

Title	肝細胞癌サブクラス分類が悪性度を反映する機序の解明と診断への応用
Sub Title	Research of useful molecular markers for hepatocellular carcinoma subclassification and the application to pathological diagnosis
Author	辻川, 華子(Tsujikawa, Hanako)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>肝細胞癌におけるERK核内発現強度・割合に基づき3群に分類したところ、ERK活性化肝細胞癌は血清αフェトプロテイン高値で低分化であり、脈管侵襲が多く、Cytokeratin19やSALL4等の胆管上皮/幹細胞マーカー、細胞増殖や癌の悪性化に関連するとされるc-MET、細胞増殖を反映するKi-67の高発現を呈し、高悪性度とされる胆管上皮/幹細胞マーカー陽性群に多く見られた。</p> <p>また肝細胞癌の腫瘍内コラーゲンおよびエラスチン線維の定量解析を行い、臨床病理放射線学的に検討したところ、腫瘍内線維に富む肝細胞癌は、胆管上皮/幹細胞マーカー陽性群に多く見られた。</p> <p>Hepatocellular carcinoma (HCC) were classified into three groups based on the intensity and ratio of ERK nuclear expression. ERK-activated hepatocellular carcinoma is poorly differentiated with high serum alpha-fetoprotein levels, high vascular invasion, and high expression of Cytokeratin19 and SALL4, c-MET, ki-67, which is associated with cell proliferation and tumor malignancy. Quantitative analysis of intratumoral collagen and elastin fibers in HCC and clinico-pathoradiological study showed that stromal fiber-rich HCC were significantly associated with the biliary/stem cell markers-positive HCC subtype and likely represent a distinct clinico-pathoradiological entity.</p>
Notes	<p>研究種目：若手研究 (B) 研究期間：2017～2020 課題番号：17K15655 研究分野：肝細胞癌</p>
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K15655seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K15655seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15655

研究課題名(和文)肝細胞癌サブクラス分類が悪性度を反映する機序の解明と診断への応用

研究課題名(英文) Research of useful molecular markers for hepatocellular carcinoma subclassification and the application to pathological diagnosis

研究代表者

辻川 華子 (TSUJIKAWA, HANAKO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：30528170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌におけるERK核内発現強度・割合に基づき3群に分類したところ、ERK活性化肝細胞癌は血清 α-フェトプロテイン高値で低分化であり、脈管侵襲が多く、Cytokeratin19や SALL4等の胆管上皮/幹細胞マーカー、細胞増殖や癌の悪性化に関連するとされるc-MET、細胞増殖を反映するKi-67の高発現を呈し、高悪性度とされる胆管上皮/幹細胞マーカー陽性群に多く見られた。

また肝細胞癌の腫瘍内コラーゲンおよびエラスチン線維の定量解析を行い、臨床病理放射線学的に検討したところ、腫瘍内線維に富む肝細胞癌は、胆管上皮/幹細胞マーカー陽性群に多く見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果からは、ERK活性化が肝細胞癌の予後因子の一つであることが判明し、線維成分に富む肝細胞癌は、臨床病理放射線学的に特徴的な一群として認識されることが分かった。いずれも高悪性度とされる胆管上皮/幹細胞マーカー陽性群に関連しており、すぐに日常診断時に用いるのは難しいものの、肝細胞癌悪性度に関連する重要な因子である。さらに、肝細胞癌治療薬として用いられるsorafenibによりERKリン酸化および細胞増殖能が抑制されることも報告しており、将来的に治療選択に繋がる可能性が考えられた。

肝細胞癌のサブクラス分類は腫瘍悪性度を推し量ることができ、患者の治療選択や予後予測に重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) were classified into three groups based on the intensity and ratio of ERK nuclear expression. ERK-activated hepatocellular carcinoma is poorly differentiated with high serum alpha-fetoprotein levels, high vascular invasion, and high expression of Cytokeratin19 and SALL4, c-MET, ki-67, which is associated with cell proliferation and tumor malignancy.

Quantitative analysis of intratumoral collagen and elastin fibers in HCC and clinico-pathoradiological study showed that stromal fiber-rich HCC were significantly associated with the biliary/stem cell markers-positive HCC subtype and likely represent a distinct clinico-pathoradiological entity.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：肝細胞癌 サブクラス分類 腫瘍悪性度

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は癌による死因の中で大きな割合を占め、術後短期間で再発する予後の悪い群が存在することから、肝細胞癌の中でも生物学的な悪性度の違いがあると考えられていた。肝細胞癌の悪性度の違いには、腫瘍の構造異型に基づく分化度の程度、門脈侵襲ないし肝内転移の有無、細胞増殖能などの因子が関連し、また肝細胞癌の悪性度に関連する分子に関しては国内外の報告が見られた。しかし、それらマーカー分子を統括した免疫組織学的サブクラス分類の報告は明らかではなく、申請者は肝細胞癌の発生進展にかかわる分子パネルの発現を免疫組織学的に解析し、悪性度を反映するサブクラスに分類可能であることを報告した。その結果、肝細胞癌は胆管上皮/幹細胞マーカー陽性群 (biliary/stem cell marker positive group: B/S group)、WNTシグナル伝達関連マーカー陽性群 (Wnt/ catenin related marker positive group: W/B group)、両陰性群 (all negative group: -/- group) の3群に分類された。胆管上皮/幹細胞マーカー陽性群では、血清αフェトプロテイン(AFP)高値で分化度が低く、門脈侵襲・肝内転移が陽性で、高い細胞増殖能を示す例が多く、両陰性群では反対の結果であり、WNTシグナル伝達関連マーカー陽性群は中間の性質を示し、結果的に各群は高・中・低悪性度を反映すると考えられた。この分類は、今までにDNAマイクロアレイ解析などにより提唱されたサブクラス分類と整合性が見られる上、より臨床応用可能で実践的である利点を有していた。しかし、サブクラスごとに異なる悪性度を示す機序に関する知見は乏しく、この点が一層明らかになれば、より精度の高い診断さらには治療法の選択にも結び付くと期待された。

### 2. 研究の目的

本研究では、シグナル伝達異常、浸潤転移に関する分子群の解析を介してサブクラスの悪性度を反映する機序を解明することを目指し、さらに得られた候補分子群で新たなサブクラス分類の構築に向けた臨床病理学的有用性を検討し、より有用なサブクラス分類を確立することを目的とした。また悪性度に関わるマーカー分子と治療薬の選択の関連の解明も目標の一つとされた。

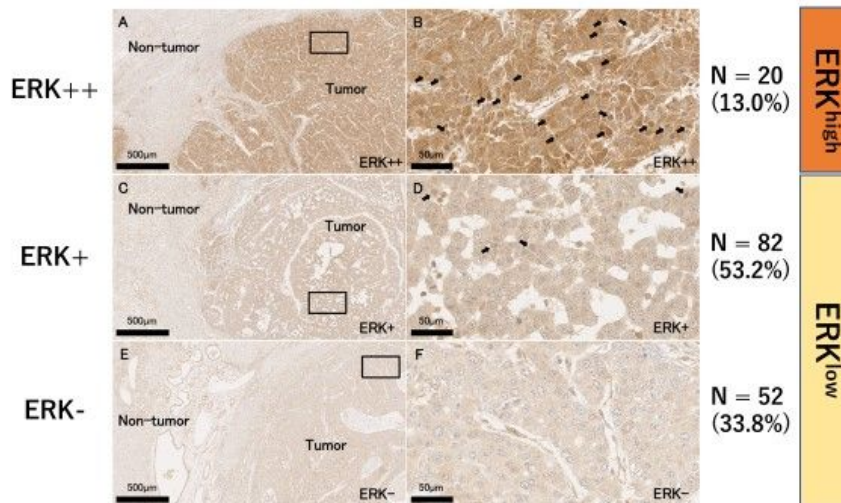
### 3. 研究の方法

本研究では肝細胞癌サブクラス分類における悪性度の差の解明と診断への応用という目的に向け、(1)シグナル伝達異常に関する分子機構の解明、(2)浸潤転移能に関与する上皮間葉転換(EMT: epithelial mesenchymal transition/epithelial to mesenchymal transition)分子と腫瘍悪性度との関連を検討し、さらに(1)(2)の結果を関連付けた(3)新たなサブクラス分類の構築に向けた臨床病理学的有用性の検討を行った。具体的には、(1)ではExtracellular signal-regulated kinase (ERK)分子、(2)では肝細胞癌でEMT誘導に関連する分子に着目し、肝細胞癌細胞株を用いて機能を解析した。また、得られた候補分子群で肝細胞癌手術検体および肝生検の組織切片、組織マイクロアレイを用いた免疫組織化学的発現解析を行い、検討した結果を臨床病理学的因子および予後を含む臨床データと関連付けて検討した。また肝細胞癌手術検体の中で線維化の目立つものがあることに着目し、線維定量解析結果と放射線学的画像検討結果、組織学的所見、および臨床病理学的因子および予後を含む臨床データと合わせて検討し、より有用なサブクラス分類の構築を試みた。

### 4. 研究成果

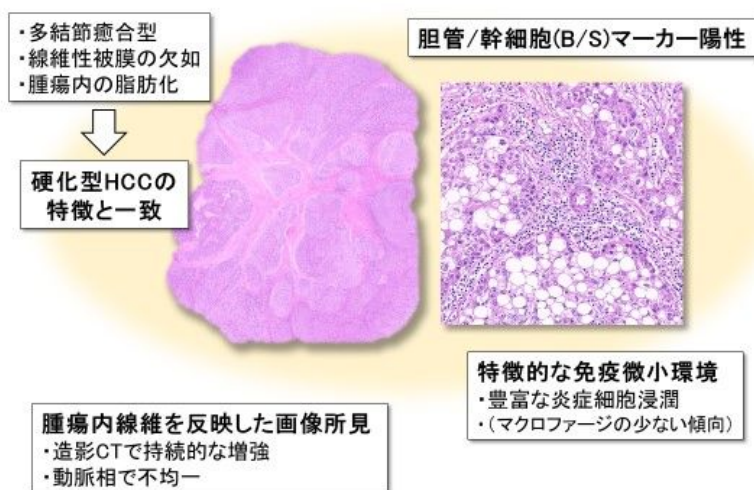
肝細胞癌におけるERK核内発現強度・割合に基づきERK++(N=20:13.0%)、ERK+(N=82:53.2%)、ERK-(N=52:33.8%)の3群に分類し、Total ERK抗体を用いた免疫組織染色において腫瘍細胞の核内でERKが検出されたものを活性化ERK症例(ERK high)、その他は活性化を伴わない症例(ERK low)として検討した(図1)。ERK活性化を伴う肝細胞癌は血清フェトプロテイン高値で低分化であり、脈管侵襲が多く、Cytokeratin19やSALL4等の胆管上皮/幹細胞マーカー、細胞増殖や癌の悪性化に関連するとされるc-MET、細胞増殖を反映するKi-67の高発現を呈し、ERK活性化の見られない肝細胞癌に比べて、高悪性度とされる胆管上皮/幹細胞マーカー陽性群に多く見られた。また肝細胞癌細胞株にHepatocyte growth factor (HGF)を投与することでERKが活性化すると同時に、腫瘍悪性度に関連するKeratin 19 (KRT19)が誘導されることを明らかにした。さらに、肝細胞癌治療薬として用いられるsorafenibによりERKリン酸化および細胞増殖能が抑制されることも報告した。ERK活性化/KRT19高発現肝細胞癌に対するSorafenibを含む分子標的薬を軸とした術前補助化学療法の治療効果の検討も将来的に考えられる結果であった。予後不良なサブタイプであるERK活性化肝細胞癌の臨床病理学的特徴を示し、HGF-c-MET-ERK経路の活性により腫瘍悪性度に強く関わるKRT19の発現が誘導されることを示した点において、基礎研究のみならず実臨床に通ずる有意義な成果であると考えられた。

図1：肝細胞癌切除検体におけるERK発現



(2) 肝細胞癌外科切除例のデジタルスライドを用い、定量解析による腫瘍内コラーゲンおよびエラスチン線維の線維占有率を計算した。得られた線維量のデータと、免疫組織化学に基づく分子サブグループ分類および免疫サブタイプを含めた臨床病理学的特徴や造影 CT 所見との相関を評価したところ、肝細胞癌内のコラーゲンの線維量は、エラスチンの線維量の約3倍であり、両者には強い正の相関を認めた。線維量の高い肝細胞癌は、多結節癒合型、線維性被膜の欠如、腫瘍内の脂肪沈着、硬化型 HCC の線維性間質、腫瘍内の密な炎症細胞浸潤と有意に相関し、免疫組織化学に基づく肝細胞癌サブクラス分類では、肝細胞癌は胆管上皮/幹細胞マーカー陽性群 (B/S group) の肝細胞癌で線維量が高い一方、WNT シグナル伝達関連マーカー陽性群 (W/B group) の肝細胞癌では線維量が少なかった。コラーゲン線維量は、造影 CT 動脈相における不均一な増強と、平衡相にかけての遷延性増強と有意に相関した。また肝細胞癌内の線維性間質には、主に中隔状線維化および類洞周囲線維化の2パターンがあり、それぞれ異なった線維成分や線維芽細胞の分布様式を示すことが分かった腫瘍内線維に富む肝細胞癌は、臨床病理放射線学的に特徴的な一群であると考えられた (図2)。

図2：腫瘍内線維に富むHCCの特徴



臨床病理放射線学的に特徴的な一群であることが示唆された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Minagawa T, Yamazaki K, Masugi Y, Tsujikawa H, Ojima H, Hibi T, Abe Y, Yagi H, Kitago M, Shinoda M, Itano O, Kitagawa Y, Sakamoto M.	4. 巻 2020 Mar;50(3)
2. 論文標題 Activation of extracellular signal-regulated kinase is associated with hepatocellular carcinoma with aggressive phenotypes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Reserch	6. 最初と最後の頁 353-364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13445	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maehara J, Masugi Y, Abe T, Tsujikawa H, Kurebayashi Y, Ueno A, Ojima H, Okuda S, Jinzaki M, Shinoda M, Kitagawa Y, Oda Y, Honda H, Sakamoto M.	4. 巻 2019 Dec 30.
2. 論文標題 Quantification of intratumoral collagen and elastin fibers within hepatocellular carcinoma tissues finds correlations with clinico-patho-radiological features.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Reserch	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13484	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻川華子、山崎剣、眞杉洋平、坂元亨宇.
2. 発表標題 肝細胞癌におけるインテグリン 4発現の意義.
3. 学会等名 第106回病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻川華子、尾島英知、坂元亨宇
2. 発表標題 肝細胞癌の免疫組織化学的サブクラス分類
3. 学会等名 第54回日本肝癌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 皆川卓也、山崎剣、真杉洋平、辻川華子、尾島英知、日比泰造、阿部雄太、八木洋、北郷実、篠田昌弘、板野理、坂元亨宇、北川雄光
2. 発表標題 ERK活性化に基づく臨床に即した肝細胞癌組織亜分類の検討
3. 学会等名 第54回日本肝癌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻川華子
2. 発表標題 肝細胞癌の免疫組織学的サブクラス分類
3. 学会等名 病理学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学病理学教室 <a href="http://www.keio-pathology.net/sakamoto_group.html">http://www.keio-pathology.net/sakamoto_group.html</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------