

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	本田 博樹
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 784 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Overexpression of a disintegrin and metalloproteinase 21 is associated with motility, metastasis, and poor prognosis in hepatocellular carcinoma (肝細胞癌における ADAM21 の過剰発現は運動性, 転移性および予後に関与する)
論文審査委員	主査 教授 小松 雅明 副査 講師 川合 弘一 副査 教授 寺井 崇二

博士論文の要旨

【背景と目的】

肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) は近年の診断と治療法の進歩により生命予後の改善がみられているが, 依然根治術後の再発率が高く, 1 年で約 30%, 5 年では約 80% と報告されている. よって, HCC の生物学的悪性度を加味した新たな治療戦略が求められている. 申請者らはこれまでに *in vitro* で高運動性の HCC 培養細胞株が, *in vivo* で高率に肝内転移をきたすことから, 細胞運動は HCC の肝内転移に重要な役割を果たしていることを報告してきた. 今回, 細胞運動に関与していることが報告されている a disintegrin and metalloprotease (ADAM) family に注目し, HCC における発現とその生物学的意義を検討した.

【方法】

これまでに報告されているプロテアーゼ活性を有する 12 種類の ADAM family (ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30, 33) について, 高運動性高転移性の HCC 株 KYN-2 と低運動性低転移性肝 HCC 株 PLC/PRF/5 と HepG2 に大腸癌肝転移症例の非腫瘍部肝組織を加え, リアルタイム PCR で発現を検討した. KYN-2 で発現が高く PLC/PRF/5, HepG2, 大腸癌肝転移非腫瘍部肝組織で発現が低い ADAM family の中で ADAM21 に注目した. ADAM21 発現の意義を検討するため, *puromycin* 耐性遺伝子を有する ADAM21 siRNA および control siRNA ベクター (piGENE vector) を用いて, KYN-2 に lipofection 法で遺伝子導入をし, *puromycin* 投与下培養で安定細胞株を樹立した.

In vitro では, 細胞増殖・遊走・浸潤能について, ADAM21 siRNA 安定発現株 (ADAM21 siRNA 株), control siRNA 安定発現株 (control siRNA 株), KYN-2 親株 (親株) の比較を行った. *In vivo* では, ADAM21 siRNA 株と control siRNA 株を SCID マウス (6 週齢, 雄) の肝皮膜下に注入し, 4 週後に犠牲死させ肝内転移の状況を評価した.

さらに, 2001 年から 2008 年までに当院で初回肝切除を受けた TNM stage I~III の HCC 連続症例 119 例を対象とし, 免疫染色法にて ADAM21 の発現を検討した. 非腫瘍細胞に比し腫瘍細

胞で強い染色性のみられた症例を陽性例とし、臨床病理学的因子との関連を検討した。

【結果】

HCC 細胞株におけるプロテアーゼ型 ADAM ファミリーの mRNA 発現解析

ADAM17, 19, 21 が PLC/PRF/5, HepG2 および大腸癌肝転移症例の非腫瘍部肝組織よりも KYN-2 で高い発現を示した。ADAM17, 19 は癌における報告が多数されていることから、癌における発現や機能が知られていない ADAM21 に注目し解析を進めた。

ADAM21 siRNA 株の細胞形態変化と増殖・遊走・浸潤アッセイにおける効果

運動能の亢進した細胞の細胞膜には波打ち様のラフリング形成がみられる。親株・control siRNA 株は、ラフリングを形成した細胞が多くみられ、解離・分散しているのに対し、ADAM21 siRNA 株ではこの変化がみられる細胞は少なく胞巣状になることが判明した。細胞増殖については、ADAM21 siRNA 株は control siRNA 株や親株と比較して有意に低下することが明らかになった ($P < 0.05$)。この ADAM21 siRNA 株の増殖能の低下は、control siRNA 株に比べ G0/G1 期の細胞の割合が多くなり ($P < 0.01$)、アポトーシスが誘導されていることが判明した。また ADAM21 siRNA 株は、control siRNA 株や親株と比較して遊走・浸潤能も有意に抑制されることが判明した。

ADAM21 siRNA 株のマウス同所性移植モデルにおける腫瘍形成・肝内転移形成における効果

全てのマウスで ADAM21 siRNA 株もしくは control siRNA 株を注射した肝葉に腫瘍形成がみられ、腫瘍最大径は ADAM21 siRNA 群は control siRNA 群よりも小さい傾向がみられた。組織学的肝内転移については、ADAM21 siRNA 群注入マウスでは control siRNA 群注入マウスよりも肝内転移の発生個体数が少なかった。

HCC における ADAM21 の発現と臨床病理学的因子との関連

ADAM21 の発現は腫瘍細胞および一部の肝細胞の細胞質にみられた。ADAM21 陽性例は 25/119 例 (21.0%) であった。ADAM21 陽性例では陰性例と比較し腫瘍が大きく ($P = 0.004$) 分化度が低く ($P = 0.014$)、脈管浸潤陽性 ($P = 0.005$) 症例が多くみられた。ADAM21 陽性例は陰性例に比し、全生存率 ($P = 0.001$)、無再発生存率 ($P < 0.001$) とともに不良であった。多変量解析により、ADAM21 発現陽性は独立した予後規定因子 ($P = 0.003$)、再発危険因子 ($P = 0.001$) として抽出された。

【考察】

本研究では、細胞運動が HCC の肝内転移に重要な役割を果たしているという過去の知見をもとに、細胞運動に関与するタンパク質の一つである ADAM family の中から ADAM21 に注目し解析を行った。ADAM21 はヒト精巣特異的な膜型メタロプロテアーゼとして 1998 年に報告され、最近では src 活性化による浸潤能亢進に関与する遺伝子として同定された。今回の報告はこの以前の報告を支持するものであり、ADAM21 の knockdown は細胞増殖・遊走・浸潤能を低下させた。これらの結果は、ADAM の基質切断によるものかインテグリンとの相互作用によるものか詳

細は不明であり、今後の検討課題である。また *in vivo* でも、肝内転移は抑制されたが完全に消失したわけではなく、他にも肝内転移に関与するシグナルが存在することを示唆するものである。

臨床病理学的には、HCCにおけるADAM21発現陽性例は陰性例に比べ予後不良で、生物学的悪性度の高い症例が多かった。これらの結果は *in vitro* および *in vivo* での結果を反映するものである。

結論として、ADAM21を介した細胞運動は、HCCの肝内転移に重要な役割を果たしており、HCCの生物学的悪性度の有用な指標となり得ることが示唆された。本分子を標的とした新たな治療戦略が根治術後のHCCの肝内再発を予防するための有効な手段となり得ることが期待される。

審査結果の要旨

【背景と目的】 肝細胞がん (HCC) は近年の診断と治療法の進歩により生命予後の改善がみられているが、依然根治術後の再発率が高く HCC の生物学的悪性度を加味した新たな治療戦略が求められている。本研究では、細胞運動に関与する a disintegrin and metalloprotease (ADAM) family に注目し、HCCにおける発現とその生物学的意義を検討した。

【方法】 12種類のADAM familyについて、高運動性高転移性のHCC株 KYN-2と低運動性低転移性肝HCC株 PLC/PRF/5、HepG2そして大腸癌肝転移症例の非腫瘍部肝組織を加え、リアルタイムPCRで遺伝子発現を検討した。KYN-2で発現が高いADAM21に注目した。ADAM21発現の意義を検討するため、ADAM21 siRNA安定発現株 (ADAM21 siRNA株) を樹立した。*In vitro*では、細胞増殖および遊走・浸潤能について、ADAM21 siRNA株、control siRNA安定発現株 (control siRNA株)、KYN-2親株 (親株) の比較を行った。*In vivo*では、ADAM21 siRNA株とcontrol siRNA株をSCIDマウスの肝皮膜下に注入し、肝内転移を評価した。さらに、TNM stage I~IIIのHCC連続症例119例を対象とし、免疫染色法にてADAM21の発現を検討した。非腫瘍細胞に比し腫瘍細胞で強い染色性のみられた症例を陽性例とし、臨床病理学的因子との関連を検討した。

【結果】 ADAM17, 19, 21がKYN-2で高い発現を示した。これらのうち、機能未知のADAM21に注目し解析を進めた。運動能の亢進した細胞の細胞膜でみられる波打ち様のラフリング形成、および細胞の解離・分散が親株やcontrol siRNA株において確認されたのに対し、ADAM21 siRNA株ではこれらの変化が乏しかった。ADAM21 siRNA株はcontrol siRNA株や親株と比較して細胞増殖、遊走・浸潤能が有意に抑制されていた。

SKIDマウスにADAM21 siRNA株もしくはcontrol siRNA株を注入すると肝葉に腫瘍形成が確認され、腫瘍最大径はADAM21 siRNA群はcontrol siRNA群よりも小さい傾向がみられた。肝内転移についても、ADAM21 siRNA群注入マウスはcontrol siRNA群注入マウスと比して肝内転移の発生個体数が少なかった。

HCC切片を用いたADAM21免疫染色から、ADAM21の発現は腫瘍細胞および一部の肝細胞の細胞質にみられた。ADAM21陽性例は25/119例 (21.0%) であった。ADAM21陽性例では陰性例と比較し腫瘍が大きく、分化度が低く、脈管浸潤陽性症例が多くみられた。ADAM21陽性例は陰性例に比し、全生存率、無再発生存率ともに不良であった。多変量解析により、ADAM21発現陽性は独立した予後規定因子、再発危険因子として抽出された。

【考察】 本研究より、ADAM21 を介した細胞運動は、HCC の肝内転移に重要な役割を果たしていること、そして HCC の生物学的悪性度の有用な指標となり得ることが示された。本分子を標的とした新たな治療戦略が根治術後の HCC の肝内再発を予防するための有効な手段となることが期待される。

【学位論文としての価値の有無】 上述の新規性を鑑みて、学位論文としての価値を有すると判断した。