日消外会誌　33（4）：537～542，2000年

特集 6

肝癌における転移能と免疫回避機構

奈良県立医科大学第１外科
久永　倫聖　　中島　祥介　　長尾美津男　　金廣　裕道
青松　幸雄　　高　　済峯　　山田　高嗣　　中野　博重

切除肝癌47例を対象とし Fas，FasL の発現，血中 sFas，sFasL 濃度を検討し，転移・予後との関連を評価した．免疫染色による Fas，FasL の陽性例は各16，19例であり，両者の間には逆相関が認められた．浸潤リンパ球の多くは Fas，FasL を発現していた．Fas 陽性例で有意にアポトーシスが多く，Fas 陽性例は陰性例に比べ有意に再発率が低かった．また FasL 陽性例では再発率が高い傾向にあった．多変量解析では Fas は独立した再発予測因子であった．血中 sFas は健康人＜肝硬変患者＜肝癌患者であり，sFasL は健康人＝肝硬変患者＞肝癌患者であったが，肝癌における Fas，FasL 発現とは相関を認めなかった．以上より，肝癌は Fas 発現を減弱させ FasL 陽性浸潤リンパ球より逃れることで免疫機構から回避し，転移能を獲得するものと考えられた．また，sFas は肝硬変ですでに上昇しており，肝癌の発生にも関与している可能性が示唆された．

はじめに

Fas receptor（Fas）/ligand（FasL）システムは B，T リンパ球の活性化と増殖，また T リンパ球による細胞障害に重要な役割を果たすアポトーシス関連蛋白である[1]．すなわち，Fas および FasL の cross-linking により，Fas 発現細胞がアポトーシスに陥ることが知られており，ヒトにおいては心，肝，肺，腎など，各種臓器の Fas の発現が認められる[2]．中でも肝は Fas を介したアポトーシスに感受性が高く，急性および慢性肝疾患で Fas の発現が増強し，肝障害の進行に Fas/FasL システムが大きく関与するものと考えられている[3]．原発性肝癌においては Fas の発現が減弱していることが報告されており[4]，その結果，FasL 陽性の活性化 T リンパ球による傷害から逃れている可能性がある．一方，腫瘍は FasL を発現して Fas 陽性 T リンパ球を破壊し，immune privileged site を形成するとの報告がある[5]．したがって，悪性腫瘍は Fas/FasL の発現を変化させることにより，宿主の免疫監視機構を巧みに回避し，自らの増殖，進展，転移に有利な環境を形成している可能性がある．

また近年，固形癌患者における soluble Fas（sFas）の上昇[6]，血液悪性疾患患者における soluble FasL（sFasL）の存在も報告されている[7]．しかしながら，悪性腫瘍患者における Fas/FasL システムと臨床病理学的な相関，さらには sFas，sFasL と局所の Fas/FasL 発現との関係を評価した報告はみられない．今回，肝細胞癌患者における Fas/FasL の発現と血清 sFas/sFasL 値を評価するとともに，Fas との関連が注目されている wild-type p53の発現についても検討し，Fas/FasL システムを介した肝癌の免疫回避機構について考察した．

対象と方法

1．対象

1994年から1998年の５年間に当科で肝切除を施行した肝細胞癌62例のうち，47症例を対象とした．切除標本の病理組織学的機索により全例，慢性肝炎あるいは肝硬変を合併した肝細胞癌であることが確認された．

2．方法

1）Fas，FasL mRNA の RT-PCR

癌部（n=47）および20例の非癌部より，ISOGEN（Wako Life Science 社）を用いて100mg の RNA を抽出した．次に，reverse transcriptase XL（Wako Life Science 社）を用いて1μg の total RNA を鋳型として cDNA を合成し，RT-PCR を行った．cDNA50μg に dNTPs，2.5units Taq（Takara Syuzo 社），0.2μM の

＊第54回日消外会総会シンポ５・消化器癌転移能の分子生物学的側面（肝胆膵）

＜1999年12月22日受理＞別刷請求先：久永　倫聖
〒634-8522　橿原市四条町840　奈良県立医科大学第１外科

Fas，FasL 特異的プライマー[8)9)]を加えて全量を50μl とした．PCR は，94℃ 1 分，55℃ 1 分，72℃ 2 分で28サイクル行い，PCR 産物を 2% agarose ゲルにて電気泳動し，ethidium bromide 染色にて増幅の有無を確認した．

2）免疫組織染色

Fas，FasL，p53：切除標本を直ちに液体窒素で凍結後，−80℃にて保存した．癌部および凍結標本の得られた非癌部37検体より5μm の連続凍結薄層切片を作製し，Histofine SAB-PO（M）kit（Nichirei 社）を用いて，streptavidin-biotin（SAB）法により染色し，diaminobenzidine-tetrachloride（DAB）で発色後，hematoxylin にて核染色した．Fas，FasL，p53に対するモノクローナル抗体（MoAb）として，それぞれ UB2（MBL 社；10μg/ml），NOK2（Pharmingen 社；1：20 dilution），DO-7（Dako 社；1：60 dilution）を用いた．判定は，大腸癌肝転移切除例より得られた正常肝組織と同等以上の染色が認められるものを Fas 陽性とし，FasL，p53については10%以上の癌細胞で染色がみられるものを陽性とした．

TUNEL 染色：Apoptag Plus Peroxidase kit（Oncor 社）を用い，断片化された DNA 鎖の3′-OH に biotin-16dUTP を end labelling した．DAB で発色後，メチルグリーンにて核染色し，核が茶褐色に染色されたものを陽性とした．腫瘍細胞1,000〜1,500個中の陽性細胞数を百分率表示し，apoptotic index（AI 値）として検討した．

3）sFas，sFasL の測定

術前，血清の得られた肝癌患者37例，肝癌を伴わない肝硬変患者16例，さらに健常者31例についてサンドイッチ ELISA 法[7)]により血清 sFas，sFasL 濃度を測定した．Capture MoAb，detector MoAb として，sFas 測定にはそれぞれ DX-3，DX2を，sFasL においては 4H9，4A5を用いた．吸光度は Multiscan Bichromatic（Labsystem 社）により492nm で測定した．

4）統計学的解析

数値は，平均値±標準偏差（Mean±SD）で表わし，χ^2検定（Fisher's exact test），Student's *t* test，Mann-Whitney U test，Kruskal Wallis test を適宜選択して P 値を算出した．無再発生存曲線は Kaplan-Meier 法を，多変量解析による独立した予後因子の検討には Cox proportional hazards model を用いた．

結　果

1．Fas，FasL の発現

1）免疫組織染色

非癌部における Fas の発現は，正常肝組織に比べて増強しており，肝細胞表面に強い発現を認めたものが18例（48.6%）であり，その他は細胞膜よりも細胞質にその発現が顕著であった．しかし，Fas 発現の局在と，肝障害の程度には関連を認めなかった．一方，非癌部における FasL の発現は 6 例（16.2%）に認められ，正常肝組織では発現を認めなかった．Fas，FasL の発現と肝障害の程度には相関を認めなかった．また癌部およびその周囲に浸潤するリンパ球の多くは Fas，FasL ともに発現を認めた．

癌部においては16例（34.0%）が Fas 陽性であった．FasL は19例（40.4%）で陽性であり，ほとんどの症例で腫瘍先進部にその発現が認められた．癌部における Fas と FasL の発現には逆相関が認められた（p=0.005）．

2）RT-PCR

mRNA レベルの Fas，FasL 発現の結果は，2 例を除き免疫染色の結果と同じであった．その 2 例は，免疫染色で Fas，FasL 陽性リンパ球の癌部への浸潤が顕著な症例であり，癌細胞には発現を認めないにもかかわらず，癌部より抽出した mRNA を用いた RT-PCR で陽性を呈した．非癌部では全例 Fas mRNA が陽性であり，FasL は20例中 4 例が陽性であった．

2．臨床病理学的因子との関連

癌部の Fas 陽性例は 1 例も肝内転移を認めなかったのに対し，Fas 陰性では31例中 9 例（29.0%）に肝内転移を認めた（p=0.019）（**Table 1**）．また Fas 陽性例では腫瘍の分化度が高い傾向にあった．その他の因子は Fas 発現と相関を認めなかった．また，術後の無再発生存率は，Fas 陽性例が陰性例に比べて有意に高かった（p=0.0043）（**Fig. 1**）．

FasL については，陽性例が陰性例に比べて C 型肝炎の割合が多い傾向であったが，その他の因子は FasL 発現の有無と明らかな相関を認めなかった（**Table 2**）．無再発生存率は，FasL 陽性例が陰性例に比べて低い傾向を認めたが有意な差ではなかった（p=0.193）．多変量解析により肝内再発予測因子を検討すると，Fas，組織学的門脈浸潤，被膜形成，多発性が独立した危険因子であった（**Table 3**）．

3．apoptosis と p53発現

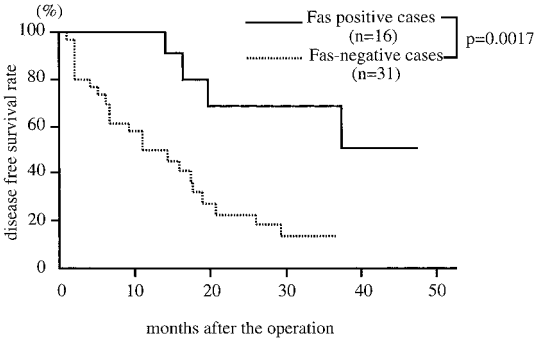
Fas 陽性例は陰性例に比べて，有意に AI 値が高く（p=0.003），FasL 陽性例は陰性例に比べ，AI 値が傾向にあった（**Table 4**）．癌部の p53は47例中12例（25.5%）

Table 1 Clinicopathological features of HCC with regard to Fas expression

Factors	Fas positive (n=16)	Fas negative (n=31)	p value
Gender(male/female)	13/3	23/8	N.S.[3]
Age(mean±SD)	63.7±10.0yr.	64.4±8.8yr.	N.S.[4]
Hepatitis viral infection(B/C/NBNC)[1]	3/9/5	8/12/3	N.S.[3]
AFR(median)	13.6 ng/ml	53.2 ng/ml	0.094[5]
(range)	(1.3—41,600)	(1.3—41,600)	
Tumor size(mean±SD)[2]	3.9±2.7cm	5.2±3.3cm	N.S.[4]
Stage Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ/Ⅳ	2/10/2/2	2/16/9/4	N.S.[5]
Cases with multiple tumors	25.0%(4/16)	12.9%(4/31)	N.S.[3]
Cases with histological capsular formation	75.0%(12/16)	67.7%(21/31)	N.S.[3]
Cases with histological capsular infiltration	75.0%(9/12)	85.7%(18/21)	N.S.[3]
Histology(well/moderately/poorly)[2]	2/11/13	1/14/16	0.069[3]
Cases with histological portal invasion	62.5%(10/16)	67.7%(21/31)	N.S.[3]
Cases with histological metastatic foci	0%	29.0%(9/31)	0.019[3]

[1]B, positive for hepatitis B surface antigen；C, positive antibody against hepatitis C virus and NBNC, negative B antigen nor C antibodies (including two cases with both positive of B and C)
[2] In case of multiple tumors, tumor size and histology are expressed by examining the largest tumor
[3] Chi square test or Fisher 's exact test
[4] Student 's t test
[5] Mann-Whitney U test

Fig. 1 Disease-free survival curves for Fas-positive and-negative patients, respectively. The disease-free survival rate of Fas-positive patients was significantly higher than that of Fas-negative patients (p=0.0017)



が陽性であった．p53陽性例は全例 Fas 陰性であり，Fas 陽性例は全例 p53陰性であった．一方，p53と FasL 発現には相関を認めなかった．

4．血清 sFas, sFasL 値

sFas，SFasL の検出域は，それぞれ50pg/mL，8pg/mL 以上であった．健常者，肝硬変患者，肝癌患者における Fas の中央値は，それぞれ228.2，302.4，712.4pg/mL であり，FasL はそれぞれ32.2，32.4，19.0pg/mL であった．血清 sFas，sFasL 値はともに，3 群間で有意差が認められた(p<0.001)．しかしこれらは，癌部の Fas/FasL 発現，AI 値のいずれとも相関を認めなかった．

考　察

癌細胞の転移巣形成には，血管新生，腫瘍細胞の血管内進入，血流による循環，血管内皮細胞への接着，血管外への遊走など，いくつかのプロセスが必要となる．これらの因子に加え，癌細胞は循環血中に入ると直接宿主の免疫機構にさらされるため，転移巣の形成には宿主の免疫監視機構から回避することが必要となる．今回，Fas/FasL の発現と肝癌患者における臨床病理学的因子の検討から，Fas の減弱と肝内転移との相関が示された．また，Fas 陰性例では術後の無再発生存率が有意に低いことが明らかとなった．肝癌組織周囲に浸潤するリンパ球は FasL の発現を示すことが確認されたが，肝癌細胞は FasL 陽性リンパ球によるアポトーシスを免れるため，Fas の発現を変化させることにより宿主の免疫機構から巧みに逃れ，転移巣を形成するものと考えられる．

Table 2　Clinicopathological features of HCC with regard to FasL expression

Factors	FasL positive (n=19)	FasL negative (n=28)	p value
Gender(male/female)	15/4	21/7	N.S.[3]
Age(mean ± SD)	65.7±10.8yr.	63.0±7.6yr.	N.S.[4]
Hepatitis viral infection(B/C/NBNC)[1]	1/15/3	10/5/5	0.058[3]
AFP(median)	40.4ng/ml	26.4ng/ml	N.S.[5]
(range)	(3—21,600)	(1.3—41,600)	
Tumor size(mean±SD)[2]	5.7±3.3cm	4.1 ± 2.9c,m	0.088[4]
Stage Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ/Ⅳ	1/10/4/4	3/16/7/2	N.S.[5]
Cases with multiple tumors	21.1%(4/19)	14.3%(4/28)	N.S.[3]
Cases with histological capsular formation	68.4%(13/19)	71.4%(20/28)	N.S.[3]
Cases with histological capsular infiltration	76.9%(10/13)	85.0%(17/20)	N.S.[3]
Histology(well/moderately/poorly)[2]	0/9/10	3/16/9	N.S.[3]
Cases with histological portal invasion	68.4%(13/19)	64.3%(18/28)	N.S.[3]
Cases with histological metastatic foci	21.1%(4/19)	17.9%(5/28)	N.S.[3]

[1] B, positive for hepatitis B surface antigen ; C, positive antibody against hepatitis C virus and NBNC, negative B antigen nor C antibodies (including two case with both positive of B and C)
[2] In case of multiple tumors, tumor size and histology are expressed by examining the largest tumor
[3] Chi square test or Fisher 's exact test
[4] Student 's t test
[5] Mann-Whitney U test

Table 3　Results of multivariate analysis for predictive factors associated with intrahepatic recurrence

variabes		Hazard ratio	95% confidence intervals	p value[1]
Fas	positive vs. negative	0.035	0.004—0.291	0.002
FasL	positive vs. negative	1.486	0.518—4.258	0.461
Histological grading	well, moderately vs. poorly	0.287	0.061—1.256	0.106
Histological portal invasion	posiftve vs. negative	5.082	1.252—20.639	0.023
Histological capsular formation	positive vs. negative	0.181	0.0540—0.606	0.006
Size(cm)	continuous variables	1.085	0.913—1.290	0.353
AFP(ng/ml)	continuous variables	1.000	1.000—1.000	0.215
Multiplicity	solitary vs. multiple	9.924	1.497—65.793	0.017

[1] Cox proportional hazards regression model

Shiraki ら[10]は，大腸癌の肝転移巣成立において，FasL の発現が重要であるとしている．すなわち，癌細胞が FasL を発現することにより，Fas 陽性の肝細胞をアポトーシスに陥れ，その間隙に転移巣を形成(colonization)し，増大するとしている．しかし今回の検討からは，FasL と肝内転移との間には相関を認めなかった．その理由の一つとして，肝癌においては慢性肝疾患の存在があげられる．肝癌は線維化を伴う慢性肝障害をその発生母地としているが，癌細胞は周囲の豊富な結合組織を変性させ，転移巣を形成，増殖することが求められる．そのためには FasL の発現よりもマトリックスメタロプロテネース[11]などの融解酵素が転移巣形成により大きな役割を果たすのかもしれない．

ところで，肝癌の Fas を介した免疫回避機構には以下の 3 つの機序が考えられる．まず第 1 に，細胞表面上の Fas 発現を減弱あるいは消失することにより，

Table 4 Relationship between Fas/FasL system and apoptotic index and p53 status

	Fas		p value	FasL		p value
	positive (n=16)	negative (n=31)		positive (n=19)	negative (n=28)	
apoptotic index median(range)	2.69 (0.8—4.3)	1.17 (0.4—2.2)	p=0.003[1]	1.10 (0.4—3.1)	1.79 (0.4—4.3)	0.066[1]
p53 positivity	0%	38.7% (12/31)	p=0.004[2]	36.8% (7/19)	17.9% (5/28)	N.S.[2]

[1] Mann-Whitney U test
[2] Fisher 's exact test

Fas/FasLによるアポトーシスに抵抗性を示すことが考えられる．事実，肝癌細胞はFas発現を減弱しているものが多く，AIとFas発現に有意な相関関係が認められ，肝内転移を認めた症例は全例Fas陰性であった．第2に，sFasを産生することによりFasL陽性浸潤リンパ球によるアポトーシスから逃れている可能性がある．すなわち，alternative suplicing[12]により，sFasを産生することで，decoyとしてFasL陽性リンパ球をマスクし，自らを防御しているものと推察できる．第3に，Fasのシグナル伝達を阻止する何らかの機序が働いて，Fasを介したアポトーシスに対する抵抗性を獲得している可能性がある．

肝癌患者のみならず，肝硬変患者においてとsFasが高値を示した．このことは，浸潤リンパ球による攻撃から自らを守ることにより肝障害の進行を防御している一方，肝癌の発生しやすい環境を形成しているとも解釈できる．すなわち，肝障害の進行を防御するという事実が，宿主の免疫監視から逃れ，自ら発癌に有利な環境を提供するという皮肉な現象を生んでいるのかもしれない．したがって，肝癌細胞はFas/FasL発現を変化させることにより増殖，転移に関わっているとともに，慢性肝疾患からの発癌という側面においてもFas/FasLシステムが関与している可能性がある．著者らはRT-PCRにより，sFasの起源は癌細胞よりもむしろ非癌部硬変肝細胞，あるいは浸潤リンパ球であることを確認している．癌細胞が周囲組織にサイトカインなどのケミカルメディエーターを介してsFas産生のシグナル伝達をしている可能性も考えられるが，肝癌患者でsFasLが低下していた理由も含め，その機序については今後の検討が必要である．

食道癌，大腸癌，悪性リンパ腫などにおいては，FasとFasLがともに発現しているという報告がみられる[13)~15)]．しかし，肝癌においては今回の検討のごとく，両者の間に逆相関がみられた．肝癌ではまずFasの発現が減弱して，その後にFasLが発現する，換言すれば，FasLの発現にはFasのdown-regulationが必要であるという考え方と，逆相関を示したのは単なる結果であり，それぞれは独立して発現するという可能性がある．その理由は不明であるが，6例において癌組織周囲のFas陽性非癌部肝細胞で，FasLの発現が認められたこと，また，p53の発現はFasのみに相関がみられたこと，さらに肝炎ウイルスの存在はFasLにのみ傾向がみられたことから，FasとFasLは異なる機序によって制御されている可能性が高いと考えられる．肝臓は他臓器に比べてFasを介するアポトーシスに感受性が高く[3]，また慢性肝障害が併存しているため浸潤リンパ球も豊富であり，他の固形癌に比べて臓器特異性が高いことが一因かもしれない．

ところで，Owen-Schaubら[16]はwild-type（wt）p53のみがFas発現を誘導しえるとしており，今回の検討でも，癌部のFas陽性例は全例p53陰性であった．すなわち，肝癌においてもFasの発現にはwt p53の存在が重要であることが明らかとなった．しかし，p53陰性例35例のうち12例にFas発現の減弱，消失を認め，wt p53以外にFas発現を調節している因子が存在しているものと考えられる．今後，肝癌患者における予後指標としてのみならず，治療への応用を考えるうえでも，Fas/FasL発現に関わるシグナル伝達機構の解明が求められる．

文　献

1）Nagata S, Golstein P：The Fas death factor. Science **267**：1449—1456, 1995
2）Leithaeuser F, Dhein J, Mechtersheimer G et al：Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve-growth-factor / necrosis-factor-receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. Lab Invest **69**：415—429,

1993
3) Ogasawara J, Fukunaga R, Adachi M et al：Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. Nature **364**：806—809, 1993
4) Galle PR, Hofman WJ, Walczak H et al：Involvement of the APO-1/Fas（CD95）receptor and ligand in liver damage. J Exp Med **182**：1223—1230, 1995
5) Hahne M, Rimoldi D, Schroter M et al：Melanoma cell expression of Fas（APO-1/CD95）ligand：implication for tumor immune escape. Science **274**：1363—1366, 1996
6) Cheng J, Zhou T, Liu C et al：Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. Science **263**：1759—1762, 1994
7) Tanaka M, Suda T, Haze K et al：Fas ligand in human serum. Nat Med **2**：317—322, 1996
8) Liu C, Cheng J, Mountz JD：Differential expression of human Fas mRNA upon peripheral blood mononuclear cell activation. Biochem J **310**：957—963, 1995
9) Peter ME, Dhein J, Ehret A et al：APO-1 (CD95)-dependent and -independent antigen receptor- induced apoptosis in human T and B cell lines. Int Immunol **7**：1873—1877, 1995
10) Shiraki K, Tsuji N, Shioda T et al：Expression of Fas ligand in liver metastasis of human colonic adenocarcinomas. Proc Natl Acad Sci USA **94**：6420—6425, 1997
11) Arii S, Mise M, Harada T et al：Overexpression of matrix metalloproteinase 9 gene in hepatocellular carcinoma with invasive potential. Hepatology **24**：316—322, 1996
12) Cascino I, Fiucci G, Papohh G et al：Three functional soluble forms of human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. I Immunol **154**：2706—2713, 1995
13) O 'Connell J, O 'Sullivan GC, Collins JK et al：The Fas counterattack：Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. J Exp Med **184**：1075—1082, 1996
14) Nagata S：Fas ligand and immune evasion：expression of a death factor by tumor cells may explain their escape from immune attack. Nat Med **2**：1306—1307, 1996
15) Bennett MW, O 'Connell J, O 'Sullivan GC et al：The Fas counterattack in vivo：apoptotic depletion of tumor infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. J Immunol **160**：5669—5675, 1998
16) Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC et al：Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. Mol Cell Biol **15**：3032—3040, 1995

Progression of Hepatocellular Carcinoma and the Host Immune System

Michiyoshi Hisanaga, Yoshiyuki Nakajima, Mitsuo Nagao, Hiromichi Kanehiro, Yukio Aomatsu, Saiho Ko, Takatsugu Yamada and Hiroshige Nakano

Department of Surgery 1, Nara Medical University

We investigated the expression of Fas receptor（Fas)/ligand（FasL）in 47 patients with hepatocellular carcinoma（HCC). Fas and FasL expression were detected in 16 patients and 19 patients by immunohistochemistry and RT-PCR, respectively. An inverse relationship was noted between Fas and FasL expression in HCCs. In noncancerous liver tissue（n=37), Fas expression on the cell surface was upregulated in 18 cases, and FasL expression was detected in 6 cases. In the Fas-positive cases, there was more tumor cell apoptosis, and the disease-free survival rate was higher, compared with the Fas-negative cases. The soluble Fas (sFas) and soluble FasL (sFasL) levels of the HCC patients were significantly higher and lower, respectively, than in healthy volunteer. Generation of sFas was detected in the hepatocytes and tumor-infiltrating cells rather than in the hepatoma cells. These results indicate that hepatoma cells may stop expressing Fas on themselves and let the hepatocytes and tumor-infiltrating cells generate sFas to escape the host immune system and to produce metastasis. The fact that hepatocytes in the pericancerous pseudolobules expressed FasL suggests that FasL may contribute to malignant transformation and carcinogenesis.

Key words：Hepatocellular carcinoma, Fas, Fas ligand（FasL）

〔Jpn J Gastroenterol Surg 33：537—542, 2000〕

Reprint requests：Michiyoshi Hisanaga　Department of Surgery 1, Nara Medical University
840 Shijo-cho, Kashihara, Nara, 634—8522 JAPAN