

主論文の要旨

**Clinical implication of Frizzled 2 expression and
its association with epithelial-to-mesenchymal
transition in hepatocellular carcinoma**

肝細胞癌における Frizzled 2 発現の臨床的意義と
上皮間葉転換との関連

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

浅野 智成

【緒言】

肝細胞癌は生物学的悪性度が高く、世界における癌の死亡原因の第2位である。現在、外科的切除をはじめとしたさまざまな治療の進歩があるものの、5年生存率は50%にも満たない。

上皮間葉転換(Epithelial-to-mesenchymal transition: EMT)は、肝細胞癌の浸潤や転移において極めて重要なメカニズムである。EMTには様々なシグナル伝達経路が知られ、中でもβカテニンを介するWntシグナル経路が多く報告されてきた。しかしながら、Frizzled 2 (Fzd2)は、βカテニンを介さない非典型的なWnt経路を介しEMTを制御している可能性が示唆されている。

本研究では、肝細胞癌におけるFzd2の発現と機能につき*in vitro*で調べ、EMTとの相関を検討した。また、当教室の肝細胞癌切除検体において、臨床病理学的因子・予後との関連性についても解析した。

【対象及び方法】

15種類のヒト肝細胞癌細胞株(HepG2, HuH-7, HuH-2, Hep3B, SNU182, PLC/PRF/5, HLE, SNU398, SNU449, SNU387, HLF, SNU475, HuH-1, Focus, SK-Hep)と、当教室にて外科的切除術を施行した100例を対象とし、癌部及び非癌部を臨床検体として用いた。細胞株と臨床検体凍結切片からmRNAを抽出し、Fzd2、Eカドヘリン及びビメンチンの発現を定量PCR法によって測定した。

細胞株においては、Fzd2に関連するWnt5b、Stat3、IL-6、Jak2の発現についても定量PCR法にて測定した。また、Fzd2の発現をsiRNAによりノックダウンさせ、増殖能、遊走能、浸潤能につき機能解析を行った。

ビメンチン/Eカドヘリン比(V/E ratio)をEMT statusと定義し、V/E ratio<2を上皮系群(Epithelial type)、V/E ratio≥2を間葉系群(Mesenchymal type)とした。Fzd2の発現については、癌部及び非癌部のmRNAをそれぞれ測定し、癌部/非癌部によりFzd2<2であれば低発現群、Fzd2≥2以上であれば高発現群とした。

Stat3に関しては免疫染色を行い、陰性、弱陽性、中等度陽性、強陽性と4段階に分類し、Fzd2の発現及びEMT statusとの関連性を検討した。

【結果】

ヒト肝細胞癌細胞株15種類において、mRNAレベルではWnt5bの発現はMesenchymal typeに高い傾向であり、Stat3、IL-6、Jak2、Fzd2の発現はMesenchymal typeにおいて有意に高かった(Figure 1 A-E)。Fzd2の発現については、5種類でEpithelial type、9種類でMesenchymal typeであった(Figure 1F)。

Fzd2の発現をsiRNAによりタンパクレベル及びmRNAレベルでノックダウンされていることを確認した後、機能解析を行った(Figure 2A)。機能解析では、増殖能には差を認めなかったが、遊走能及び浸潤能においては有意差を認めた(Figure 2B-D)。

100例の臨床検体における検討では、Fzd2高発現群とMesenchymal typeは有意

な相関を認めた($P<0.0001$) (Table 1) (Figure 3A-B)。Fzd2 高発現群は低発現群に比較して、無再発生存期間が短縮されていたが($P=0.03$)、全生存期間においては両群間に有意差を認めなかった(Figure 3C-D)。同様に、Mesenchymal type は Epithelial type と比較して、無再発生存期間が短く($P=0.023$)、全生存期間では両群間に差を認めなかった(Figure 4)。

無再発生存期間における再発予測因子の多変量解析では、Fzd2 高発現は有意な独立再発予測因子であった(Table 2)。

さらに、Stat3 の免疫染色では、陰性 60 例、弱陽性 28 例、中等度陽性 11 例、強陽性 1 例と分類され(Figure 5A)、陰性群(60 例)と陽性群 (40 例)において、Stat3 陽性群にて V/E ratio 及び Fzd2 発現が有意に高値であった(Figure 5B)。

【考察】

肝細胞癌をはじめとしたさまざまな悪性腫瘍において、癌の浸潤や転移は治療において大きな障害となる。特に、EMT は肝細胞癌においても重要なメカニズムと考えられている。そのため、癌の浸潤や転移を制御するためには、EMT のメカニズムの解明が求められている。

EMT は、TGF β 、Wnt、EGF や HGF がトリガーとなることが広く知られている。特に、Wnt5 は進行肝細胞癌において高発現し、さらにまた、Fzd2 は肺癌や進行肝細胞癌において高発現し、予後不良との報告が散見される。本研究においては当教室で切除した肝細胞癌に対して、Fzd2 の発現、EMT との相関、予後について調査した。その結果、Fzd2 の発現は Mesenchymal type と有意に相関し、さらに EMT status 及び Fzd2 の発現は無再発生存期間と有意に相関した。以上より、Fzd2 は EMT の過程において重要な役割を担い、Fzd2 の発現が肝細胞癌に対する外科的切除後の再発に関して有意な予測因子となる可能性が示唆された。

近年、Stat3 を経由するシグナル伝達経路も多く報告されるようになり、Stat3 の活性化が腫瘍の浸潤及び転移と関連していることが指摘されている。本研究における Stat3 の免疫染色の陽性率は 40%であったが、Stat3 は EMT status 及び Fzd2 の発現と強く相関していたため、Stat3 は、Fzd2 依存の EMT との関連性が示唆された。また、siRNA を使用して Fzd2 の発現をノックダウンした結果、遊走能と浸潤能は抑制されたが、増殖能には影響を及ぼさなかったことより、増殖能に関しては、Wnt5/Fzd2 経路とは別のシグナル経路があると考えられた。

EMT は幹細胞の多面的な細胞分化にも関係し、我々は以前に IL-6 が Stat3 を活性化することを報告しており、Janus kinase (Jak)が Stat3 を活性化する IL-6 に必要であることは知られている。Stat3 は Wnt5/Fzd2 及び IL-6/Jak2 のシグナルにおいて下流に存在するため、我々は Wnt5/Fzd2 が遊走能及び浸潤能に関連し、IL-6/Jak2 が増殖能及び幹細胞の制御に関連すると考えた。以上より、肝細胞癌における EMT の過程においては少なくとも 2 つのシグナル経路が関与しており、これらの制御が有効である可能性が示唆された。

【結語】

肝細胞癌において、Fzd2 は EMT を制御し、独立した再発予測因子であった。さらにまた、Wnt5/Fzd2 及び IL-6/Jak2 の 2 つのシグナル経路が Stat3 を制御し、EMT において重要な役割を果たす可能性が示唆された。