



# Expression of Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor in Hepatocellular Carcinoma

森田, 康

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1991

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001991>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	もり た やすし 森 田 康	（京都府）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1235号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成11年3月31日	
学位論文題目	Expression of Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor in Hepatocellular Carcinoma （肝細胞癌切除例における Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor の発現について）	
審査委員	主査 教授 黒田 嘉和 教授 杉村 和朗      教授 伊東 宏	

### 論文内容の要旨

#### 序章

肝細胞癌切除症例の5年無再発生存率は25%と予後不良であり、従来、術後再発の危険因子として、腫瘍径、臨床病理学的な門脈侵襲（vp）、および肝内転移（im）が重要視されていた。しかし近年、腫瘍径が小さく、臨床病理学的にはvp、imを認めない症例においても約50%の術後再発を認めることが明らかとなり、肝細胞癌の予後向上のためにその再発機構を解明することが急務となっている。

癌の浸潤、転移は癌細胞の解離、基底膜への接着とその破壊、間質の遊走、血管内侵入、血管外遊出、標的臓器への生着、増殖という段階を経て完成する。そのうち、基底膜の破壊には多くの蛋白分解酵素の関与が指摘されており、Plasminogen Activation Systemがその中心的な役割を担っていると考えられている。Plasminogen Activation Systemにおけるkey proteinはurokinase-type plasminogen activator（uPA）であり、活性化されたuPAはplasminogenをplasminへ変換し、plasminは多くの蛋白分解酵素を活性化するとともに、自身も蛋白分解反応に関与することによって細胞外基質を破壊する。uPA receptor（uPAR）はuPA固有のレセプターであり、癌細胞表面上に発現する、uPAはuPARを介して癌細胞と結合することにより、効率的に癌細胞周囲の細胞外基質を破壊すると考えられている。現在までに、大腸癌、乳癌、前立腺癌などの進行癌でuPARが過剰発現することはすでに報告されている。

今回我々は、肝細胞癌切除例におけるuPARの発現をmRNAおよび蛋白レベルで解析し、臨床病理学的因子と比較検討するとともに、uPARの術後再発予測因子としての可能性についても検討した。

#### 方法

対象症例：神戸大学第一外科で1992年から1995年にかけて治癒切除された肝細胞癌31例を対象とした。病理組織学的門脈侵襲（vp）、肝内転移（im）のいずれも有しない症例群をA群、いずれかまたは両方を有する症例群をB群とした。

*In situ hybridization*：標本はホルマリン固定、パラフィン包埋されたものを使用し、uPAR cDNAの

585bp BamHI fragment を RNA polymerase で転写し digoxigenin でラベリングものを probe として使用した。Hybridization は antisense,sense probe ともに50℃で16時間行い, uPAR mRNA の検出は Nucleic acid detection kit (Boehringer Mannheim Biochemica) を用いて行った。

Northern blotting 法：凍結組織より抽出した RNA を材料とし, uPAR cDNA の585bp BamHI fragment を PCR 法で増幅し digoxigenin でラベリングものを probe として使用した。Hybridization は50℃で16時間行い, CSPD (Boehringer Mannheim Biochemica) を用いて検出した。

免疫染色：標本はホルマリン固定, パラフィン包埋されたものを使用し, 抗体は uPAR 抗体 (# 3936, American Diagnostics Inc.) を使用した。染色は Large Volume DAKOLSA Kit (Dakopatts) を使用した

Western blotting 法：凍結組織より抽出した蛋白を材料とし, 抗体は uPAR 抗体 (# 398, American Diagnostics Inc.) を使用した。uPAR antigen の検出は Western blotting detection system (Amersham Corp.) を用いて行った。

統計処理：uPAR の発現と臨床病理学的因子との検討は  $\chi^2$  検定にて行ない,  $p < 0.05$  を統計学的有意とした。無再発生存率は, Kaplan-Meier 法にて解析, log-rank test による検討を加え,  $p < 0.05$  を統計学的有意とした。

結果

#### uPAR mRNA の発現

*In situ* hybridization 法：31例中22例 (71%) が uPAR 陽性であった。uPAR は, 癌細胞および周囲の間質細胞に発現しており, また uPAR 陽性細胞は癌結節の辺縁部または癌先進部局在する傾向がみられた。B 群では A 群に対し uPAR 陽性率が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。腫瘍径別では uPAR の陽性率に有意差は認められなかったが, 腫瘍径 3 cm 以下の小肝細胞癌症例において60%が uPAR 陽性であった。また A 群の小肝細胞癌症例においても50%が uPAR 陽性であった。

Northern blotting 法：A 群の 5 例, B 群の 9 例に対して行った。B 群では全例で強い uPAR の発現を認めたのに対し, A 群では強い発現を認める症例から発現を認めない症例まで様々な発現パターンを示した。

#### uPAR antigen の発現

免疫染色法：20例に対して行い, 14例 (70%) が uPAR 陽性であった。uPAR 発現細胞の局在などは *In situ* hybridization 法による結果とほぼ同様の傾向を示した。

Western blotting 法：Northern blotting 法を行った14症例に対して行い, ほぼ同様の結果を得た。

#### uPAR の発現と術後再発の関係について

A 群において, uPAR 陽性症例 (8 例) と陰性症例 (7 例) にわけ, 術後無再発生存率を比較検討した。uPAR 陰性症例では, 陽性症例に比して無再発生存率は有意に良好であった ( $p < 0.05$ )。

考察

肝細胞癌の術後再発は, 他の消化器癌と比較して極めて高率であり, その多くが門脈を介した血行性転移であることが報告されている。今回我々は肝細胞癌切除例における uPAR の発現を分子レベルにおいて解析, 検討した。

結果は, 検討した症例の71%で uPAR 陽性であり, vp または im を有する症例群における uPAR 陽性率は, 有しない症例群に比して有意に高く, uPAR の発現が肝細胞癌の門脈侵襲, 肝内転移に強く関与していることが確認された。また, uPAR 陽性細胞が癌先進部および結節辺縁部を中心として発現していることも, 膨張浸潤性に発育していく肝細胞癌の特徴を裏付けるものとなっていると考えら

れる。

これまで腫瘍径，vp,imなどが肝細胞癌の術後再発を予測する因子として重要視されてきたが，腫瘍径が2 cm以下で病理組織学的にvp,imを認めない症例においても術後約50%が再発することが報告されている。今回の検討で，腫瘍径3 cm以下の症例で60%が，vpまたはimを有しない。腫瘍径3 cm以下の症例でも50%にuPARの発現がみられた。また，vp,imを有しない症例群において，uPAR陰性症例では陽性症例に比べ術後無再発生存率が有意に良好であった。以上から，腫瘍径が小さく，病理組織学的に浸潤，転移を認めない，いわゆる早期肝細胞癌の中にもすでに高い悪性度を獲得している癌が存在していることが推察され，uPARは従来の臨床病理学的検索では検出することができなかった肝細胞癌の微小浸潤，転移を検出できる可能性があり，今後，術後再発を予測しうる新しい因子としても有用である可能性が示唆された。

今回の検討で，uPAR陰性の3症例に術後再発を認めた。近年，肝細胞癌の転移，再発が，多中心性発癌によるものであるという報告がなされており，この3症例については多中心性再発の可能性が強く示唆されるが，今後のさらなる検討が必要であると考えられる。

今回，われわれはuPARが肝細胞癌の浸潤，転移機構に密接に関与していることを明らかにした。また，uPARの発現は，従来の臨床病理学的検索では不可能であった肝細胞癌の微小浸潤，転移を検出し，切除後の高再発危険群を予測する上で有用な指標となりうる可能性を明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

Plasminogen activation systemは，癌の浸潤，転移機構と密接に関与していることが知られている。urokinase-type plasminogen activator (uPA)はplasminogenをplasminへ変換し，plasminは多くの蛋白分解酵素を活性化するとともに，自身も蛋白分解反応に関与することによって，細胞外基質を破壊する。uPA receptor (uPAR)は癌細胞上に発現し，uPAはuPARを介して癌細胞と結合することにより，癌細胞周囲において効率的に細胞外基質を破壊しているものと考えられている。uPARは大腸癌，乳癌，前立腺癌などの進行癌において過剰発現することはすでに報告されている。本研究者は肝細胞癌切除例を用い，uPARの発現をmRNAおよび蛋白レベルで解析し，従来の臨床病理学的因子との関連性について検討を行っている。

神戸大学第一外科において手術された肝細胞癌切除例を用い，*In situ* hybridization法，Northern blotting法にてmRNAレベルで，免疫染色法，Western blotting法にて蛋白レベルで肝癌組織におけるuPARの発現を解析した。

*In situ* hybridization法において，uPAR mRNAは71%の症例で陽性であり，uPAR陽性細胞は癌結節の辺縁または癌先進部に局在している傾向がみられた。他の手法を用いたuPAR発現の検討でも*In situ* hybridization法とほぼ同様の結果であった。従来の病理組織学的因子である腫瘍径，分化度，門脈侵襲，肝内転移，被膜浸潤とuPAR陽性率との比較では，門脈侵襲，肝内転移のいずれかまたは両方を認める症例群におけるuPAR陽性率は，いずれも認めない症例群に比べて有意に高く，uPARの発現が肝細胞癌の浸潤，転移と密接に関係があることか明らかとなった。腫瘍径別のuPAR陽性率では有為な差は認められなかったが，3以下の小肝細胞癌症例でも60%がuPAR陽性であった。また腫瘍径3 cm以下で門脈侵襲，肝内転移ともに認めない症例でのuPAR陽性率は50%であったことから，uPARは従来の臨床病理学的検索では検出できなかった早期肝細胞癌の微小浸潤，転移を検出している可能性が示唆された。さらに門脈侵襲，肝内転移のいずれも認めない症例群においてuPAR陽性例，

陰性例で術後無再発生存率を比較したところ、uPAR 陰性例での無再発生存率は陽性例のそれに比して有意に良好であった。このことから uPAR の発現は、肝細胞癌の術後再発を予測する新たな因子として有用である可能性が示唆された。

これらの成績から、uPAR は肝細胞癌の浸潤、転移機構に密接に関与しており、その発現の検討は、従来の病理学的検索では不可能であった早期肝細胞癌の微小浸潤、転移の検出、術後再発の予測に極めて有用である可能性が示唆されるとの結論を導き出している。

本研究は肝細胞癌の浸潤、転移機構を分子生物学的レベルで解析したものであり、肝細胞癌の再発に uPAR が関与しているとの重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。