

## 原発性肝細胞癌における E-cadherin の発現の意義

忠岡 好之

原発性肝細胞癌の浸潤・転移に肝癌細胞で発現される E-cadherin が重要な働きを果たしているか否かを調べる目的で、本学の44摘出手術材料を用い、改良を加えた抗原性の賦活化法を行った後に免疫染色を行って、その発現の程度を *preserved type* と *reduced type* の2群に分けて臨床病理学的にその意義を考察した。

原発性肝細胞癌では E-cadherin の発現は不規則・不均一で、一部に凝集したり、全周性に見られるものや減弱、消失したものが見られた。また Edmondson 分類および形態分類別にみた分化度では、分化度が低い程その発現が弱くなるのに対し、分化度が高いと発現が強く、発現の弱いものでは脈管侵襲を伴うものが多いことがわかった。

以上の事から、肝細胞癌の原発巣における E-cadherin の発現性の減弱はある程度までその腫瘍の生物学的悪性度の指標になりうるものと考えた。(平成8年12月10日採用)

### Significance of E-cadherin Expression in Hepatocellular Carcinoma

Yoshiyuki TADAOKA

In order to study whether the expression of E-cadherin plays an important role in the invasiveness and metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC) cells, 44 surgically removed HCC cases were immunohistochemically examined using a newly developed antigen retrieval method.

The results were divided into the reduced type and the preserved type, and were interpreted in relation to the clinicopathological background of the patients. In the present study, cadherin expression was irregular and inhomogenous in HCCs. Expression was noted circumferentially along the entire plasma membrane in some cases. Staining intensity varied from case to case and from place to place, but there were cases in which the staining was weak or completely absent.

In Edmondson's classification, HCCs with poorer differentiation exhibited weak stainability whereas those which were well differentiated were strongly stained. Those with poor expression tended to show vascular invasion.

Our results indicate that the expression of E-cadherin in HCCs may be a good indicator of biological malignancy. (Accepted on December 10, 1996) *Kawasaki Igakkaishi* 22(4): 279-285, 1996

**Key Words** ① Hepatocellular carcinoma ② E-cadherin  
③ Prognosis ④ Metastasis ⑤ Differentiation

## はじめに

画像診断の発達による比較的早期の小肝癌の発見と、切除不能例や再発例における肝動脈塞栓術 (TAE) や経皮経肝エタノール注入術 (PEIT) 等による保存的治療技術の向上および外科的切除における安全性の向上などの努力により、原発性肝細胞癌 (以下 HCC) の治療成績は以前と比較して格段の向上が見られるようになった<sup>1)</sup>。HCC の大きさや数に関わらず治療切除後長期にわたり再発のない症例も認められるが、治療切除と思われた例においても再発を認める場合が少なからずある。後者の現象が早期の肝内転移によるものなのか、多中心性の HCC の発生によるものか疑問の残るところである<sup>2)</sup>。もし、早期の肝内転移によるとした場合でも、早期転移を決定づける因子はまだわかっていない。そこで細胞間の接着因子の一つである cadherin に着目してみた。Cadherin は 120 kD の分子量を持つ膜貫通性の糖蛋白で、E 型、P 型、N 型等多くのサブクラスがあるが、いずれもカルシウムイオン依存性に homophilic な結合を行い、細胞間の接着に重要な役割を果たしている<sup>3),4)</sup>。肝癌細胞は上皮由来の細胞であるため、cadherin を含有し、互いに接着するはずである。そして cadherin の減少や欠損は肝癌細胞が原発巣からの離脱・転移に際して重要な役割を果たすと

考えられる。著者らは先にホルマリン固定・パラフィン包埋材料を使って E-cadherin を免疫組織学的に検出する安定した手技を開発した<sup>5)</sup>。そこでこの方法を用い、HCC 症例における E-cadherin の発現性をホルマリン固定・パラフィン包埋したブロックを再利用する事によって検索し、HCC における E-cadherin の意義について調べることにした。

## 材料および方法

1985年から1995年12月までに川崎医科大学消化器外科教室にて原発性肝細胞癌症例で相対治療切除以上の手術を施行した55例のうち、術前の TAE や PEIT で腫瘍が壊死に陥った11例を除外した44例を対象とした。その腫瘍組織および正常部分はホルマリン固定・パラフィン包埋され、同附属病院病理部で保存されていたブロックを使用した。

### 抗原性の賦活化および免疫染色

免疫染色は、著者らが Shi らの方法<sup>6),7)</sup> を改良した抗原性の賦活法<sup>5)</sup> で処理した後に施行した (Table 1)。

TBS+ 0.01 M 塩化カルシウム (以下 TBS+ と略す) で洗浄した後、30分間メタノール+0.3%過酸化水素水にて (室温) 内因性ペルオキシダーゼをブロックし、ついで非特異的結合をブロックするために30分間 (室温) 3.0%正常ウ

Table 1. The outline of antigen retrieval using a microwave oven

1. Deparaffinize sections in xylene.
2. After washing with TBS+ solution, place them in a glass beaker with 0.1% citrate buffer solution to which 0.1% Tween has been added.
3. Leave the glass beaker in the center of the microwave oven.
4. Heat the solution by 5min irradiation at maximum power (700W) three times.
5. Remove it from the oven and let it cool down.
6. Rinse the sections in TBS+ solution three times; 5 min each.

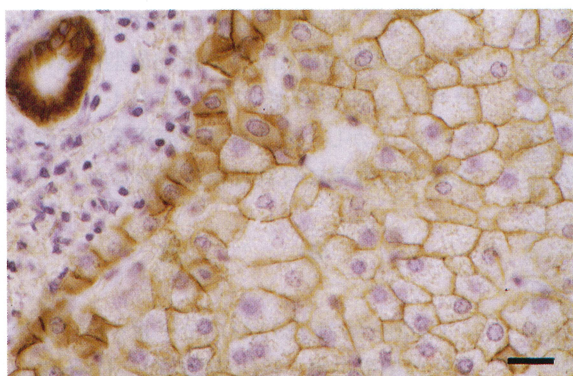


Fig. 1. E-cadherin expression in normal liver (immunohistochemistry with our antigen retrieval method). Note the cell borders between hepatocytes and cholangiolar epithelium.  $\times 300$ , Bar =  $10 \mu\text{m}$

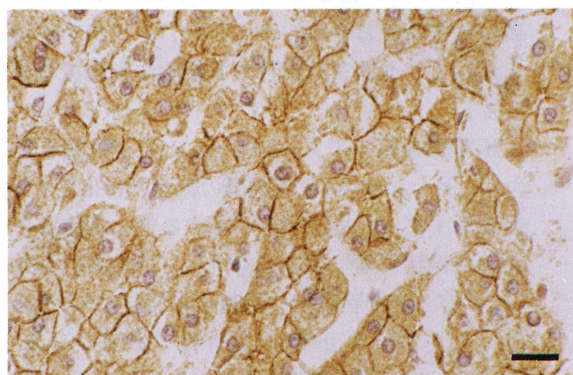


Fig. 2. E-cadherin immunohistochemistry in very well differentiated hepatocellular carcinoma. Staining intensity seems to have increased. (score 3)  $\times 300$ , Bar =  $10 \mu\text{m}$

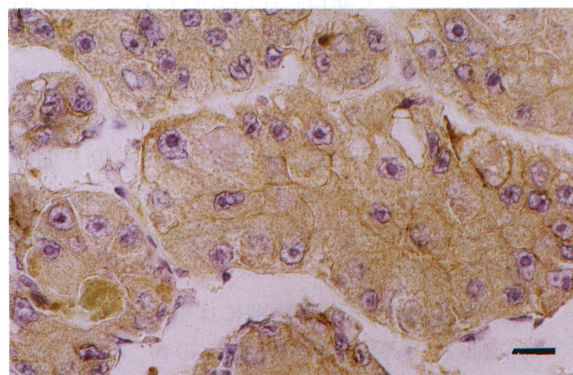


Fig. 3. E-cadherin immunohistochemistry of moderately differentiated hepatocellular carcinoma, Edmondson II, mid trabecular type. Note that the staining intensity is weak in comparison with that of Fig. 2. (score 1)  $\times 300$ , Bar =  $10 \mu\text{m}$

マ血清でインキュベートした。1.0% fetal bovine albumin にて500倍希釈した抗 E-ヒトカドヘリン抗体 (HECD-1: TAKARA, Kyoto, JAPAN) と24時間 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 反応させた後に、TBS+で200倍希釈したビオチン化抗マウス IgG 抗体 (VECTASTAIN ABC kit, Vector, Inc. Burlingame, USA) と50分間室温にて反応させ、洗浄後 ABC reagent (VECTASTAIN ABC kit, Vector, Inc. Burlingame, USA) と50分間反応させた。最後に  $40 \mu\text{l}$  の30%過酸化水素水と40mgのDAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) を入れたトリス緩衝液 (pH 7.6) で発色させた。核染色はCarazzi's hematoxyline にて行った。

#### 染色の評価

原発性肝細胞癌の E-cadherin の staining intensity を判定をより正確なものとするために次の4段階に分けて評価した。つまり正常肝組織と同様の staining intensity を3; strong とし、以下2; moderate, 1; weak, そして全く染まらないものを0; absent と決めて、各々の症例をスコア化した (Fig. 1~4)。判定に迷う場合はできる限り上の段階に入れることにした。

#### 臨床病理学的検討

各症例の診察記録および Hematoxyline-eosin 染色された組織切片を再検討することによって Table 2 に示したような年齢、性別や肝癌取り扱い規約<sup>9)</sup>、および Edmondson 分類<sup>9)</sup> に準じた病理学的諸因子に関するデータを収集し、これらを比較、検討した。この時 staining intensity の減弱か否かによって分けた方がより明確になると考え、staining intensity の0-1を reduced type, 2-3を preserved type とまとめ直した。

比較・検定には student's T 検定と chi-square 検定を、生存率及び無再発期間の比較には Kaplan-Meier 法を用いた Breslow-

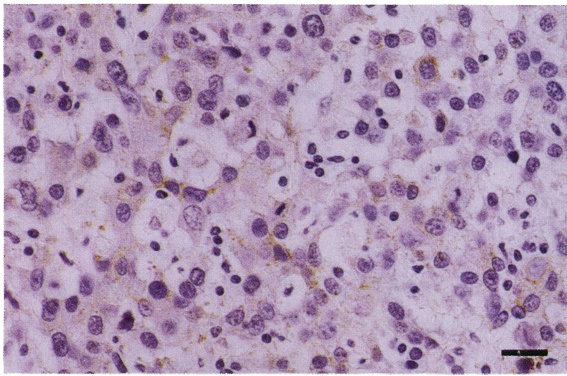


Fig. 4. E-cadherin expression is not seen in this hepatocellular carcinoma of Edmondson III, compact type. (Immunohistochemistry for E-cadherin) (score 0)  $\times 300$ , Bar = 10  $\mu\text{m}$

Gehan-Wilcoxon 検定を行った。

## 結 果

E-cadherin の発現は正常肝細胞および非癌部では細胞間側の細胞膜に沿って homogenous に線状に認められたが、類洞側の細胞膜ではその発現は無いかあっても弱かった。一方、癌部では、部分的に凝集したように強い発現が認められるものや弱いもの、全く発現の見られないものまで様々であった。Staining intensity では 3 ; 3例 (6.8%), 2 ; 15例 (34.1%), 1 ; 18例 (40.9%), 0 ; 8例 (18.2%) であった。0-1 を reduced type, 2-3 を preserved type と分類すると reduced type ; 26例, preserved type ; 18例となり、この2群について検討諸因子ごと症例数を記載したのが **Table 2** である。

年齢、性による差はなく、腫瘍径は若干 reduced type が大きい傾向にあったが有意差は認めなかった。病理学的諸因子でも被膜形成 (fc), 被膜浸潤 (fc-inf), 肝内転移 (IM) および病期には差はなかったが、脈管侵襲 (v) は有意に reduced type に多かった ( $p < 0.05$ )。肝細胞癌を形態分類別に比較した検討では reduced type に充実性の, preserved type に小索状型と中索状型の形態をとるものが多かった ( $p < 0.05$ )。前者は低分化、後者は高・中分化の癌細胞型に

一致する。また reduced type では Edmondson 分類の III に相当する細胞異型の強い低分化なものが有意に多く存在した ( $p < 0.05$ )。しかし、粗生存率と無再発生存率の比較では両者に有為な差は認めなかった。

## 考 察

Cadherin は 120 kD の分子量を持つ膜貫通性の糖蛋白で、E (上皮由来), P (胎盤由来), N (神経由来) 等のサブクラスを持ち、Ca イオン存在下に各々のサブクラス同士が homophilic な結合をする。cadherin の細胞内ドメインは  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin により裏打ちされておりピンキュリン,  $\alpha$  アクチニンを介してアクチンに結合して強固な細胞接着をなす。

正常肝細胞での E-cadherin の発現状態を見たが、E-cadherin は類洞側の細胞膜にはあまり発現せずに、肝細胞同士が接する側の細胞膜に均一に線状に強く見られている。これは E-cadherin が上皮細胞同士の接着に関与しているということを如実に示唆する所見である。一方、HCC では正常肝細胞に見られたような E-cadherin 発現の規則正しさはなく、不均一であり、一部に凝集したかのように強く見られるものや癌細胞の細胞膜に全周性に見られるもの、減弱したものや全く発現しないものもあった。このことは癌化すると cadherin の発現は不均一になり、正常では接着が必要でない細胞膜にも出現することを意味している。さらに癌細胞同士は離れやすいが、一方接着面積は広くなり、他の細胞と接着しやすくしているのかもしれない。今後明らかな転移のある症例をあわせてさらに検討する必要がある。

肝細胞癌を形態分類別に比較した検討では reduced type に充実性のものが、preserved type に小索状型と中索状型の形態をとるものが多く、reduced type では脈管侵襲が有意に多く見られ、また Edmondson 分類の III に相当する低分化型が多かった。つまり、分化度の低いもの

**Table 2.** Relationship between clinicopathological findings and E-cadherin expression. The examination items according to the General Rules for the Clinical and Pathological Study of Primary Liver Cancer.

		reduced type (n=26)	preserved type (n=18)
年齢		57.6±12.2	62.3±10.4
性 (male/female)		23/3	14/4
腫瘍最大径(cm)		4.9±3.5	2.4±5.5
肉眼型	結節型	22	16
	塊状型	4	2
被膜形成	fc+	19	13
	fc-	7	5
被膜浸潤	fc-inf+	9	7
	fc-inf-	17	11
脈管浸潤 * (p<0.05)	v+	14	3
	v-	12	15
肝内転移	IM0	23	15
	IM1	2	17
	IM2	0	0
	IM3	1	1
併存肝硬変	Z0	7	4
	Z1	8	5
	Z2	0	1
	Z3	1	0
Edmondson分類 * (p<0.05)	I	0	2
	II	16	14
	III	10	2
組織学的形態分類 * (p<0.05)	小索状型	5	8
	中索状型	7	8
	大索状型	2	1
	充実型	12	1
Stage	I	4	3
	II	9	9
	III	6	1
	IV-A	4	1
	IV-B	1	0

\* ; chi-square 検定 (p<0.05)

程 E-cadherin の発現が弱く、分化度の高いもの程発現が強いものが多い。これは当然のことであるが、このことは一部の細胞が脱分化していく過程の中で E-cadherin の欠損や機能異常を引き起こし、接着性を失って原病巣より離脱し、脈管を介して転移して行き易い機序を示しているものと考えられる。他臓器の E-cadherin に関する報告でも、転移を起こした原発巣における E-cadherin の発現性の低下が見られたと報告されている<sup>10)~12)</sup>。しかし今回無再発生存率も検討したが差は見られなかった。reduced type では preserved type と比較して無再発生存率が有意に低かったとする報告もあるが<sup>13)</sup>、腫瘍径が小さくても脈管侵襲があり、肝治癒切除後早期に再発するものがこれにあたる。また胃癌における報告でも E-cadherin の発現は保たれている高分化型でも肝転移を引き起こすものがあり<sup>14)</sup>、これについて Shiozaki らは E-cadherin 非減弱胃癌において肝転移を来した4症例のうち2例は原発巣において  $\alpha$ -catenin 発現減弱例であり、残る2例のうち1例は肝転移巣における E-cadherin はよく保たれていたものの  $\alpha$ -catenin の著しい減弱がみられ、 $\alpha$ -catenin の機能異常による細胞接

着機構の障害が存在したと述べている<sup>15),16)</sup>。また、Becker らは E-cadherin の機能異常は、E-cadherin の遺伝子の異常があり、exon 8 か exon 9 の片方もしくは両方の skipping によることが考えられると報告しているが<sup>17)</sup>、ここまで踏み込んだ研究は肝癌に関しては今の所ない。今後研究すべき分野といえる。

以上のように考察してみると、接着に関与する機構の一部をみたに過ぎないが、肝細胞癌原発巣における E-cadherin の発現性の減弱はある程度までその腫瘍の生物学的悪性度の指標になりうると考えられた。

稿を終えるにあたり、研究の助言、指導、校閲を賜った真鍋俊明教授および広川満良講師、清水道生講師、また切片作製に多大の技術協力をしていただいた山口昌江氏および病院病理部技師一同、そしていつも手助けしていただいた病理学教室大学院生吉田和弘氏、病理学教室菊川朋美元研究補助員、村上広子研究補助員に深謝いたします。

本研究の一部は厚生省癌特別研究班研究費(6-9)および川崎医科大学プロジェクト研究費(No. 7-306)のもとで行われた。付記して謝意を表します。

## 文 献

- 1) 日本肝癌研究会：原発性肝癌に関する追跡調査—第10報—。肝臓 34：805—813，1993
- 2) 豊坂昭弘，岡本英三，岡空達夫，山中若樹，光信正夫，折山 毅，藤本治郎：肝細胞癌の肝内転移の機序に関する検討—腫瘍流血管系の構築について—。日消外会誌 24：1121—1126，1991
- 3) Takeichi M：Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science 251：1451—1455，1991
- 4) Nagafuchi A，Takeichi M：Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion：a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. Cell Regul 1：37—44，1989
- 5) Tadaoka Y：Antigen retrieval of E-cadherin with citrate buffer and Tween from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by microwave oven heating. Kawasaki Med J 22 (in print)，1997
- 6) Shi SR，Key ME，Kalra KL：Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues：an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histochem Cytochem 39：741—748，1991
- 7) Shi SR，Cote C，Kalra KL，Taylor CR，Tandon AK：A technique for retrieving antigens in formalin-fixed, routinely acid-decalcified, celloidin-embedded human temporal bone sections for immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 40：787—792，1992

- 8) 日本肝癌研究会編：臨床・病理原発性肝癌取扱い規約，第 3 版．東京，金原出版．1992
- 9) Edmondson HA : Tumors of the liver and intrahepatic bile duct. *In* Armed Forces Institute of Pathology, Washington 1958, pp32—104
- 10) Pignatelli M, Ansari TW, Gunter P, Liu D, Hirano S, Takeiti M, Kloppel G, Lemoine NR : Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer : Correlation with lymph node metastasis, high grade , and advanced stage. *J pathology* 174 : 243—248, 1994
- 11) Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, Abe O : Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res* 49 : 2128—2133, 1989
- 12) Shimoyama Y, Hirohashi S : Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinomas : loss of E-cadherin expression in an undifferentiated carcinoma. *Cancer Lett* 57 : 131—135, 1991
- 13) 岩本伸一, 石黒信吾, 佐々木洋, 今岡真義, 塩崎 均, 岩永 剛 : 肝細胞癌の悪性度と cadherin. *病理と臨床* 12 : 791—796, 1994
- 14) Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Tahara H, Tamura S, Miyata M, Doki Y, Iihara K, Matsuyoshi N, Hirano S : Immunohistochemical evaluation of E-cadherin adhesion molecule expression in human gastric cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat* 421 : 149—156, 1992
- 15) Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M, Mori T : Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 139 : 17—23, 1991
- 16) Kadowaki T, Shiozaki H, Inoue M, Tamura S, Oka H, Doki Y, Iihara K, Matsui S, Iwazawa T, Nagafuchi A, Tsukita S, Mori T : E-cadherin and alpha-catenin expression in human esophageal cancer. *Cancer Res* 54 : 291—296, 1994
- 17) Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Huang HH, Nekarda H, Siewert JR, Hofler H : Exon skipping in the E-cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinomas. *Hum Mol Genet* 2 : 803—804, 1993