

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Human collagen XV is a prominent histopathological component of sinusoidal capillarization in hepatocellular carcinogenesis

(XV 型コラーゲンはヒト肝細胞癌の発癌過程における類洞の毛細血管化に寄与する重要な病理組織学的因子である)

木村紘爾, 中山 勝, 内藤一郎, 小見山高明, 市村浩一,
浅野博昭, 佃 和憲, 大塚愛二, 大橋俊孝, 三好新一郎, 二宮善文

International Journal of Clinical Oncology (掲載予定)

平成 24 年 8 月 14th International Congress of Histochemistry and
Cytochemistry に発表

平成 25 年 4 月 第 113 回 日本外科学会定期学術集會に発表

平成 25 年 6 月 第 45 回日本結合組織学会学術大会・第 60 回マトリックス
研究会大会 合同学術大会に発表

平成 26 年 6 月 第 46 回日本結合組織学会学術大会・第 61 回マトリックス
研究会大会 合同学術大会に発表

主 論 文

Human collagen XV is a prominent histopathological component of sinusoidal capillarization in hepatocellular carcinogenesis

(XV 型コラーゲンはヒト肝細胞癌の発癌過程における類洞の毛細血管化に寄与する重要な病理組織学的因子である)

[緒言]

肝細胞癌(HCC)は世界の腫瘍死原因の 3 番目を占める腫瘍である。HCC の重要な特徴として多血性が挙げられる。正常肝細胞の栄養血流の主体は門脈血であるが、HCC では腫瘍の増大とともに栄養血流が門脈血から動脈血へと切り替わり、腫瘍内部では動脈血を供給するために盛んに血管新生が起こっている。

この新生血管は形態的には正常肝細胞周囲に存在し門脈血の供給や物質交換を行う類洞血管に類似しているが、性質的には組織に動脈血の供給を行う毛細血管に類似しており類洞様血管と呼ばれる。HCC の内部に類洞様血管が生じることは「毛細血管化 (capillarization)」と呼ばれ、古くから提唱されてきた。capillarization の過程では類洞血管内皮に認められる開窓が消失した類洞様内皮や肥厚した基底膜様構造の出現などの形態的変化が起こることが報告されているが、その過程には依然として不明な点が多い。

近年行われた 2 種類のマウス肝発癌モデルを用いた結合組織系のプロテオミクス解析において、発癌過程で両モデルとも発現上昇を認めた XV 型コラーゲンについて、我々は初めてヒト HCC 切除標本を用いた検討を行ったので報告する。

[材料と方法]

症例の選択

1992 年から 2010 年までに岡山大学病院で HCC と診断され切除術を行った 50 人に由来する、同時性・異時性の多発を含む 63 腫瘍の切除標本を使用した。研究の実施に当たってはヘルシンキ宣言を遵守し、同院倫理委員会の承認を得た。

免疫組織化学法

切除標本は 10%中性緩衝ホルマリンで固定された後にパラフィン包埋ブロックが作成された。腫瘍部と非腫瘍部の双方を含むブロックを選択し、5 μ m 厚に薄切して免疫組織化学法を実施した。免疫組織化学法の一次抗体としてヒト XV 型コラーゲンの α 鎖サブユニットに特異的に結合する HPA017915 抗体(Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden)を用い、組織内での XV 型コラーゲンの局在を確認した。薄切標本は脱パラフィン、再水和化され、

Target Retrieval Solution (S1699; Dako, Glostrup, Denmark)を用いて熱処理による抗原の賦活化を実施した。ブロッキング処理の後に、4°C、over night の条件下で一次抗体を反応させた。Vectastain Elite ABC Kit (PK-6101; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)による増感処理後に発色、核染色を行った。XV 型コラーゲンの染色結果は、患者情報から隔離された病理医（市村医師）により、高倍率視野下で各標本の腫瘍部・非腫瘍部それぞれ 10 門脈域を評価することによって判定された。

染色強度は「陰性」「弱陽性」「陽性」「強陽性」の 4 段階で評価された。

XV 型コラーゲンと IV 型コラーゲンの二重染色を実施した。XV 型コラーゲンに対しては上記の手順を行い、IV 型コラーゲンに対する一次抗体 PHM-12 (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)を併用した。二次抗体には XV 型コラーゲンに Cy3 (赤)、IV 型コラーゲンに Alexa Fluor® 488 (緑) の蛍光抗体を用い、レーザー共焦点顕微鏡で撮像した。

RNA 発現解析

COL15A1 遺伝子の発現量を推定するために定量的逆転写 PCR を行った。上述のパラフィンブロックを 12 μm 厚に切り出し、腫瘍部と非腫瘍部に分割し、各々の total RNA を ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA)を用いて抽出した。total RNA は RNAdirect™ Realtime PCR Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて one step で逆転写と増幅を行った。反応用のプローブとして TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) の *COL15A1* (Hs00266332_m1)を用い、コントロールには β -actin (ACTB) (Hs01060665_g1)を用いた。発現量は delta-delta Ct 法で計算した。

統計解析

統計の手法として paired *t* 検定、一元配置分散分析(ANOVA)、および重回帰分析を用い、それぞれ $p < 0.05$ で有意とした。

[結果]

HCC 組織中における XV 型コラーゲンの局在

XV 型コラーゲンの組織中陽性コントロールとしては小葉間動脈を用いた。XV 型コラーゲンは全例の腫瘍部で HCC の分化度や組織型にかかわらず、類洞様内皮に沿って陽性であったが、全例の非腫瘍部では肝細胞と Disse 腔の双方において陰性であった。

また、IV 型コラーゲンはグリソン鞘と Disse 腔、および類洞様内皮の基底膜に存在が確認されているので、XV 型コラーゲンの局在を確認するために二重染色を行った。非腫瘍部では IV 型コラーゲンのみが正常肝細胞周囲の類洞内皮に沿って発現していた。腫瘍部では類洞様内皮に沿って XV 型コラーゲンと IV 型コラーゲンが共局在しており、一部の視野では

XV型コラーゲンがIV型コラーゲンよりも類洞様内皮のより内腔側に認められた。

XV型コラーゲンの染色強度

XV型コラーゲンの染色強度は「陰性」「弱陽性」「陽性」「強陽性」の4段階で評価され、それぞれの項目は、類洞様内皮の0%、1-9%、10-49%、50%以上が染色された場合と定義された。一標本中に二つ以上の強度が混在する場合は、強い方を採用した。

63例中、陰性は0例(0%)、弱陽性は13例(20.6%)、陽性は36例(57.1%)、強陽性は14例(22.2%)であった。

HCC組織中におけるCOL15A1 mRNAの発現

COL15A1 mRNAの発現量は β -actinの発現量を用いて標準化した後、非腫瘍部の発現量の平均値を「1」と定めて比較した。腫瘍部におけるCOL15A1 mRNAの発現量は非腫瘍部の3.24倍と有意に($p < 0.0001$)上昇していた。またCOL15A1 mRNAの発現量とXV型コラーゲンの染色強度は有意に相関していた。臨床病理学的因子との多変量解析では「肝炎ウイルス非感染」と「中分化型」の症例で有意に発現が増加していた。

[考察]

HCCにおけるXV型コラーゲンの存在は上述のマウスモデルにおいては確認されていたが、ヒトHCCにおける存在の有無や存在する場合の組織学的な局在については未だ報告されていなかった。本研究において我々は初めてヒトHCCにおいてXV型コラーゲンが発現していること、さらにそれらが類洞様内皮に沿って局在することを病理組織学的に確認することができた。そして免疫組織化学標本上で腫瘍に被膜が存在しない部分においてもXV型コラーゲンの染色は腫瘍部から非腫瘍部に交差しておらず、XV型コラーゲンの発現は腫瘍に由来するものと考えられた。

また、同時にXV型コラーゲンをコードするCOL15A1遺伝子の発現が癌部で特異的に上昇しており、それが免疫染色の強度と有意に相関することも示すことができた。

XV型コラーゲンは全身の毛細血管の内皮基底膜、末梢神経、平滑筋などに存在するが、肝臓の類洞血管内皮、肺の肺胞血管内皮、腎臓の糸球体血管内皮など開窓を持つ血管周囲には存在しないことが知られている。

本研究でのHCCにおけるXV型コラーゲンの出現部位は、capillarizationに伴う類洞様内皮基底膜の形成部位と合致している。通常毛細血管には基底膜にXV型コラーゲンが存在することや、通常開窓のある血管にはXV型コラーゲンが存在せず、肝ではcapillarizationによって開窓が消失していくことと合わせて考えると、今回得られたHCCにおけるXV型コラーゲンの局在は、XV型コラーゲンが肝のcapillarizationによる基底膜形成と開窓の消

失に重要な役割を果たしており、*capillarization* で形成される類洞様内皮が通常の毛細血管に近い性質を持つことを強く裏付ける結果と考えられる。

さらに、XV型コラーゲンの発現は今回調べた HCC 全例に認められたが、その発現量を定量的 PCR で定量したところ、腫瘍ごとに差があるという興味深い結果が得られた。本研究結果では、非ウイルス性と中分化型の HCC で *COL15A1* 遺伝子の発現が有意に高かった。これより、XV型コラーゲンは非ウイルス性の HCC でより重要である可能性が考えられる。これは上述したマウスの発癌モデルが *Pten* ノックアウトと *PDGF-C* 強制発現という非ウイルス性のモデルであることとも合致する。

高分化型の HCC よりも中分化型の HCC の方が動脈血流に依存する割合がより高いことは知られている。また、低分化型の HCC では類洞様血管の構築が乏しいことから、中分化型の HCC で *COL15A1* 遺伝子の発現が最も高かったと考えられる。ただし本研究では低分化型 HCC の症例数が 3 例と少なく、うち 1 例には *COL15A1* 遺伝子の高発現を認めたことから、今後さらなる検討が必要である。

また XV型コラーゲンは腫瘍との関係においては抗腫瘍効果を示し、大腸癌や乳癌など他の癌腫においてはその上皮基底膜から腫瘍の進行とともに消失することが知られている。それゆえ、今回の HCC における XV型コラーゲンの発現上昇はこれらの知見に矛盾するように思われる。しかし、これらの腫瘍においても腫瘍内の新生血管の基底膜には XV型コラーゲンの存在が確認されており、正常肝細胞周囲に基底膜が存在しないことや、HCC が *capillarization* による血管新生の盛んな多血性の腫瘍であることから、HCC においては、本研究で示されたような癌部において発現が増加する現象が生じたと考えられる。

現在 HCC の多血性に着目して HCC に対する血管新生阻害療法の開発が進められているが、現時点ではその効果は十分とは言えない。本研究では、XV型コラーゲンの発現は HCC 全例に認められ、その局在からは *capillarization* への関与が考えられるが、発現強度は病理組織学的因子によって異なるという結果が得られており、HCC で普遍的に認められる *capillarization* も単一のメカニズムによらない可能性が示唆された。HCC に対するより効果的な血管新生阻害のためには、*capillarization* のメカニズムについてより深く理解する必要があると推察される。

[結論]

XV型コラーゲンの免疫組織化学法と XV型コラーゲンをコードする *COL15A1* 遺伝子はともに非腫瘍部と比較して腫瘍部で発現が上昇していた。免疫組織化学法による組織学的な検討では、XV型コラーゲンは腫瘍部の類洞様血管内皮に沿った特異的な発現を認め、XV型コラーゲンは類洞血管の *capillarization* に寄与する因子であると考えられた。