

日本における肝細胞腺腫の研究：
臨床病理学的、免疫組織学的、分子病理学的研究
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
病理系形態病理学専攻

伊豆 麻未

2018年

指導教員 杉谷 雅彦

論文の要約

背景

肝細胞腺腫(Hepatocellular adenoma, HCA)は一般に肝硬変のない肝臓に発生する肝細胞性良性腫瘍である。HCAは比較的稀な腫瘍であり、発生頻度は、欧米で人口100,000人あたり約3-4人と報告されている。好発年齢や性差に関しては、欧米ではおよそ85%の症例が若年女性で占められ、特に経口避妊薬の服用との関係が指摘されている。幼児、男性、老年者の症例は稀である。一方、日本を含むアジア諸国では、欧米の発生頻度に比べて低いと考えられているが、現在までのところ、日本ではHCAの正確な発生頻度を把握できていないのが事実である。HCAの治療としては、症例によって多血性であることから腫瘍径の大きいものでは破裂や癌化の危険性があるため、外科的切除が一般的である。

HCAは希少疾患であることから、これまで詳細不明な点が多かったが、分子生物学的研究の発展により、近年、HCAの多くは遺伝子異常により発生することが明らかとなった。遺伝子型および表現型によるHCAの亜型分類が報告され、亜型ごとの病理学的特徴が知られるようになり、2010年WHO Classification of Tumors of the Digestive SystemにHCAの亜型分類が掲載された。具体的には、免疫組織学的および遺伝子突然変異の特徴をもとにHepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α) inactivated HCA (HHCA)、 β -catenin activated HCA (bHCA)、Inflammatory HCA (IHCA)に分類され、これらのいずれの特徴も持たないものをUnclassified HCA (UHCA)とし、計4つの亜型に分類している。亜型ごとに特徴的な遺伝子突然変異が知られていて、代表的なものとしては、HHCAではHNF1A

(hepatocyte nuclear factor 1A)、bHCA は CTNNB1 (exon 3, exon 7/8)、IHCA では IL6ST、gp130、STAT3、GNAS、JAK1、FRK などが報告されている。UHCA に関しては、特異的な遺伝子突然変異はまだ報告がない。これらの遺伝子学的特徴に伴い、HHCA, bHCA, IHCA では具体的な免疫組織学的特徴が知られており、HHCA では Liver fatty acid binding protein (L-FABP)が陰性、bHCA では glutamine synthetase (GS)がびまん性に陽性かつ β -catenin が核に陽性、IHCA では serum amyloid A (SAA)かつ/あるいは C-reactive protein (CRP)が陽性となることが明らかとなっている。遺伝子型と免疫組織化学染色による表現型が一致することから、この分類が支持され、近年では日本でも HCA の研究が広まりつつある。亜型ごとに臨床病理学的特徴が異なる点、また、特に bHCA は肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC)への悪性転化が高頻度で起こると報告されている点から、HCA の病理診断における亜型分類は重要であるといえる。

目的：

本研究の目的は、集積した日本の HCA 症例を用いて、臨床病理学的観点、遺伝子学的観点から検討し、日本における HCA の特徴および各亜型の特徴を見出すこと、悪性転化に関する特徴を検索することである。また、これらの結果をもとに、他国の症例と比較検討し、日本と他国の HCA 症例の共通点、相違点を検討する。

対象と方法：

症例：

関東を中心とした 23 施設で肝切除が行われ、HCA が疑われた症例で、適切な臨床情報を取得した 37 名を対象とし、そのホルマリン固定パラフィン (Formalin fixed paraffin embedded, FFPE) 切片組織を研究試料として用いた。

方法：

1. 免疫組織化学染色法

本実験では、HCA の亜型分類に WHO 分類で推奨されている L-FABP, GS, β -catenin, SAA, CRP の 5 種類の一次抗体、および HCC 診断で用いられる Glypican 3 抗体を使用した。脱パラフィン、抗原賦活化、前処理、一次抗体反応、二次抗体反応、発色、対比染色までの行程をベンタナ XT システムディスカバリー (Roche Diagnostics K.K.) を用いて行った。HE 所見と染色結果から各亜型分類を行った。

2. 統計学的解析

HCA の各亜型と臨床的背景因子との関連性に関する統計処理を施行した。HCA の亜型と年齢の関係は一元配置の分散分析を用いて検討した。性別、薬剤歴の有無、糖原病 (Glycogen storage disease, GSD) の有無、Hepatitis B virus (HBV)、Hepatitis C virus (HCV) 感染の有無、糖尿病 (Diabetes mellitus, DM) 罹患の有無、肥満症の有無、高脂血症の有無、HCC の合併の有無についてはカイ 2 乗検定を用いて検討した。これらの解析は JMP (Statistical Analysis System Institute Inc, Cary, NC, USA) を用いて行った。

3. 遺伝子解析

37 症例のうち UHCA 2 例の FFPE 切片から、マクロダイセクションにて腫瘍部、非腫瘍部肝組織を切り出し、DNA 抽出を行った。続いて、PCR ダイレクトシーケンス法を用いて HNF1A, IL6ST 遺伝子の変異の有無を検索した。次に、UHCA 症例における新たな遺伝子突然変異の有無を検討する目的で、UHCA 1 症例に対し、409 がん関連遺伝子 Comprehensive Cancer Panel (CCP)を用いて次世代シーケンサー(New-generation Sequencing, NGS)による網羅的遺伝子変異の検索を行った。解析には Ion Reporter Tumor-Normal pair analysis (ver 5.2)を用いた。

結果

1. 免疫組織化学染色を用いた亜型分類と臨床的背景因子との関連性

本研究の結果、HHCA 9 例(24%)、bHCA 4 例(11%)、IHCA 16 例(43%)、UHCA 8 例(22%)であった。HCA の亜型と臨床的背景因子について統計学的解析を行なった結果、亜型 4 群と年齢との間に有意な関係は見られなかったが、bHCA が IHCA よりも高齢の傾向が見られた。性別、GSD、薬剤歴、HBV、HCV、DM、肥満、高脂血症の臨床的背景因子と各亜型の間にも統計学的に有意な関係は認めなかった。飲酒歴については、飲酒歴ありの 6 例が全て IHCA に分類され、カイ二乗検定で有意な関係を認めた($p=0.02$)。

2. 遺伝子学的解析

1) PCR ダイレクトシーケンス法による検討結果

HNF1A 遺伝子で報告のある mutation position と IL6ST 遺伝子で報告のある mutation position を標的として PCR ダイレクトシーケンス法による塩

基配列解析を行なった結果、UHCA 2 例の病変部からは HNF1A、IL6ST 遺伝子のいずれの変異も検出されなかった。

2) NGS による検討結果

NGS を用いて UHCA 1 症例を検討した結果、missense 変異である JAK3 変異と nonsense 変異である SYNE1 変異を認めた。

考察

日本における HCA の研究は少なく不明な点が多い。そのため、本研究では日本人 37 症例の HCA を収集し、臨床的背景の調査、免疫組織化学染色および遺伝子学的研究を施行した。

HCA と臨床的背景因子の関係については、日本と欧米でいくつかの相違点が見られた。欧米では小児や高齢者、男性患者は稀で若年女性が多いが、日本では比較的高齢に多く認められ、男性患者が約半数を占めていた。また、日本の症例では欧米と異なり経口避妊薬等の薬剤歴は少数であったが、これは経口避妊薬の使用概念・普及の違いによるものと考えられる。本研究で純アルコール摂取量が 40g/日以上飲酒歴のある HCA 患者は 6 例で、その全てが IHCA であり有意な関係が見られた($p=0.02$)。このことから、日本の HCA においては基準値以上の飲酒歴が IHCA のリスクファクターとなる可能性が示唆された。今回、37 例中 3 例で HCC の合併が見られたが、これらに共通項は見出せなかった。

次に、日本と欧米の HCA の各亜型の割合を比較した結果、類似点としては IHCA と HHCA の 2 つが多くを占めたことが挙げられ、相違点としては UHCA が欧米より高い割合で認められたことが挙げられた。このことから、IHCA は人

種や臨床的背景因子に関わらず共通してHCAの主要な亜型であることが推測される。

遺伝子学的検討では、NGSを用いて検索した結果、UHCA 1 症例から missense 変異である JAK3 変異と nonsense 変異である SYNE1 変異を認めた。JAK3 は JAK1 と同様、JAK/STAT 経路に関与しているが活性化するサイトカインの種類は異なる。データベース上、JAK3, SYNE1 とともに HCA での報告はみられない。今回認めた JAK3 と SYNE1 の変異に関して、他の UHCA 症例でも同様の変異が認められるか多数症例での検証が望まれる。

まとめ

今回、我々は免疫組織化学染色法を用いた国内の HCA の亜型分類を行い、国内症例における HCA の特徴および臨床的背景因子との関連を調べた。欧米に比べ UHCA の割合、男性症例、高齢症例が多く認められ、経口避妊薬との関連は低かった。一方で、日本においては飲酒が IHCA のリスクファクターとなる可能性が示唆された。また、FFPE 切片を用いて、DNA を抽出し遺伝子学的検討を試みた結果、UHCA の 1 症例から JAK3, SYNE1 遺伝子突然変異を検出した。これらの遺伝子突然変異は HCA のデータベース上で現在のところ報告がなく、真に特異的な変異であるか、また生体内でどのような影響を及ぼすのか、今後の研究課題となりうる新規性のある結論を得た。