

論文の内容の要旨

論文題目 脂肪性肝炎様肝細胞癌の臨床病理学的・免疫組織化学的検討
および *CTNNB1* 変異解析
氏名 安藤（野尻） 純世

1. 背景と目的

肝細胞癌は原発性肝癌において最も頻度の高い組織型である。主原因は、先進国においては飲酒が主たる原因とされてきたが、肥満、糖尿病などの代謝性病態の罹患者の増加と併せ、非アルコール性脂肪性肝疾患（Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD）が重要な病因となってきた。NAFLD、その重症型に位置付けられる非アルコール性脂肪性肝炎（Nonalcoholic steatohepatitis, NASH）は世界的に増加傾向にある疾患である。

日本においては肝炎ウイルス関連が原因として最も多いが、予防、治療の発展に伴い減少が見込まれている。一方で非 B 非 C 肝細胞癌は実数が増加してきている。特に NAFLD 関連肝細胞癌は今後の増加が懸念されている。

肝細胞癌は他癌に比し組織形態の多様性に乏しく NAFLD 関連肝細胞癌についても、その組織学的特徴は殆ど知られていない。最近、Salomao らが肝細胞癌内に NASH に特徴的な組織像を随伴する一群（steatohepatitic hepatocellular carcinoma, SH-HCC）が存在すること、患者の代謝性病態や NAFLD/NASH の合併と強く関連していることを見出した。

SH-HCC は、いまだ大規模な症例群を対象とした解析がなされておらず、日本人患者における臨床的、組織学的特徴や、予後因子との相関の検討もされていない。代謝性病態、これと関連した NAFLD の継続的増加が世界的に見込まれる現状において、SH-HCC の臨床病理学的特徴の詳細を明らかにすることは、重要な意味を持っている。

本研究では、多数の肝細胞癌切除症例を対象とした後方視的検討により、SH-HCC の臨床病理学的特徴の詳細を解明する。さらに、免疫組織化学的検討、*CTNNB1* 変異解析によりその特徴的な形質を明らかにする。

2. 材料と方法

東京大学医学部附属病院肝胆膵外科において、2005 年～2010 年(免疫組織化学的検討は～2011 年)の期間に、外科的に切除された肝細胞癌連続症例を対象とし、肝細胞癌の初回切除症例を検討した。臨床データは電子カルテを参照した。画像診断に基づき再発のスクリーニングが施行されている。

病理学的に肝細胞癌の組織学的再評価として、腫瘍の局在、表面/深部(3cm 以下例のみ)、

大きさ、分化度、血管侵襲・胆管侵襲・肝内転移の有無、に関して再検討した。SH-HCC の診断は、腫瘍細胞における①大型脂肪滴の存在、②風船状腫大、③Mallory-Denk 体の形成、また、④間質の線維化、⑤腫瘍内の炎症細胞浸潤、の 5 つの組織学的項目の評価に拠った、4 個以上を満たすものを SH-HCC、全ての項目を満たし、これら所見が腫瘍内で優位なもの典型的 SH-HCC とした。また、背景肝の線維化、脂肪化、脂肪性肝炎の組織学的評価を行った。

免疫組織化学的検討では、組織アレイの作成を行い 197 例(SH-HCC70 例、通常型肝細胞癌(Conventional hepatocellular carcinoma, C-HCC)127 例)を対象として、免疫染色を施行した。また、TMA に使用した症例の一部でパラフィン包埋ブロックから DNA を抽出し、*CTNNB1* 変異解析を行った。

3. 結果

臨床病理学的検討においては、293 人の患者の 382 個の肝細胞癌が検討対象となった。

106 人の患者の 120 個の肝細胞癌が SH-HCC に相当した。51 人の患者の 54 個の肝細胞癌が典型的 SH-HCC であった。

C-HCC 患者群との比較において、SH-HCC 患者群では、有意に女性、肝炎ウイルス陰性者、糖尿病あり、高血圧ありの頻度が高かった。一方、飲酒歴ありの頻度が低かった。血液所見では、総コレステロールと中性脂肪が高値、AFP が低値であった。背景肝において脂肪化、脂肪性肝炎が高率に認められた。

HBV 関連肝細胞癌との比較で、HCV 関連肝細胞癌、非ウイルス性肝細胞癌で、SH-HCC の頻度が高かった。糖尿病、高血圧、BMI 25 以上、脂肪肝、脂肪性肝炎を背景にもつ肝細胞癌で、SH-HCC が高率であった。一方で、飲酒歴、多飲歴を有する患者に発生した肝細胞癌では、SH-HCC が低率であった。

組織学的特徴としては、C-HCC に比し、SH-HCC は腫瘍径が小さく、分化度が良く、高～中分化型における比較では、脈管侵襲が高頻度であった。また、胆管侵襲も高頻度であった。典型的 SH-HCC と C-HCC の比較においても、同様の結果が確認された。SH-HCC 全体と比べ典型的 SH-HCC は、腫瘍径が小さい傾向にあり、全例が高ないし中分化型肝細胞癌であった。

予後としては、典型例は無再発生存において有意に予後が良かったが、典型例、SH-HCC 全体のいずれも多変量解析において有意な予後予測因子ではなかった。

免疫組織化学的検討においては、SH-HCC では C-HCC に比べて、 β -catenin の核内集積の頻度が低く、Glutamine Synthetase の強陽性の頻度が低かった。 β -catenin の核内集積につ

いて当研究室の過去の研究結果を合わせて追加検討したところ、SH-HCC の組織像は多変量解析にて β -catenin の核内集積がないことの独立した予測因子であった。また、SH-HCC では *CTNNB1* 変異の頻度が有意に低かった。

Sonic hedgehog(Shh) ligand は SH-HCC、C-HCC 両群において高頻度に陽性を示した。特に典型的な SH-HCC においては全例に陽性像を示し、C-HCC と比較して有意に頻度が高かった。whole section 切片 28 例の追加検討を加え、典型例において有意に強発現していた。

肝前駆細胞マーカーである SALL4、EpCAM は有意に頻度が低かった。CK19、AFP は頻度が低い傾向にあった。

4. 考察

本研究における SH-HCC の頻度は米国からの既報告における頻度と同等ないしやや高頻度であった。頻度の相違は、対象集団の相違を反映した可能性がある。また、診断基準が既報で均一化されていないことに起因していることも考慮され、SH-HCC を有意な一群として確立していくためにも、今後、明確な診断基準の設定が課題となる。

本研究において、SH-HCC と代謝性病態との強固な関連性が示された。さらに非ウイルス性肝細胞癌で、高率に SH-HCC が認められることが確認された。HBV 関連肝細胞癌との比較で、HCV 関連肝細胞癌において、SH-HCC が有意に高率に見られた。SH-HCC の背景は非ウイルス性症例や脂肪肝、脂肪性肝炎に限定されるものではなく、NAFLD 関連肝細胞癌に独占的な組織像ではないことが示唆される。

組織学的には SH-HCC が比較的分化が良く、一方で C-HCC との比較で脈管侵襲や胆管侵襲が高率に見られる傾向にあり、組織侵襲性の強い腫瘍であることが想定された。予後に有意な相違は見られなかったが、SH-HCC の腫瘍径が小さい傾向にあるためと考えられた。典型的 SH-HCC では無再発生存において予後が有意に良かったが、独立した予後予測因子とはならなかった。これは高分化、小径の傾向がより顕著であることが考慮された。さらにこのことは、典型的 SH-HCC が SH-HCC の早期病変であり、進展とともに所見を失っていく可能性を示唆している。

SH-HCC では β -catenin の核内集積、*CTNNB1* 変異が極めて低率であり、これと関連する GS の強発現も極めて稀であった。 β -catenin 変異を欠く肝細胞癌で、腫瘍細胞の脂肪化や間質の線維化が高率であることが報告されており、今回の結果と合致する。SH-HCC における低率な β -catenin 核内集積については、組織像に依存した結果であることが確認された。近年、Wnt/ β -catenin 系による肝細胞の脂肪化、脂肪性肝炎に対する抑制効果が報告されている。

典型的 SH-HCC で Shh ligand の高発現が確認された。NAFLD において、Hedgehog 経路

の活性化は重要な役割を果たしており、小胞体ストレスを介した Shh ligand の高発現が知られる。また、マウスの脂肪肝モデルにおいて、SH-HCC の発生に小胞体ストレスが関与することが示されている。Hh 系阻害薬の開発が精力的に進められており、典型的 SH-HCC における Shh ligand 高発現のメカニズムの解明と、今後の治療への展開が期待される。

SH-HCC では肝前駆細胞マーカーの発現が総じて低率であったが、SH-HCC が比較的高分化で、非ウイルス症例・HCV 陽性症例に高集積するのに対し、前駆細胞マーカーを発現する肝細胞癌は、一般に低分化で、HBV 陽性例に高集積することから、了解可能な結果である。

5. 結論

SH-HCC は臨床病理学的特徴を備えた一群であり、本研究により SH-HCC の臨床病理学的特徴および免疫組織学的特徴の一端が示された。包括的な分子生物学的解析が今後の課題である。