

肝臓における COX-2, NF-κB, VEGF 発現の臨床的意義 -慢性炎症と癌との関連性についての一考察-

瀬川 徹[†]

IRYO Vol. 69 No. 3 (151-155) 2015

要 旨

近年、慢性炎症は発癌のみならず癌細胞の進展にも関与することが示されている。本研究では肝臓の進展・再発に炎症性メディエーターである COX-2, NF-κB と血管新生因子 VEGF がいかに関与しているかにつき検討し、炎症と血管新生の相関性について考察した。自験例35例の肝臓切除症例を対象とし、癌部、非癌部で COX-2, NF-κB, VEGF の免疫組織染色を行い、過剰発現と臨床病理学的因子、早期再発との関連性および各蛋白発現の相関の有無を検索した。結果：癌部・非癌部共に VEGF の高発現頻度が高かった。癌部での高発現では各蛋白共に平均腫瘍径、多発例、腫瘍分化度別に差はなく、脈管侵襲の有無および stage でも発現頻度に有意差を認めなかった。切除後の再発例では COX-2 は癌部、非癌部共に発現頻度が高い傾向であったが有意差は認めなかった。また COX-2, NF-κB, VEGF 相互の関連性も認められなかった。結語：COX-2, NF-κB, VEGF は肝臓の早期から発現し、進展・再発との関連性は明らかでなく、炎症性サイトカインと血管新生因子の相互作用についても言及できなかった。

キーワード COX-2, NF-κB, VEGF, 慢性炎症, 肝細胞癌

はじめに

1863年ドイツの Virchow は“癌は、何らかの刺激によって組織が損傷し、その局所炎症から生じる”という説を提唱し、炎症と癌発症との関連性を示唆した。また NSAIDs(非ステロイド性抗炎症薬)を服用している人の発癌率が低いことが報告¹⁾され、その後の疫学研究で、癌の発生要因の中で感染症の

占める割合を推計した結果、現在ではウイルス感染も含めると約25%と考えられている²⁾。慢性炎症と関わりのある癌としては、潰瘍性大腸炎やクローン病と大腸癌、B型・C型肝炎ウイルス感染と肝細胞癌(肝臓)、ピロリ菌感染で発生する胃癌、パピローマウイルスと子宮頸癌などが臨床的に認められている。

肝臓は臨床的には多血性腫瘍で肝内転移、門脈腫

国立病院機構村山医療センター †医師

別刷請求先：瀬川 徹 国立病院機構村山医療センター 副院長 〒208-0011 東京都武蔵村山市学園2-37-1

e-mail : segawat@murayama.hosp.go.jp

(平成25年10月16日受付, 平成26年11月21日受理)

The Clinical Significance of Vascular Endothelial Growth Factor Expression, Cyclooxygenase-2, Nuclear Factor-Kappa B in Hepatocellular Carcinoma: Relationship between Chronic Inflammation and Cancer Progression

Tohru Segawa, NHO Murayama Medical Center

(Received Oct. 16, 2013, Accepted Nov. 21, 2014)

Key Words: COX-2, NF-κB, VEGF, chronic inflammation, hepatocellular carcinoma

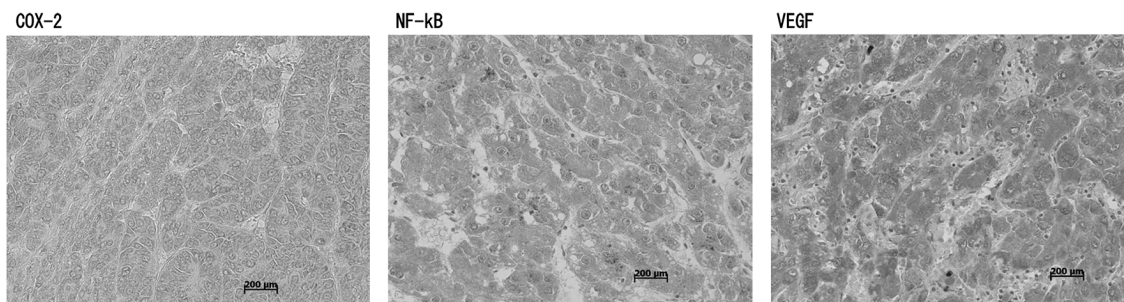


図1 免疫組織染色における COX-2 (癌部), NF-κB (癌部), VEGF (癌部) の発現

瘍栓を早期より認め、無症状に経過することにより進行癌で発見されることが多い。また外科的に切除されても術後早期に残肝や肺、骨などの遠隔転移として再発を認めることも多く、肝癌の増殖・進展・再発には血管新生が深く関与していると考えられている。さらに肝癌の治療成績は依然として不良であるが、予後不良の要因としては治療後の再発が高率であることが指摘されている³⁾。したがって肝癌の増殖・進展・再発を検討することは肝癌の病態解明に重要であり、治療成績の向上に寄与すると考えられる。

本研究では肝癌の発癌・進展と炎症との関連性を検討するために、炎症のメディエーターとして cyclooxygenase (COX)-2 と nuclear factor-κB (NF-κB)、血管新生因子として vascular endothelial growth factor (VEGF) を肝切除標本を用いて免疫組織学的手法で蛋白発現を検索し、COX-2, NF-κB, VEGF 相互の関連性を調べ、肝癌の進展および再発への関与を検討し、炎症と癌進展につき考察する。

対象と方法

自験例35例の肝癌切除症例を対象とした。男性29例、女性6例で平均年齢は66歳(49-74)。Hepatitis B virus (HBV) 陽性は1例、hepatitis C virus (HCV) 陽性は27例、組織学的に肝硬変の併存は18例であった。切除肝組織標本の癌部、非癌部で COX-2, NF-κB, VEGF の免疫組織染色(免染)を行い、各蛋白の過剰発現と肝癌取扱い規約⁴⁾の臨床病理学的因子(腫瘍径、個数、分化度、脈管侵襲、stage、非癌部の肝硬変)および切除後2年以内の早期再発との関連性を検討すると共に、各蛋白発現相互の相関性について χ^2 検定を用いて検定した。

COX-2・NF-κB・VEGF の免疫組織染色：

切除肝組織の癌部、非癌部のパラフィン包埋切片をキシレンで脱パラし、アルコールでdehydrationの後、10%過酸化水素で非特異的抗体をブロックした。続いてmicrowaveで抗原を賦活化し、phosphate-buffered saline (PBS) で一次抗体 (goat anti-human polyclonal COX-2 antibody, mouse anti-human monoclonal NF-κB antibody, rabbit anti-human polyclonal VEGF antibody) を100倍希釈し、4℃で一昼夜incubationした。その後PBSで洗浄し二次抗体、ペルオキシダーゼ標識アビジン液 (Scy Tek Labo. INC, USA) でincubationし diaminobenzidine (DAB) で発色後、ヘマトキシリンで核染色を行い光学顕微鏡で観察した。

COX-2・NF-κB・VEGF 発現の評価法：

各蛋白の発現は(1)染色範囲(染色の範囲がプレパラート標本の<25%の場合：1点、<50%：2点、<75%：3点、 $\geq 75%$ ：4点)、(2)染色強度(染色なしか弱染色：1点、中等度の染色：2点、強染色：3点)とし、(1)+(2)の和が2点の場合は低発現、3点以上の場合には高発現と規定した。

なお、本研究は当村山医療センターの倫理審査委員会で承認を得て実施した。

結 果

1. COX-2・NF-κB・VEGF 発現 (図1)

COX-2は肝細胞および肝癌細胞の細胞質に褐色の顆粒状染色を認めた。癌部・非癌部での高発現の頻度は、各々53%、55%であった。NF-κBの発現は肝細胞および肝癌細胞の細胞質と核内に褐色の小顆粒状に染色された。癌部・非癌部での高発現頻度は各々51%、65%であった。VEGFは肝細胞およ

表 症例の臨床病理学的因子

		n=35 (%)
腫瘍径	T ≥ 5cm	13 (37%)
	T < 5cm	22 (63%)
腫瘍個数	単発	23 (66%)
	多発	12 (34%)
分化度	高分化	7 (20%)
	中分化	24 (69%)
	低分化	4 (11%)
脈管侵襲	(+)	17 (49%)
	(-)	18 (51%)
Stage	I + II	15 (29%)
	III + IV	20 (71%)

び肝癌細胞の細胞質に小顆粒状に染色された。癌部・非癌部の高発現頻度は各々83%、77%であった。したがって癌部・非癌部ともに VEGF の発現頻度が最も高かった。

2. 腫瘍径, 腫瘍個数, 分化度, 脈管侵襲, stage (表)

腫瘍径を5 cm未満と5 cm以上, 腫瘍個数を単発と多発, 分化度を高分化, 中分化, 低分化に分け, 脈管侵襲をあり(+), なし(-), stageをI+IIとIII+IVの2群に分けると, 腫瘍径5 cm未満(63%), 単発例(66%), 中分化度(69%), 脈管侵襲陰性(51%), stage III+IV(71%)の頻度が高かった。

3. 癌部での COX-2・NF-κB・VEGF の発現

癌部でのCOX-2, NF-κB, VEGF高発現の平均腫瘍径は, COX-2では5.1cm, NF-κBでは5.1cm, VEGFでは5.3cmと差はなく, 多発腫瘍例ではCOX-2は27%, NF-κBは29%, VEGFは31%と腫瘍径, 腫瘍個数共に高発現の頻度に差を認めなかった。

脈管侵襲の有無とCOX-2, NF-κB, VEGF発現(図2)では, 脈管侵襲ありがCOX-2 60%, NF-κB53%, VEGF50%であった。

Stage別とCOX-2, NF-κB, VEGF発現(図2)では, COX-2高発現はstage I+IIが47%, stage III+IVは53%, NF-κBはstage I+IIが41%, stage III+IVは59%, VEGFはstage I+IIが50%, stage III+IVは50%であり, COX-2, NF-κBは進行例

で高発現の頻度が高い傾向であったが, 有意ではなかった。したがってCOX-2, NF-κB, VEGFは共に肝癌の比較的早期から発現し, 進展症例でも発現頻度に差を認めなかった。

術後2年以内の早期再発とCOX-2, NF-κB, VEGF発現の関連性では, 再発あり(n=14)ではCOX-2は54%, NF-κB36%, VEGF43%が高発現であり, COX-2で頻度が高かったが, 有意ではなかった。

4. 非癌部での COX-2・NF-κB・VEGF の発現

非癌部での発現はCOX-2が肝硬変に比し慢性肝炎(62%)で頻度が高く, NF-κB, VEGFは肝硬変で各々57%, 50%であり慢性肝炎と差がなかった。

再発例の非癌部での発現は, COX-2は54%, NF-κB35%, VEGF48%であり, COX-2の頻度が高かったが有意ではなく, 再発と非癌部での発現には関連は認めなかった。

5. COX-2・NF-κB・VEGF の発現の相関

癌部におけるCOX-2, NF-κB, VEGF発現では, 3因子間の相関性は明らかでなかった。

考 察

近年, 慢性炎症による発癌および癌の進展に及ぼす影響について分子生物学的に検討されてきた。この炎症と癌との関連性を考える場合, COX-2やNF-κBが炎症のメディエーターとして炎症性の血管新生に関与しており, 発癌や癌の進展に関わっていることが報告⁵⁾されている。

COXはアラキドン酸カスケードでのprostaglandin(PG)合成系における律速酵素である。肝癌との関連性については, COX-2は肝癌の高分化型で発現され早期の段階での関連性が報告⁶⁾されている。しかしCOX-2によりVEGFを活性化し, 血管新生を誘導することにより肝癌の増殖・進展に関与するとの報告⁷⁾もあり一定の見解には至っていない。本研究では肝癌の分化度には差がなく, 癌部でのCOX-2の発現は脈管侵襲例, stage進行例など肝癌進行例で高発現の傾向があったが, 統計学的に有意差は認めなかった。

NF-κBはサイトカインやストレスの刺激などで活性化される転写因子であり, 癌では多くの場合, 腫瘍細胞周囲の炎症細胞において, 各種のサイトカ

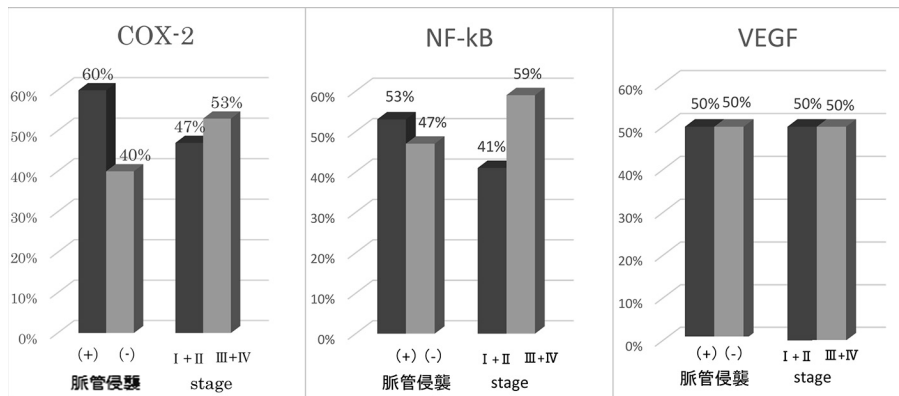


図2 脈管侵襲の有無と stage 別の COX-2, NF-κB, VEGF の発現頻度

インなどで NF-κB の恒常的活性化が認められ、増殖因子や VEGF などの血管新生因子が産生される。したがって NF-κB は肝癌の発癌・進展に重要な炎症性メディエーターであるとの報告⁸⁾があるが、本研究結果では NF-κB 発現は肝癌の進展・再発との関連性はなかった。

一方血管新生は癌の増殖と転移を促進させるために重要であり、VEGF は癌腫の増殖・転移に関連する主要な蛋白と考えられ、種々のサイトカインや低酸素⁹⁾により発現が増大する。本研究では VEGF が癌部・非癌部での発現で最も頻度が高かったが、術前治療として肝動脈化学塞栓術 (Transcatheter Arterial Chemoembolization: TACE) が施行され、癌部が疎血になり VEGF 蛋白の発現が高められたと考えられた。文献的にも術前 TACE 施行例で VEGF 発現が未施行と比較し増強したと報告¹⁰⁾され、TACE は VEGF 発現に少なからず影響を与える。本研究では VEGF は脈管侵襲の有無や stage に依存しなかったことより、血管新生は臨床的に肝癌の比較的早期の段階より発現すると考えられた。

肝切除後の早期再発に関する検討では、COX-2 が癌部・非癌部共に再発例で発現頻度が高い傾向であった。Kondo らの報告¹¹⁾では肝癌切除標本の非癌部 COX-2 発現は非癌部肝組織の活動性肝炎と関連し、無再発生存と反比例したことから肝癌術後再発に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

肝癌は炎症性シグナルが活性化し、転写因子を発現させ、発癌および癌の進展に深く関与していることより、炎症性サイトカインとして COX-2, NF-κB, 血管新生因子として VEGF を検索し関連性について検討したが、3 因子共に肝癌の比較的早期から発現し、進行例との発現頻度に差を認めず、術後

再発の有無にても発現頻度に有意差はなく、炎症性サイトカインと血管新生因子との相互作用についても言及できなかった。しかし本研究では症例数が少なく、前治療としての肝動注療法や TACE 等の影響もあるため、さらに症例を重ねて検討を要する。

肝癌は慢性炎症により発癌し、浸潤・増殖により進展をきたす癌腫と考えられ、今後分子生物学的に病態の解明がなされ、炎症性メディエーターをターゲットとする新たな治療戦略が確立することが期待される。

結 語

慢性炎症と肝癌の進展との関連性を肝癌切除標本を用いて免疫組織学的に検討した。COX-2, NF-κB, VEGF は肝癌の早期から発現し、肝癌の進行例との発現に差を認めなかった。また再発との関連性についても明らかでなかった。また本研究結果から肝癌における炎症性サイトカインは血管新生因子と相関を認めず、相互作用については言及できなかった。

著者の利益相反: 本論文発表内容に関連して申告なし。

[文献]

- 1) Thun MJ, Namboodiri MM, Heath Jr CW. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Eng J Med* 1991; 325: 1593-6.
- 2) Balkwill F. & Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-45.
- 3) Segawa T, Tsuchiya R, Furui J et al. Operative re-

- sults in 143 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 1993 ; 17 : 663-8 .
- 4) 日本肝癌研究会 (編). 原発性肝癌取扱い規約, 第5版補訂版, 東京: 金原出版; 2009.
- 5) Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010 ; 140 : 883-99.
- 6) Koga H, Sakisaka S, Ohishi M et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: Relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999 ; 29 : 688-96
- 7) Cheng AS, Chan HL, To KF et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2004 ; 24 : 853-60
- 8) Guobin H, Michael K. NF- κ B and STAT3-keyplayers in liver inflammation and cancer. *Cell Research* 2011 ; 21 : 159-68.
- 9) von Marschall Z, Cramer T, Hocker M et al. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut* 2001 ; 48 : 87-96.
- 10) Wang B, Xu H, Gao Q et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization. *Acta Radiol* 2008 ; 49 : 523-9 .
- 11) Kondo M, Yamamoto H, Nagano H et al. Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 4005-12.