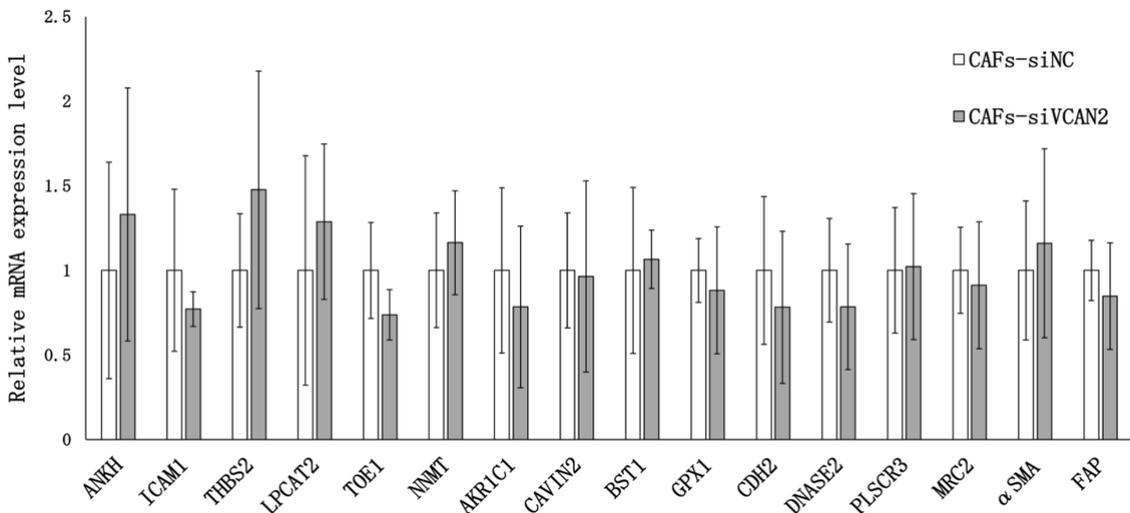


図25 siVCANによるCAF<sub>s</sub>高発現分子のmRNA発現の変化

CAF<sub>s</sub>で高発現した分子およびCAF<sub>s</sub>マーカー( $\alpha$ -SMAとFAP)はVCANをノックダウンしても、有意差のある発現変化する分子はなかった。

次にNCとsiVCAN2でノックダウンしたCAFからCMを作製し、肝癌細胞株（HuH-7、HLF）を用いて、増殖能・遊走能・浸潤能の評価をした。増殖能では、HuH-7では48時間後にsiVCAN2のCMはsiNCのCMに対して有意に増殖能が低下したが、HLFに関しては明らかな有意差は認めなかった（図26）。遊走能では、HuH-7とHLFともにsiVCAN2のCMで有意に遊走能が低下した（図27）。浸潤能では、HuH-7とHLFともにsiVCAN2のCMで有意に浸潤能が低下した（図28）。以上の結果より、CAFから分泌されたVCANは肝癌細胞株の遊走能と浸潤能を増強することがわかった。増殖能に関しては、細胞株によって異なる結果となったが、間質VCANの発現の違いによって腫瘍径には差がないという結果（表16）から、増殖能には影響が強くない可能性が考えられた。

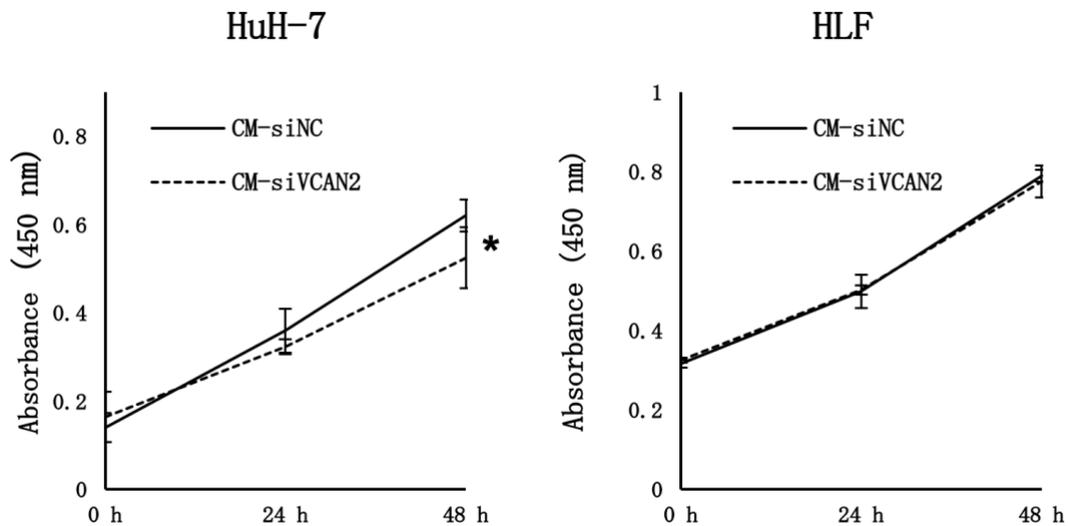


図26 VCANをノックダウンしたCAFのCMを用いた肝癌細胞株の増殖能の評価  
HuH-7ではsiVCAN2のCM群でNC群に比べて増殖能が抑制された。HLFでは明らかな有意差は認めなかった。各群間をStudentのt検定により検定し、\* $P < 0.05$ として示した。

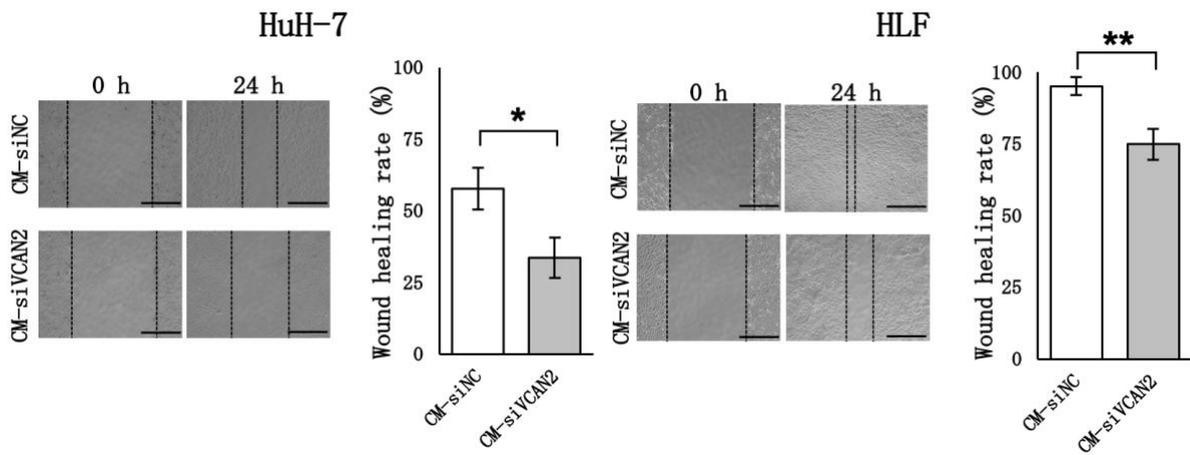


図27 VCANをノックダウンしたCAFのCMを用いた肝癌細胞株の遊走能の評価  
 siVCAN2のCM群はHuH-7およびHLFでNC群に比べて遊走能が抑制された。各群間をStudentのt検定により検定し、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ として示した。Scale bar=200  $\mu\text{m}$ 。

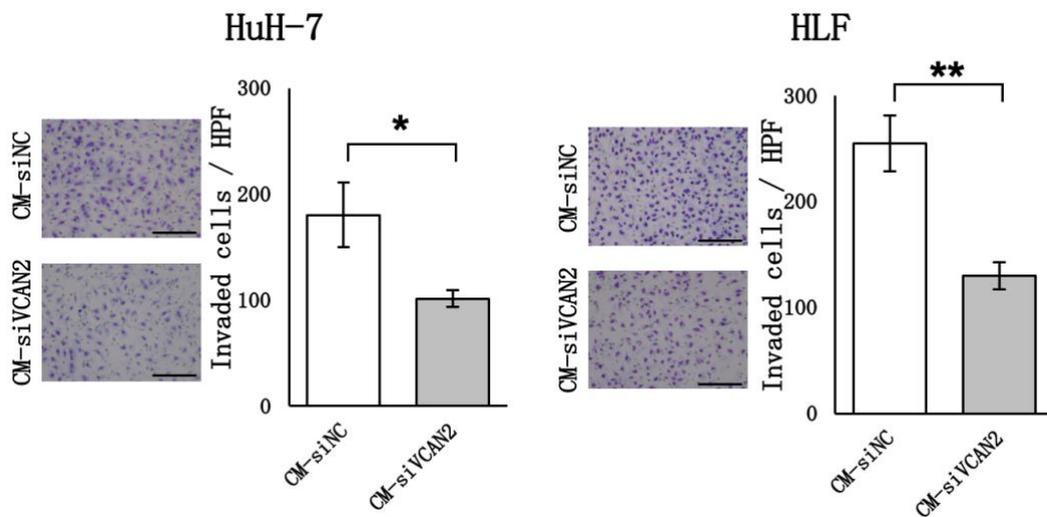


図28 VCANをノックダウンしたCAFのCMを用いた肝癌細胞株の浸潤能の評価  
 siVCAN2のCM群はHuH-7およびHLFでNC群に比べて浸潤能が抑制された。各群間をStudentのt検定により検定し、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ として示した。Scale bar=200  $\mu\text{m}$ 。

## 考 察

本研究では、HCC 患者から作製した CAFs と NFs の初代培養細胞を用いて研究をおこなった。本検討により、CAFs は NFs に比べて HCC 細胞株の増殖・遊走・浸潤能を亢進することを証明し、網羅的プロテーム解析より CAFs に VCAN が高発現していることが明らかとなった。HCC の臨床検体から、間質 VCAN の発現は予後規定因子となることが示された。CAFs の活性化マーカーと VCAN の発現は、高分化型 HCC 細胞株では有意差はないが、低分化型 HCC 細胞株との共培養で有意に発現上昇した。また、CAFs の VCAN を抑制することで、HCC 細胞株の遊走・浸潤能が抑制されることが示された。

初代培養細胞の作製法は、CAFs 研究で多く報告されている酵素処理をおこない細胞混濁液を培養する方法をおこなった (Mano et al., 2019; Sukowati et al., 2015; Yamanaka et al., 2020)。初代培養細胞が作製できたのは CAFs で 5/18 例

(27.8%)、NFs で 11/16 例 (68.8%) と CAFs で成功率が低かった。HCC はスキルス胃癌や膵臓癌などのような間質が多く存在する癌とは異なり、癌細胞が充実性に増殖し間質の観察が困難である。そのため、癌組織内の CAFs が少なく、十分発育できなかった可能性がある。その一方で、HCC を発癌する背景肝は持続的な炎症と進行性の線維化を伴う慢性肝疾患であることが多く間質が豊富である (Trautwein et al., 2015)。これらの理由が NFs に比べて CAFs での初代培養成功率が低かった理由が考えられる。

初代培養した CAFs の免疫細胞染色では CAFs のマーカーとして頻用されている  $\alpha$ -SMA が陽性であった。しかし、最近の報告では、CAFs は不均一な集団であり、 $\alpha$ -SMA 陰性の CAFs は免疫抑制作用があり、 $\alpha$ -SMA 陽性の CAFs は癌の転移性を制御していると言われている (Mhaidly and Mechta-Grigoriou, 2020)。また、癌抑制性の CAFs では Meflin が強く発現し、Meflin 陽性の CAFs は  $\alpha$ -SMA の発現が低いとの報告もある (Mizutani et al., 2019)。これらの報告から  $\alpha$ -SMA 陰性の CAFs の存在は明らかではあるが、本研究では初代培養した CAFs では確認できなかった。初代培養した際にヘテロな集団の CAFs の中で、増殖能の高い CAFs ( $\alpha$ -SMA 陽性 CAFs) のみが増殖していった可能性もある。今回おこなった酵素処理法で初代培養した CAFs の解析では、生体内のヘテロな CAFs の集団を正確に反映できていない可能性がある。したがって、今後の解析では細胞混濁液をそのままシングルセル解析する、または病理組織より間質部のみをレーザーキャプチャーマイクロダイセクションして解析する必要があると考える。

本研究の網羅的プロテオーム解析ではVCANに着目したが、上位15のタンパク質のうちNicotinamide N-methyltransferase (NNMT)はCAFsの代謝のマスターレギュレーターであることが報告されている(Eckert et al., 2019)。さらに興味深いことに、Eckertらは卵巣癌の病理検体をレーザーキャプチャーマイクロダイセクションした間質の網羅的プロテオーム解析を行っており、腹膜播種を伴う悪性度の高い卵巣癌ではNNMT以外にもVCANとTHBS2の発現が高いことを報告している。今回我々の網羅的プロテオーム解析では同一患者から作製したCAFsとNFsにこだわったためN=3と少なくなってしまったが、Eckertらの報告と類似するタンパク質がピックアップされる結果となった。その原因として、3例のうち低分化癌が2例含まれていること、全例で脈管侵襲陽性例であり悪性度の高いHCCに偏った解析になったことが考えられた。

本研究ではVCANをCAFsが癌悪性度に関与する候補タンパク質として選定した。VCANはECMの主要な構成成分であるプロテオグリカンの一種である(Iozzo, 1998)。ECMは組織中の細胞と細胞の間を満たす物質で組織の恒常性の維持に必要不可欠であり、細胞の接着・分化・増殖にも関係している(Pickup et al., 2014)。様々な細胞がECMを分泌するが、線維芽細胞がECMリモデリングの際のECMの主要な供給源と報告されている(Theocharis et al., 2019)。故に、癌微小環境内のECMはCAFsが主要な産生細胞であることが考えられる。ECMは癌の特徴を決める細胞応答の多くを制御している(Pickup et al., 2014)。VCANはヒアルロン酸などの様々なECM構成成分とタンパク質間相互作用を介して結合することが報告されている(Aspberg et al., 1997; Isogai et al., 2002; Olin et al., 2001)。したがって、VCANは癌細胞が増殖・浸潤するのに有利なECMにリモデリングするのに役割を果たしていると推察される。

VCANの免疫組織染色では、癌組織においては間質のVCANが高発現している領域は $\alpha$ -SMAが高発現している領域と一致しており、VCAN高発現している大部分がCAFsであると考えられた。同一の患者の非癌組織では $\alpha$ -SMAが高発現している領域が確認できるが、そこでVCANが高発現している領域が確認できなかった。このことは、網羅的プロテオーム解析でもCAFsにVCANが特異的に発現していることを裏付ける結果であった。本研究と同様に、上皮と間質のVCANの染色をそれぞれ評価した報告がある。子宮頸癌と膀胱癌では、上皮と間質のVCANが高発現群とともに予後不良であった(Kodama et al., 2007a; Said et al., 2012)。一方卵巣癌では我々のHCCの報告と同じく、間質のVCAN発現は予後不良であったが、上皮VCANの発現差では有意差は認めなかった(Kodama et al., 2007b)。上皮と間質をそれぞれ評価した報告では、上皮VCANの発現では予後に影響を与えるか与えないかは一貫していないが、間質の

VCAN 発現は一貫して予後不良である。これらの報告からも、間質特に CAFs での VCAN 発現が癌の悪性化に強く関与している可能性が考えられる。

HCC と VCAN の報告では、我々の癌細胞の VCAN の発現は予後に関与しないという結果とは異なり、VCAN が高発現である HCC は予後不良であると報告がある (Xia et al., 2014)。異なる結果の原因としては、まず免疫組織染色で使用した抗体が異なるという点がある。Xia らの報告で使用した抗体は 4 つある VCAN のスプライスバリエーションのうち V1 のみに対する抗体であったが、我々の使用した抗体はすべてのスプライスバリエーションに染色するものであった。本実験で染色性の確認実験で抗体 1 として使用したが、本来 VCAN の発現の低い細胞株でも強く染まってたため本実験では使用しなかった。また、上皮細胞はほとんど染色されず間質が強く染まった症例をどのように分類されたかは不明である。これらの理由で本研究とは異なる結果となったと考える。

次に共培養モデルを使用し、癌細胞から CAFs に与える変化を検証した。高分化型の HCC 細胞株である HuH-7 との共培養では CAFs では  $\alpha$ -SMA や FAP といった CAFs の活性化マーカーや VCAN の発現では有意差を認めなかった。その一方で、低分化型の HCC 細胞株である HLF では活性化マーカーおよび VCAN の発現が有意に上昇した。CAFs に TGF- $\beta$  を添加することで、CAFs の  $\alpha$ -SMA および VCAN の発現を亢進させると報告がある (Van Bockstal et al., 2014; Yeung et al., 2013)。異なる反応を示した理由としては、HCC の分化度によって癌細胞からの TGF- $\beta$  などのサイトカインの分泌量が異なる可能性が考えられる。本研究の免疫組織染色の検討でも、間質 VCAN 高発現群では有意に低分化癌が多かったのは、低分化癌からの CAFs への相互作用により CAFs の活性化上昇・VCAN 発現上昇を伴った結果である可能性もある。したがって、今後は癌細胞毎の相互作用についても検討する必要がある。

VCAN をノックダウンした実験でも、2 種類の HCC 細胞株を使用した。2 つの細胞株で遊走能・浸潤能はともに抑制されたが、増殖能に関しては HuH-7 のみ抑制された。CAFs から分泌された VCAN は NF- $\kappa$ B シグナルを活性化し、CD44、MMP-9 およびヒアルロン酸を介した運動性受容体の発現を上昇させ、癌細胞の遊走・浸潤能を促進させたことが報告されている (Yeung et al., 2013)。CAFs から分泌された VCAN が癌細胞の増殖能を亢進させた報告はないが、癌細胞や腫瘍関連マクロファージから分泌された VCAN が癌細胞の増殖能を亢進させたことが報告されている (Hu et al., 2015; Li et al., 2013)。VCAN を分泌する細胞によって作用が異なる可能性があると考えられ、今後検討する必要がある。

本研究にはいくつかのリミテーションがある。まず、本研究の結果は *in vitro* の解析のみであり、*in vivo* での研究がされていない点である。生体内の癌微小環境には癌細胞と CAFs 以外にも腫瘍関連マクロファージや腫瘍浸潤リンパ球があり、これら

の細胞との相互作用によっては異なった結果が得られる可能性は否定できない。したがって今後は、マウスモデルなどのより生体内に近い条件での解析をおこなう必要がある。

またVCANには5種類のスプライスバリエーションが存在する(Wight, 2002; Wight et al., 2020)が、本研究では詳細な検討はしていない。それぞれのスプライスバリエーションは細胞の表現型への影響に関して機能的な違いが報告されている。例えば、V1は細胞の増殖を促進しアポトーシスを抑制するが、V2は抗増殖活性をもつ(Sheng et al., 2005; Wu et al., 2001)。一方、V3はECMの形成を制御し、細胞の増殖と遊走を抑制する(Kang et al., 2015; Lemire et al., 2002)。したがって今後は、5種類のスプライスバリエーション毎の解析をおこない、それらがCAFsでどのように発現しているか、また癌細胞への相互作用についても検討する必要がある。

## 結 論

### 【本研究全体から得られた新知見】

1. 同一のHCC患者から初代培養したCAFsとNFsをLC-MS/MSすることで、CAFs特異的に発現上昇しているVCANを同定した。
2. 239例のヒトHCC切除検体において、間質VCAN高発現群では有意に低分化癌・尿管侵襲陽性が多く、有意に予後不良であった。
3. 間質VCAN高発現は独立した予後予測因子であった。
4. 低分化のHCC細胞株はCAFsの活性化マーカーとVCANの発現を上昇させた。
5. CAFsのVCANをノックダウンすることでHCC細胞株の遊走能・浸潤能を抑制させた。

### 【新知見の意義】

本研究により、HCCの間質VCANの発現が独立してHCCの予後予測因子であり、CAFsのVCANの発現がHCCの遊走・浸潤能に関わるという新知見が得られた。CAFsを標的とした治療はHCCの治療成績を向上させる可能性が示された。

### 【本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか】

本研究の進展により、CAFsを標的としたHCCの治療薬の開発に繋がり、抗癌剤と組み合わせることで最終的にHCC患者の生存率向上させることが期待される。

### 【今後の課題】

本研究により、VCANがCAFsを標的としたHCCの新規治療法になりうることを確認した。今後 *in vivo* の実験やVCANのスプライスバリエーション毎の検証をする必要があると考える。また、CAFsと癌細胞だけではなく、CAFsと腫瘍関連マクロファージや腫瘍浸潤リンパ球などの他の癌微小環境構成細胞との相互作用についても今後検証していきたいと考えている。

## 謝 辞

本博士論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究院消化器外科学分野 I 博士課程在学中において行った研究をまとめたものです。

本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご助言をいただきました北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学分野 1 教室 教授 武富紹信先生に深謝いたします。質量分析を用いた解析に関してご指導をいただきました札幌医科大学 病理学第二講座 准教授 高澤啓先生、青山智志先生に深く御礼申し上げます。病理学的評価に関してご指導いただきました北海道大学病院病理診断科 教授 松野吉宏先生、北海道大学病院ゲノム・コンパニオン診断研究部門 特任准教授 畑中豊先生、北海道大学病院先端診断技術開発センター 特任講師 畑中佳奈子先生に深く御礼申し上げます。また研究全体にわたりご協力いただきました消化器外科学分野 1 教室 肝臓グループの諸先生方、深井原先生、早坂孝宏先生に心より深く感謝申し上げます。最後に、本研究の実施にあたり、ご協力いただきましたすべての患者様に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

## 利益相反

本研究に関して、研究にバイアスをもたらす可能性のある利害関係（金銭的・個人的関係）はありません。

## 引用文献

Aspberg, A., Miura, R., Bourdoulous, S., Shimonaka, M., Heinegard, D., Schachner, M., Ruoslahti, E., and Yamaguchi, Y. (1997). The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 10116-10121.

Bogels, M., Braster, R., Nijland, P.G., Gul, N., van de Luitgaarden, W., Fijneman, R.J., Meijer, G.A., Jimenez, C.R., Beelen, R.H., and van Egmond, M. (2012). Carcinoma origin dictates differential skewing of monocyte function. *Oncoimmunology* *1*, 798-809.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* *68*, 394-424.

Cheng, A.-L., Kang, Y.-K., Chen, Z., Tsao, C.-J., Qin, S., Kim, J.S., Luo, R., Feng, J., Ye, S., Yang, T.-S., *et al.* (2009). Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology* *10*, 25-34.

Chida, S., Okayama, H., Noda, M., Saito, K., Nakajima, T., Aoto, K., Hayase, S., Momma,

T., Ohki, S., Kono, K., *et al.* (2016). Stromal VCAN expression as a potential prognostic biomarker for disease recurrence in stage II-III colon cancer. *Carcinogenesis* *37*, 878-887.

Cox, T.R. (2021). The matrix in cancer. *Nat Rev Cancer*.

Eckert, M.A., Coscia, F., Chryplewicz, A., Chang, J.W., Hernandez, K.M., Pan, S., Tienda, S.M., Nahotko, D.A., Li, G., Blazenovic, I., *et al.* (2019). Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts. *Nature* *569*, 723-728.

European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e.e.e., and European Association for the Study of the, L. (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* *69*, 182-236.

Finn, R.S., Qin, S., Ikeda, M., Galle, P.R., Ducreux, M., Kim, T.Y., Kudo, M., Breder, V., Merle, P., Kaseb, A.O., *et al.* (2020). Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* *382*, 1894-1905.

Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* *21*, 309-322.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.

Hu, F., Dzaye, O., Hahn, A., Yu, Y., Scavetta, R.J., Dittmar, G., Kaczmarek, A.K., Dunning, K.R., Ricciardelli, C., Rinnenthal, J.L., *et al.* (2015). Glioma-derived versican promotes tumor expansion via glioma-associated microglial/macrophages Toll-like receptor 2 signaling. *Neuro Oncol* 17, 200-210.

Ioannou, G.N., Green, P.K., and Berry, K. (2017). HCV eradication induced by direct-acting antiviral agents reduces the risk of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*.

Iozzo, R.V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67, 609-652.

Ishii, G., Ochiai, A., and Neri, S. (2016). Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev* 99, 186-196.

Isogai, Z., Aspberg, A., Keene, D.R., Ono, R.N., Reinhardt, D.P., and Sakai, L.Y. (2002). Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *J Biol Chem* 277, 4565-4572.

Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 392-401.

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.

Kang, I., Barth, J.L., Sproul, E.P., Yoon, D.W., Workman, G.A., Braun, K.R., Argraves, W.S., and Wight, T.N. (2015). Expression of V3 Versican by Rat Arterial Smooth Muscle Cells Promotes Differentiated and Anti-inflammatory Phenotypes. *J Biol Chem* *290*, 21629-21641.

Keire, P.A., Bressler, S.L., Lemire, J.M., Edris, B., Rubin, B.P., Rahmani, M., McManus, B.M., van de Rijn, M., and Wight, T.N. (2014). A role for versican in the development of leiomyosarcoma. *J Biol Chem* *289*, 34089-34103.

Kodama, J., Hasengaowa, Kusumoto, T., Seki, N., Matsuo, T., Nakamura, K., Hongo, A., and Hiramatsu, Y. (2007a). Versican expression in human cervical cancer. *Eur J Cancer* *43*, 1460-1466.

Kodama, J., Hasengaowa, Kusumoto, T., Seki, N., Matsuo, T., Ojima, Y., Nakamura, K., Hongo, A., and Hiramatsu, Y. (2007b). Prognostic significance of stromal versican expression in human endometrial cancer. *Ann Oncol* *18*, 269-274.

Kudo, M., Finn, R.S., Qin, S., Han, K.-H., Ikeda, K., Piscaglia, F., Baron, A., Park, J.-W., Han, G., Jassem, J., *et al.* (2018). Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of

patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet* *391*, 1163-1173.

Lemire, J.M., Merrilees, M.J., Braun, K.R., and Wight, T.N. (2002). Overexpression of the V3 variant of versican alters arterial smooth muscle cell adhesion, migration, and proliferation in vitro. *J Cell Physiol* *190*, 38-45.

Li, D., Wang, X., Wu, J.L., Quan, W.Q., Ma, L., Yang, F., Wu, K.Y., and Wan, H.Y. (2013). Tumor-produced versican V1 enhances hCAP18/LL-37 expression in macrophages through activation of TLR2 and vitamin D3 signaling to promote ovarian cancer progression in vitro. *PLoS One* *8*, e56616.

Liu, T., Zhou, L., Li, D., Andl, T., and Zhang, Y. (2019). Cancer-Associated Fibroblasts Build and Secure the Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol* *7*, 60.

Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.F., de Oliveira, A.C., Santoro, A., Raoul, J.L., Forner, A., *et al.* (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* *359*, 378-390.

Mano, Y., Yoshio, S., Shoji, H., Tomonari, S., Aoki, Y., Aoyanagi, N., Okamoto, T., Matsuura, Y., Osawa, Y., Kimura, K., *et al.* (2019). Bone morphogenetic protein 4 provides cancer-supportive phenotypes to liver fibroblasts in patients with hepatocellular

carcinoma. *J Gastroenterol* *54*, 1007-1018.

Mhaidly, R., and Mechta-Grigoriou, F. (2020). Fibroblast heterogeneity in tumor micro-environment: Role in immunosuppression and new therapies. *Semin Immunol* *48*, 101417.

Mizutani, Y., Kobayashi, H., Iida, T., Asai, N., Masamune, A., Hara, A., Esaki, N., Ushida, K., Mii, S., Shiraki, Y., *et al.* (2019). Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Res* *79*, 5367-5381.

Olin, A.I., Morgelin, M., Sasaki, T., Timpl, R., Heinegard, D., and Aspberg, A. (2001). The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *J Biol Chem* *276*, 1253-1261.

Ostman, A. (2017). PDGF receptors in tumor stroma: Biological effects and associations with prognosis and response to treatment. *Adv Drug Deliv Rev* *121*, 117-123.

Papadas, A., and Asimakopoulos, F. (2020). Versican in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* *1272*, 55-72.

Park, J.E., Lenter, M.C., Zimmermann, R.N., Garin-Chesa, P., Old, L.J., and Rettig, W.J. (1999). Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem* *274*, 36505-36512.

Petersen, E.V., Chudakova, D.A., Skorova, E.Y., Anikin, V., Reshetov, I.V., and Mynbaev, O.A. (2020). The Extracellular Matrix-Derived Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, and Personalized Therapy of Malignant Tumors. *Front Oncol* *10*, 575569.

Pickup, M.W., Mouw, J.K., and Weaver, V.M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* *15*, 1243-1253.

Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* *19*, 1423-1437.

Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D.G., Egeblad, M., Evans, R.M., Fearon, D., Greten, F.R., Hingorani, S.R., Hunter, T., *et al.* (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer* *20*, 174-186.

Said, A., and Ghufran, A. (2017). Epidemic of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. *World J Clin Oncol* *8*, 429-436.

Said, N., Sanchez-Carbayo, M., Smith, S.C., and Theodorescu, D. (2012). RhoGDI2 suppresses lung metastasis in mice by reducing tumor versican expression and macrophage infiltration. *J Clin Invest* *122*, 1503-1518.

Said, N., and Theodorescu, D. (2012). RhoGDI2 suppresses bladder cancer metastasis

via reduction of inflammation in the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* *1*, 1175-1177.

Sheng, W., Wang, G., Wang, Y., Liang, J., Wen, J., Zheng, P.S., Wu, Y., Lee, V., Slingerland, J., Dumont, D., *et al.* (2005). The roles of versican V1 and V2 isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Mol Biol Cell* *16*, 1330-1340.

Sugimoto, H., Mundel, T.M., Kieran, M.W., and Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* *5*, 1640-1646.

Sukowati, C.H., Anfuso, B., Croc , L.S., and Tiribelli, C. (2015). The role of multipotent cancer associated fibroblasts in hepatocarcinogenesis. *BMC Cancer* *15*, 188.

Tabrizian, P., Jibara, G., Shrager, B., Schwartz, M., and Roayaie, S. (2015). Recurrence of hepatocellular cancer after resection: patterns, treatments, and prognosis. *Ann Surg* *261*, 947-955.

Takahashi, Y., Kuwabara, H., Yoneda, M., Isogai, Z., Tanigawa, N., and Shibayama, Y. (2012). Versican G1 and G3 domains are upregulated and latent transforming growth factor-beta binding protein-4 is downregulated in breast cancer stroma. *Breast Cancer* *19*, 46-53.

Tateishi, R., Uchino, K., Fujiwara, N., Takehara, T., Okanou, T., Seike, M., Yoshiji, H.,

Yatsuhashi, H., Shimizu, M., Torimura, T., *et al.* (2019). A nationwide survey on non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan: 2011-2015 update. *J Gastroenterol* *54*, 367-376.

Theocharis, A.D., Manou, D., and Karamanos, N.K. (2019). The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J* *286*, 2830-2869.

Trautwein, C., Friedman, S.L., Schuppan, D., and Pinzani, M. (2015). Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol* *62*, S15-24.

Van Bockstal, M., Lambein, K., Van Gele, M., De Vlieghere, E., Limame, R., Braems, G., Van den Broecke, R., Cocquyt, V., Denys, H., Bracke, M., *et al.* (2014). Differential regulation of extracellular matrix protein expression in carcinoma-associated fibroblasts by TGF-beta1 regulates cancer cell spreading but not adhesion. *Oncoscience* *1*, 634-648.

Wight, T.N. (2002). Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Current Opinion in Cell Biology* *14*, 617-623.

Wight, T.N., Kang, I., Evanko, S.P., Harten, I.A., Chang, M.Y., Pearce, O.M.T., Allen, C.E., and Frevert, C.W. (2020). Versican-A Critical Extracellular Matrix Regulator of Immunity and Inflammation. *Front Immunol* *11*, 512.

Wu, Y., Zhang, Y., Cao, L., Chen, L., Lee, V., Zheng, P.S., Kiani, C., Adams, M.E., Ang,

L.C., Paiwand, F., *et al.* (2001). Identification of the motif in versican G3 domain that plays a dominant-negative effect on astrocytoma cell proliferation through inhibiting versican secretion and binding. *J Biol Chem* *276*, 14178-14186.

Xia, L., Huang, W., Tian, D., Zhang, L., Qi, X., Chen, Z., Shang, X., Nie, Y., and Wu, K. (2014). Forkhead box Q1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by transactivating ZEB2 and VersicanV1 expression. *Hepatology* *59*, 958-973.

Yamanaka, T., Harimoto, N., Yokobori, T., Muranushi, R., Hoshino, K., Hagiwara, K., Gantumur, D., Handa, T., Ishii, N., Tsukagoshi, M., *et al.* (2020). Nintedanib inhibits intrahepatic cholangiocarcinoma aggressiveness via suppression of cytokines extracted from activated cancer-associated fibroblasts. *Br J Cancer* *122*, 986-994.

Yeung, T.L., Leung, C.S., Wong, K.K., Samimi, G., Thompson, M.S., Liu, J., Zaid, T.M., Ghosh, S., Birrer, M.J., and Mok, S.C. (2013). TGF-beta modulates ovarian cancer invasion by upregulating CAF-derived versican in the tumor microenvironment. *Cancer Res* *73*, 5016-5028.