

図1 IFN 併用化学療法のプロトコール

II 使用薬剤と投与方法, 対象症例

FAITの実際について述べる。非手術症例においてはセルディングー法にて、切除症例では術中に肝動脈内カテーテルを挿入する。5-FUは300mg/m²/日、2週間投与・2週間休薬の4週間を1クールとしてカテーテルより持続動注する。同時にIFN- α を 5×10^6 単位/回、3回/週、4週間を通じて皮下注射で全身投与する(図1)。

当科における本療法の対象は、既存の治療法が全く効を奏さない、門脈一次分枝または門脈本幹に肉眼的門脈内腫瘍栓(Vp3以上)を伴う高度進行肝細胞癌症例としている。また、肝機能が良好で肝切除が可能な症例においても、このような脈管侵襲を伴う症例は、高率に術後早期の残肝内再発を来すため、術後の補助療法として本療法を施行している。また、副作用や抗癌剤動注による肝障害を考慮し、70歳未満、T.Bilが正常、GOT、GPTがともに100未満、血小板が80,000以上、血清Cr<1.5を条件とし、通常は外来通院治療を基本としているため、PS:0, 1が保たれている症例のみを対象としている(表1)。

III 治療成績

現在までにVp3以上の肉眼的門脈内腫瘍栓を伴う高度進行肝細胞癌86症例を以下の三つのタイプに分類し、それぞれに治療方針を決定しFAITを施行した。その内訳は、全肝に多発病変と門脈内腫瘍栓を伴う進行肝細胞癌(A群):55例、片葉の巨大肝癌と門脈内腫瘍栓を伴う症例(B

表1 IFN併用化学療法に適応症例

肝細胞癌	門脈内腫瘍栓 肝外転移	Vp3 以上 なし
年齢		70歳未満
肝機能	GOT	< 100
	GPT	< 100
	T. Bil	正常 (閉塞性黄疸は除く)
血液検査	血小板	80,000 以上
腎機能	血清 Cr	< 1.5
PS		0, 1

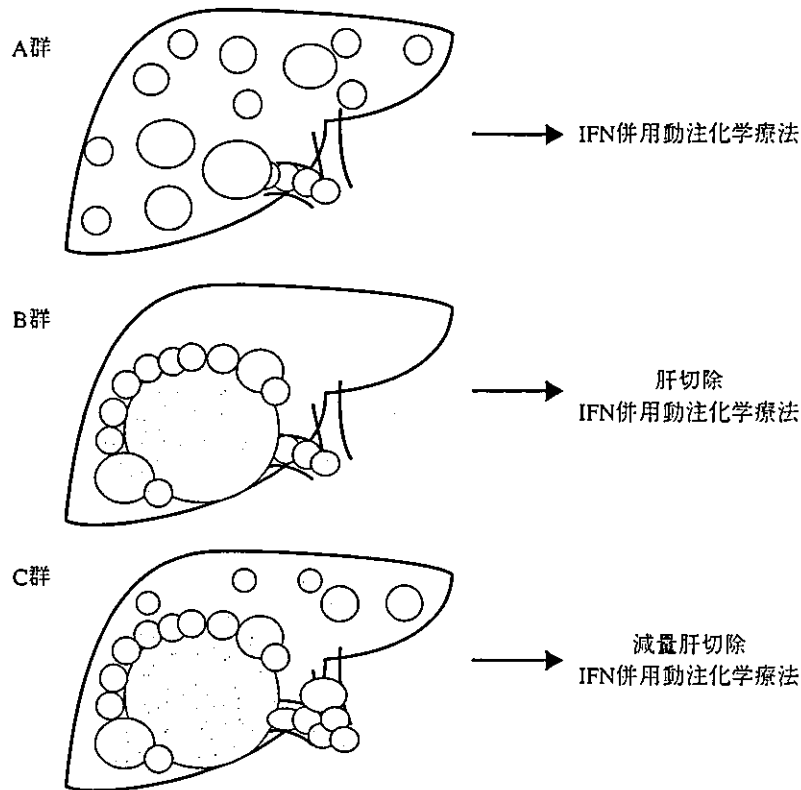


図2 門脈内腫瘍栓を伴う肝細胞癌症例の病型による治療方針

群) : 15例, 片葉の巨大肝癌と多発肝内病変に門脈内腫瘍栓を伴う症例 (C群) : 16例であった。A群に対しては, FAITを繰り返し施行した。B群に対しては, 肉眼的に癌遺残のない肝切除術 (旧原発性肝癌取扱い規約: 相対的非治癒切除以上) を施行し, 術後に補助療法としてFAITを最低3クール施行した。C群については, 片葉の巨大腫瘍に対して肝切除術を施行し (減量肝切除), 術後肝内病巣に対してFAITを繰り返し施行した (図2)。治療効果の判定については, CTなどの画像所見および腫瘍マーカーにより評価した。

治療成績は以下のとおりであった。全86症例の観察期間は6~60カ月であった。A群55例については, 肝内病巣に関してCR: 11例, PR: 13例の計24例44%の症例において有効であっ

表2 A群（切除不能症例）の治療成績

	治療効果	症例数	1年生存率
有効例	CR	n = 11	88%
	PR	n = 13	
無効例	NC/PD	n = 31	6%

表3 B群（肝切除および術後補助療法）の治療成績

	1年生存率	3年生存率
肝切除+術後IFN/5-FU施行例 (n = 15)	100%	82%
肝切除+術後IFN/5-FU非施行例 (n = 15)	41%	18%

た。その一方で、31例56%については無効であり、無効例のうちPD症例は全例6カ月以内に癌死した（表2）。55例の1年生存率は62%で、有効例は88%、無効例は6%であった。B群15例については、1年生存率は100%、3年生存率は82%であった（表3）。当科において、B群と同一のステージで肝切除術（旧規約：相対的非治癒切除）を施行し、術後にFAITを施行しなかった症例は現在までに15例あるが、これらの症例の1年生存率は41%、3年生存率は18%で、B群（FAIT施行症例）のほうが治療成績が有意によかった（ $p < 0.05$ ）。C群においては、未だ観察期間は短いものの16例中3例に残肝内多発病巣の完全消失（CR）を認めており、現時点における1年生存率は65%である。

以上のように、FAITは門脈内腫瘍栓を認める進行肝細胞癌症例に対して、きわめて良好な治療成績を上げており、さらなる症例の蓄積が期待される。

IV IFN併用化学療法の作用機序

IFN- α は単剤でも抗腫瘍効果があるとされ、その機序として癌細胞への直接的な抗腫瘍効果（直接作用）と免疫担当細胞を介した間接的抗腫瘍効果（間接作用）とに大別できる。直接作用としては細胞障害作用¹¹⁾、細胞周期遅延作用¹²⁾、癌抗原の発現上昇¹³⁾などが報告されており、間接作用としてはNK細胞の活性化¹⁴⁾、マクロファージ系の活性化¹⁵⁾、T細胞系の活性化¹⁶⁾などが報告されている。

一方、IFN- α と5-FUとの併用による*in vitro*での作用増強の報告も多数なされている。5-FUの中間代謝物質である5-fluoro-2'-deoxyuridine 5-monophosphate (FdUMP)の細胞内濃度がIFN- α によって上昇するとの報告や¹⁷⁾、薬剤併用によるthymidylate synthetase (TS)阻害率の上昇効果¹⁸⁾、腫瘍細胞のapoptosisの増加^{19) 20)}、cell cycleの遅延²¹⁾などがその機序として報告されている。

これらの報告をふまえてわれわれは、進行肝細胞癌に対するIFN併用化学療法の作用機序につ

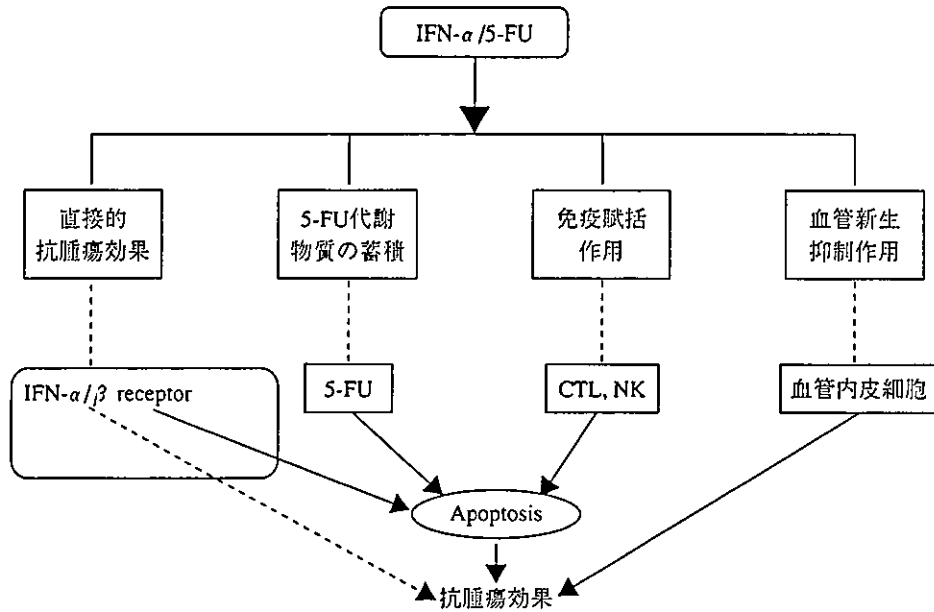


図3 IFN併用化学療法的作用機序

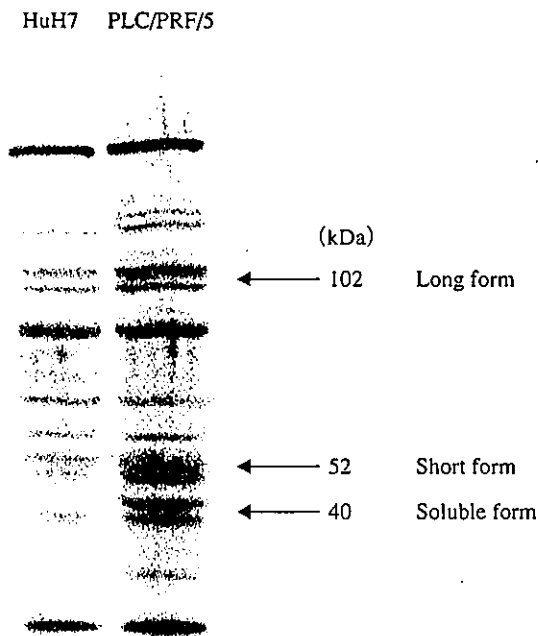


図4 2種類の肝細胞癌細胞株 (HuH7とPLC/PRF/5) でのIFNレセプターの発現
IFN併用化学療法による抗腫瘍効果の高い肝細胞癌細胞株 (PLC/PRF/5) のほうが、抗腫瘍効果の低い肝細胞癌細胞株 (HuH7) よりIFNレセプターの発現が高い (文献22) より改変)。

いて、① IFN- α と5-FUの直接的抗腫瘍効果、② IFN- α と5-FUの併用による血管新生抑制効果、③ IFN- α と5-FUの免疫担当細胞を介した間接的抗腫瘍効果、が関与している可能性があると考えている (図3)。

①については、肝細胞癌株を用いて、IFN- α と5-FUの併用による細胞増殖抑制効果について検討したところ、両薬剤併用による増殖抑制効果の増強、細胞周期の遅延作用および細胞周期関連蛋白の発現の変化を確認した。さらにこの効果は、肝細胞癌株のIFN受容体の発現の強弱が関与していることが明らかになった²²⁾(図4)。さらに最近、この直接的抗腫瘍効果について、IFN

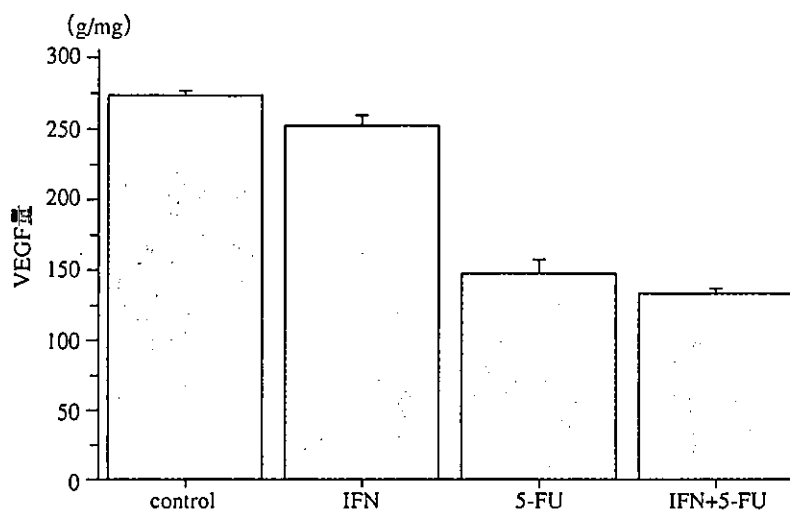


図5 肝細胞癌細胞株 (HuH7) を用いた増殖抑制実験での培養上清中の VEGF 発現量の比較

IFNと5-FUの併用群において、VEGFの発現は抑制されている(文献10)より改変)。

受容体にシグナルが到達してから、細胞内の伝達系路のなかで、Bcl-xLの発現がその抗腫瘍効果について強く関与しているということ²³⁾、さらには臨床例において、IFNの受容体の発現²⁴⁾とその治療効果に何らかの関係があるとの知見も得ている。

次に②については、先の肝細胞癌細胞増殖抑制実験で用いた培養液中の血管新生因子(VEGF)の発現量を測定したところ、IFN- α と5-FUの併用により、その発現が減弱することを確認した¹⁰⁾(図5)。この血管新生抑制効果については、現在、さらにヌードマウスを用いた動物実験の系において、その抗腫瘍効果と血管新生抑制作用について検討中で、血管新生因子、血管新生抑制因子のなかの数種の因子が相互に関与していることがわかってきている。

最後に③についてであるが、現在われわれは、tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand (TRAIL) を介した免疫賦活作用による肝細胞癌に対する抗腫瘍効果について検討してきた。まず、肝細胞癌株とリンパ球を用いた実験においては、肝細胞癌株にはTRAILの受容体が、リンパ球においてはTRAILが発現しており、それぞれの活性がIFN- α と5-FUによって調節を受けることを確認した。また、IFN併用動注化学療法を施行した進行肝細胞癌(Vp4, IM3)症例の治療前後の末梢血単核球中のtumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand (TRAIL) mRNAを比較検討したところ、治療有効群ではTRAILの発現が治療前に比べて増加傾向を認めしたが、治療無効群では認められないことがわかった¹⁰⁾²⁵⁾(図6)。また、その他の機序として、IFN併用化学療法においてIFNと併用する抗癌剤は、5-FUがその治療効果が高いという点についても、*in vitro*の解析においてすでに報告した²⁶⁾。

これらのことより、本療法の抗腫瘍効果の機序については、IFN受容体を介した直接的抗腫瘍効果に加えて、血管新生抑制効果や、TRAIL/TRAIL receptor系を介した腫瘍監視機構などが関与している可能性があると考えている。また最近では、これら*in vitro*の検討に加えて、臨床検体

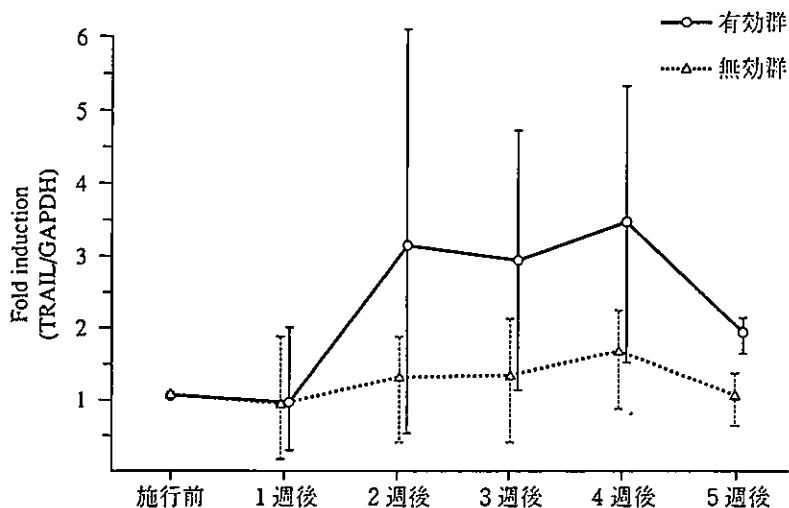


図6 IFN併用動注化学療法を施行した進行肝細胞癌 (Vp4, IM3) 症例の治療前後の末梢血単核球中の TRAIL mRNA を比較
治療有効群では TRAIL の発現が治療前に比べて増加傾向を認めたが、治療無効群では認められない (文献 10) 24) より改変。

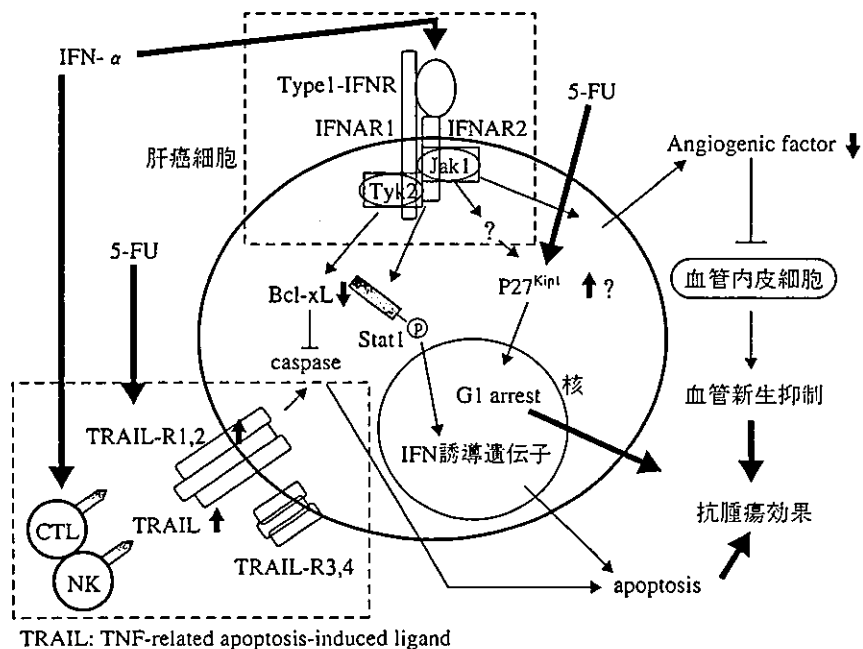


図7 IFN併用化学療法的作用機序に関するわれわれの作業仮説の模式図

を用いて網羅的遺伝子解析を施行することにより、現在では約50%程度の治療効果しか得られない FAIT の治療前効果予測が可能かもしれないとの知見も得ている²⁷⁾。

以上のように、FAITの肝細胞癌に対する抗腫瘍効果の作用機序については、いくつかの因子が関与していることが明らかになってきている。現在までのわれわれの解析結果を概説すると、図7に示すようになる。今後のさらなる検討が必要である。

おわりに

治療抵抗性の進行肝細胞癌に対する治療法として、IFN併用化学療法は新たな選択肢の一つになる可能性が十分にある。現在、本療法については、その有効性について検証すべく厚生労働省の科学研究費（進行肝細胞癌に対する集学的治療に関する研究：14230501，主任研究者：門田守人）を得て、全国レベルでのrandomized control trial (RCT) を施行中である。また、保険適応拡大についても検討中で、昨年より薬剤臨床試験が開始された。本療法の有効性が確立され、今後の肝細胞癌集学的治療の一翼となるべき日が近いことが期待される。

文 献

- 1) Sakon M, Nagano H, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Yamada A, Kawata S, Imai Y, Iijima S, Monden M : Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94: 435-42, 2002.
- 2) Wadler S, Schwartz EL : Antineoplastic activity of the combination of interferon and cytotoxic agents against experimental and human malignancies: a review. *Cancer Res* 50: 3473-86, 1990.
- 3) Kelsen D, Lovett D, Wong J, Saltz L, Buckley M, Murray P, Heelan R, Lightdale C : Interferon alfa-2a and fluorouracil in the treatment of patients with advanced esophageal cancer. *J Clin Oncol* 10: 269-74, 1992.
- 4) Lee KH, Lee JS, Suh C, Lee YS, Min YI, Ahn SH, Park KC, Kim SK, Kim SH : Combination of 5-fluorouracil and recombinant interferon alpha-2B in advanced gastric cancer. A phase I study. *Am J Clin Oncol* 15: 141-5, 1992.
- 5) Patt YZ, Yoffe B, Charnsangavej C, Pazdur R, Fischer H, Cleary K, Roh M, Smith R, Noonan CA, Levin B : Low serum alpha-fetoprotein level in patients with hepatocellular carcinoma as a predictor of response to 5-FU and interferon-alpha-2b. *Cancer* 72: 2574-82, 1993.
- 6) Urabe T, Kaneko S, Matsushita E, Unoura M, Kobayashi K : Clinical pilot study of intrahepatic arterial chemotherapy with methotrexate, 5-fluorouracil, cisplatin and subcutaneous interferon- alpha-2b for patients with locally advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology* 55: 39-47, 1998.
- 7) Leung TW, Patt YZ, Lau WY, Ho SK, Yu SC, Chan AT, Mok TS, Yeo W, Liew CT, Leung NW, Tang AM, Johnson PJ : Complete pathological remission is possible with systemic combination chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 5: 1676-81, 1999.
- 8) Patt YZ, Hassan MM, Lozano RD, Brown TD, Vauthey JN, Curley SA, Ellis LM : Phase II trial of systemic continuous fluorouracil and subcutaneous recombinant interferon alfa-2b for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 21: 421-7, 2003.
- 9) Miyamoto A, Umeshita K, Sakon M, Nagano H, Eguchi H, Kishimoto S, Dono K, Nakamori S, Gotoh M, Monden M : Case report: Advanced hepatocellular carcinoma with distant metastases, successfully treated by a combination therapy of interferon-alpha and oral tegafur/uracil (UFT). *J Gastroenterol Hepatol* 15: 1447-51, 2000.
- 10) 永野浩昭, 左近賢人, 門田守人 : 肝癌—進行肝癌の治療. *肝胆嚙* 43: 945-9, 2001.
- 11) Grander D, Xu B, Einhorn S : Cytotoxic effect of interferon on primary malignant tumour cells. *Studies in various malignancies. Eur J Cancer* 29A: 1940-3, 1993.
- 12) Kimchi A : Cytokine triggered molecular pathways that control cell cycle arrest. *J Cell Biochem* 50: 1-

- 9, 1992.
- 13) Guadagni F, Schlom J, Johnston WW, Szpak CA, Goldstein D, Smalley R, Simpson JF, Borden EC, Pestka S, Greiner JW : Selective interferon-induced enhancement of tumor-associated antigens on a spectrum of freshly isolated human adenocarcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 81: 502-12, 1989.
 - 14) Ortaldo JR, Mantovani A, Hobbs D, Rubinstein M, Pestka S, Herberman RB : Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int J Cancer* 31: 285-9, 1983.
 - 15) Uno K, Shimizu S, Ido M, Naito K, Inaba K, Oku T, Kishida T, Muramatsu S : Direct and indirect effects of interferon on in vivo murine tumor cell growth. *Cancer Res* 45: 1320-7, 1985.
 - 16) Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH : Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med* 178: 1655-63, 1993.
 - 17) Schwartz EL, Hoffman M, O'Connor CJ, Wadler S : Stimulation of 5-fluorouracil metabolic activation by interferon-alpha in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 1232-9, 1992.
 - 18) 池田直樹, ト部健, 種井政信, 西村浩一, 松下栄紀, 稲垣豊, 金子周一, 鶴浦雅志, 小林健一: ヒト肝細胞癌由来培養細胞株PLC/PRF/5の増殖に対するInterferon, 5-Fluorouracilの併用効果の検討. *日癌治会誌* 29: 790-4, 1994.
 - 19) Horowitz RW, Heerdt BG, Hu X, Schwartz EL, Wadler S : Combination therapy with 5-fluorouracil and IFN-alpha2a induces a nonrandom increase in DNA fragments of less than 3 megabases in HT29 colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 3: 1317-22, 1997.
 - 20) Sabaawy HE, Farley T, Ahmed T, Feldman E, Abraham NG : Synergetic effects of retrovirus IFN-alpha gene transfer and 5-FU on apoptosis of colon cancer cells. *Acta Haematol* 101: 82-8, 1999.
 - 21) Wadler S, Schwartz EL, Goldman M, Lyver A, Rader M, Zimmerman M, Itri L, Weinberg V, Wiernik PH : Fluorouracil and recombinant alfa-2a-interferon: an active regimen against advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 7: 1769-75, 1989.
 - 22) Eguchi H, Nagano H, Yamamoto H, Miyamoto A, Kondo M, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Sakon M, Monden M : Augmentation of anti-tumor activity of 5-FU by IFN- α is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6: 2881-90, 2000.
 - 23) Kondo M, Nagano H, Wada H, Damdinsuren B, Yamamoto H, Hiraoka N, Eguchi H, Miyamoto A, Yamamoto T, Ota H, Nakamura M, Marubashi S, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Sakon M, Monden M : Combination of interferon alpha and 5-fluorouracil induces apoptosis through interferon alpha/beta receptor in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* (in press).
 - 24) Kondo M, Nagano H, Sakon M, Yamamoto H, Morimoto O, Arai I, Miyamoto A, Eguchi H, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Wakasa K, Ohmoto Y, Monden M : Expression of interferon α / β receptor in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 17: 83-8, 2000.
 - 25) Yamamoto T, Nagano H, Sakon M, Wada H, Eguchi H, Kondo M, Damdinsuren B, Ota H, Nakamura M, Wada H, Marubashi S, Miyamoto A, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Yagita H, Monden M : Partial contribution of TRAIL/TRAIL receptor pathway to anti-tumor effects of IFN- α /5-FU against hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* (in press).
 - 26) Damdinsuren B, Nagano H, Sakon M, Kondo M, Yamamoto T, Umeshita K, Dono K, Nakamori S, Monden M : Interferon- β is more potent than Interferon- α in inhibition of human hepatocellular carcinoma cell growth when used alone and in combination with anticancer drugs. *Ann Surg Oncol* 10: 1184-90, 2003.
 - 27) Kurokawa Y, Matoba R, Nagano H, Sakon M, Takemasa I, Nakamori S, Dono K, Umeshita K, Ueno N, Ishii S, Kato K, Monden M : Molecular prediction of response to 5-Fluorouracil and Interferon- α combination chemotherapy in advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 6029-38, 2004.

門脈腫瘍栓(Vp3)合併進行肝細胞癌に対する IFN 併用肝動注化学療法

大阪大学大学院医学系研究科病態制御外科学助教授 左近 賢人
同病態制御外科学教授 門田 守人

はじめに

門脈腫瘍栓(Vp3以上)合併肝細胞癌は、切除可能であってもその予後は1年生存率が49%ときわめて不良であり、また各種の局所療法やTAEも適応とはならない。また、肝細胞癌剖検例の3割にVp3以上の門脈腫瘍栓が認められることから、門脈腫瘍栓(Vp3以上)は肝細胞癌の終末像ともいえる。われわれは1997年に肺・骨転移を伴い、TAEが無効である肝内多発再発例に対してインターフェロン α (IFN α)とUFT(テガフル/ウラシル)の併用が著効した症例を経験した¹⁾。以後、肝外転移のない門脈腫瘍栓(Vp3以上)合併肝細胞癌にターゲットを絞り、5-FUの肝動注化学療法に加え、IFN α の全身投与を併用し、良好な結果を報告してきた²⁾。

IFN α 併用化学療法

進行肝細胞癌に対するIFN単剤による全身療法は一般にLaiら³⁾の報告(IFN α で奏効率31%)を除いて低く、その奏効率は0~7%である。一方、5-FUとIFN α の全身投与では10~20%とより良好な傾向となっている。Vp3以上の進行肝細胞癌に対するIFN α の全身投与と5-FU肝動注化学療法との併用では奏効率が約5割ときわめて良好な成績である(表1)。Kanekoら⁴⁾はIFN α に5-FU, cisplatin, methotrexate, leucovorinの4剤を併用し、小尾ら⁵⁾やわれわれは5-FU単剤との併用療法("basic regimen")であるが、ほぼ同等の効果である。また、1~2割の症例にCRを認めている。IFN α 併用肝動注化学療法がIFN α 療法単独、あるいはそれと全身的5-FU投与との併用に比べて良好な成績となっていることは、本療

表1 Vp3,4合併肝細胞癌に対するIFN α /5-FU併用療法(肝切除との比較)

研究機関	治療法	例数	CR	PR	NC	PD	生存率(%)
日本肝癌研究会(2002)	肝切除(手術)	679	49	30	12		
Kaneko(2002)	CR+PR(5剤)	13	45	51	33	11	
	NC+PD(化学療法)	16	14	7	3.5		
小尾(2003)	CR+PR(化学療法)	27	53	32			
	NC+PD(化学療法)	24	0				
当科(2003)	CR+PR(化学療法)	19	48	95	56	24	
	NC+PD(化学療法)	21	0	0	6.0		

法の効果発現には肝動注化学療法の関与が大きいことを示唆している。

腫瘍栓(Vp3以上)合併肝細胞癌に対する肝切除とIFN α 併用5-FU動注化学療法の臨床成績

第15回原発性肝癌調査報告によればVp3以上の門脈腫瘍栓合併肝癌の術後1年生存率は約49%である⁶⁾。一方、IFN α 併用5-FU動注化学療法の奏効(CR/PR)例のそれは32~95%である(表1)。当施設における奏効例の50%生存期間は24ヵ月であり、肝切除例より約12ヵ月間長くなっている(図1)。つまり、本法奏効例の成績は肝切除のそれを凌駕するとともに、肝切除だけでは予後の向上が期待できず、化学療法が奏効することが長期生存のための重要な条件であることを意味している。

IFN α 併用肝動注化学療法の適応条件

当施設では現在までうつ病を除き、特に大きな副作用が同定されていない。小尾らも大きな副作用を認めなかったとしている。しかし、全身状態

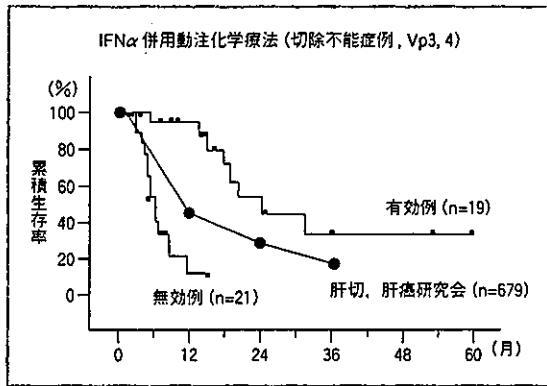


図1 Vp 3,4 合併肝細胞癌に対する IFN α /5-FU 併用療法の治療成績

や肝機能不良例では治療が完遂できないのも事実である。そこで、現在の当施設における適応基準は原則として、①年齢70歳未満、②GOT, GPT (それぞれ100未満)、③黄疸無く(ただし、閉塞性黄疸はこの限りではない)、④血小板数8万以上、⑤血清クレアチニン1.5 mg/dL以下、⑥PS (0, 1)としている。

補助療法としての IFN α 併用肝動注化学療法

食道静脈瘤破裂や動注用カテーテルのトラブルを回避するために、当施設では IM3 であっても減量肝切除を行い、その後補助療法として本療法を施行している。肉眼的に癌の遺残のない症例

(切除可能群)および遺残病巣を認めた IM3 症例(減量切除群)に対して本療法を原則として3クール施行した。減量切除群の1年生存率は約60%と補助療法のない切除可能症例より良好であった。また、遺残病巣の奏効例の1年生存率は80%であった。さらに、残肝に遺残病巣のない切除可能群ではさらに良好な生存率(1年: 100%, 3年: 80%)であった。

抗腫瘍効果の発現機序

IFN α と 5-FU の併用効果の機序を図2に示す。IFN α はタイプ1レセプターを介して Jak による STAT のリン酸化が起こり、IFN α は誘導蛋白質の転写活性が亢進する。その結果、細胞周期の遅延による細胞増殖抑制、血管新生の抑制、アポトーシスの亢進などが起こる。一方、IFN α は NK 細胞や CTL などのリンパ球に作用し、TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) などの発現を増強させる。5-FU は TRAIL のレセプターである TRAIL-R の培養肝癌細胞における発現を増強する。したがって、両者の相乗効果により、細胞障害活性の増強が期待できる。さらに、5-FU の代謝に関しては thymidine phosphorylase (TP) に関する発現増強により FDUMP の生成を亢進させる。このように多様な相乗作用が総合的に働き、抗腫

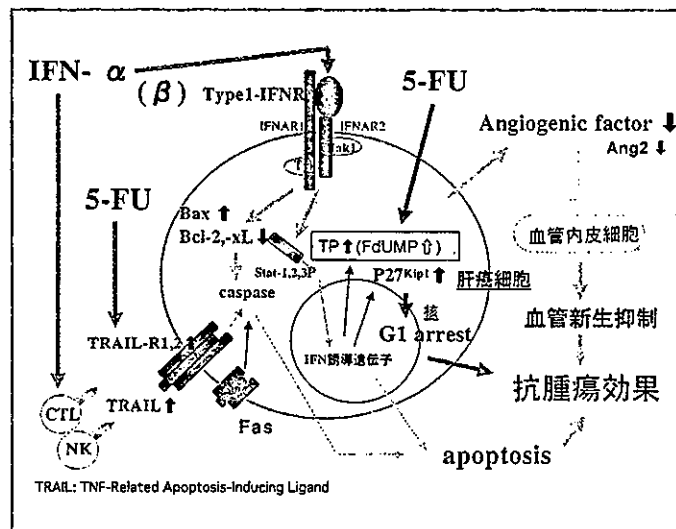


図2 IFN α 併用 5-FU 動注化学療法の作用機序(仮説)

瘍効果をもたらしていると考えられる。

おわりに

IFN α 併用肝動注化学療法は Vp3 以上の門脈腫瘍栓を合併する肝細胞癌の予後を大きく変えた感がある。しかし、約 50% の症例は非奏効例である。今後、効果予測法の確立とともに、肝外病変を含めた無効病巣に対する治療法の開発が重要である。

References

- 1) Miyamoto A, Umeshita K, Sakon M, et al : Advanced hepatocellular carcinoma with distant metastases, successfully treated by a combination therapy of alpha-interferon and oral tegafur/uracil. J Gastroenterol Hepatol 15 : 1447-1451, 2000
- 2) Sakon M, Nagano H, Dono K, et al : Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. Cancer 94 : 435-442, 2002
- 3) Lai CL, Lau JY, Wu PC, et al : Recombinant interferon-alpha in inoperable hepatocellular carcinoma : a randomized controlled trial. Hepatology 17 : 389-394, 1993
- 4) Kaneko S, Urabe T, Kobayashi K : Combination chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma complicated by major portal vein thrombosis. Oncology 62 (Suppl 1) : 69-73, 2002
- 5) 小尾俊太郎, 椎名秀一郎, 寺谷卓為, 他 : 門脈浸潤 (VP3, 4) を伴う進行肝細胞癌に対する IFN 併用 5FU 動注化学療法の有用性. 第 39 回日本肝癌研究会抄録集 pp.115, 2003
- 6) 日本肝癌研究会 : 第 15 回全国原発性肝癌追跡調査報告. 進行印刷出版, 京都, 2002

特集

テーラーメイド医療に向けてのバイオマーカー：
● 診断の現況と将来(第41回日本癌治療学会総会より) ●

PCR アレイを用いた肝細胞癌の 網羅的遺伝子発現解析 —新しいバイオマーカーの探索—

黒川 幸典*1,2 竹政伊知朗*1 左近賢人*1 加藤菊也*2
門田守人*1

Gene Expression Profiling Analysis to Find Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma Using PCR-array: Kurokawa Y*1,2, Takemasa I*1, Sakon M*1, Kato K*2 and Monden M*1 (*1Dept of Surgery and Clinical Oncology, Graduate School of Medicine, Osaka Univ, *2Taisho Laboratory of Functional Genomics, Nara Institute of Science and Technology)

Many gene expression profiling studies using DNA microarrays have been reported for various human cancers, but an efficient biomarker has not been found in hepatocellular carcinoma (HCC) yet. We have performed various gene expression profiling analyses of HCC using a high throughput quantitative PCR-array system based on adaptor-tagged competitive PCR (ATAC-PCR). Using this PCR-array, we identified many differentially expressed genes among tumor, nontumor and normal liver. This review briefly introduce our PCR-array studies in human HCC and future aspects of such gene expression profiling studies to find novel biomarkers.

Key words: PCR-array, ATAC-PCR, DNA microarray, Gene expression profiling

Jpn J Cancer Clin 50(1): 21~26, 2004

はじめに

ポストゲノム時代といわれる今、癌の臨床医学の分野では、これまでの臨床病理学的エビデンスを基に様々な分子生物学的な手法を用いることで、医療の個別化(テーラーメイド医療)を実現しようとする動きが盛んになっている。癌の個性を解明するためには単に個々の遺伝子を追求するだけでなく、癌の発育、進展に関わる多数の遺伝子を同時に解析することが重要であると考えられ、そのツールの一つとしてDNAマイクロアレイ

イが注目されてきた。DNAマイクロアレイは、数千種類の遺伝子の発現情報を1回のアッセイで得られるという特徴があり、現在までに様々な悪性腫瘍を用いた研究結果が報告されている^{1~4)}。これらDNAマイクロアレイがハイブリダイゼーションをベースにしたアッセイ系であるのに対し、われわれはRT-PCRをベースとすることで新たな改良を加えたアダプター付加競合PCR(adaptor-tagged competitive PCR; ATAC-PCR)法⁵⁾を用いたPCRアレイを利用することで、DNAマイクロアレイと同様な網羅的遺伝子発現解析を行ってきた^{6~8)}。本稿では、PCRアレイを利用した肝細胞癌(HCC)の遺伝子発現プロファイリングおよびバイオマーカー探索の現状について概説する。

*1 大阪大学大学院病態制御外科

*2 奈良先端科学技術大学院大学大正製薬ゲノム機能解析講座

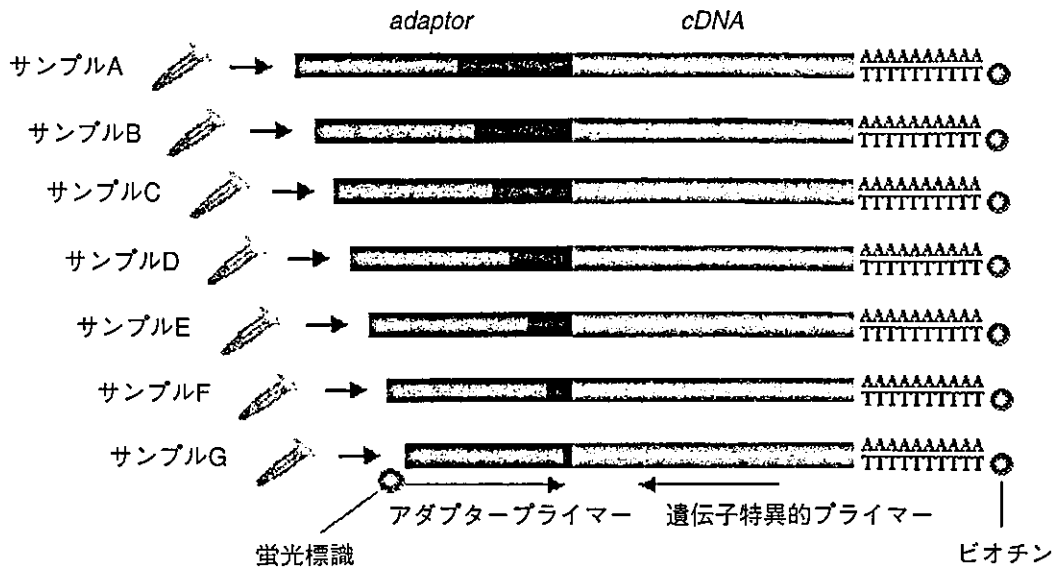


図1 ATAC-PCRの原理

1. PCR アレイ

PCR アレイは ATAC-PCR 法を利用することにより、多数の遺伝子の発現量を一度に、しかも高精度に測定する解析システムである。この ATAC-PCR 法のポイントは、別々のサンプルから合成した cDNA にそれぞれ長さの異なるアダプターを付け、それを混合したものをテンプレートとして競合 PCR を行うところにある (図1)。PCR 産物は蛍光標識されているため、電気泳動によって分離することにより、その長さの違いによってどのサンプル由来であるかを特定でき、それぞれのバンドの蛍光強度はそれぞれのサンプル内での遺伝子発現量を反映している。したがって、PCR 産物の蛍光強度からそれぞれのサンプルに含まれる遺伝子発現量の相対量を比較することができるのである。

われわれが通常行っている実験では7種類のアダプターを用いており、またより正確に発現量を求めるために、うち2つのアダプターを利用した内部標準を導入している⁹⁾。これによって、サンプル間における遺伝子の1.5~2倍の発現量差を測定することが可能である。また、電気泳動には高速 DNA アナライザを用いることで、1日で数千個の遺伝子の発現量を同時に5つのサンプルで測定できるという、DNA マイクロアレイに引けを取らないハイスループットな解析システ

ムとなっている (図2)。

また、ATAC-PCR 法のもう一つの利点として、ごく微量の RNA からでも発現量を測定できるという点が挙げられる。DNA マイクロアレイを用いた解析では、最低5~20 μg の total RNA が必要となり、それ以下の場合には T7RNA ポリメラーゼを用いた RNA の増幅が必要となる。ATAC-PCR 法では1遺伝子当たり1 ng の total RNA で測定することができるため、RNA 増幅によるバイアスを気にすることなく、手持ちの RNA 量に合わせた遺伝子数を自由に設定することができる。したがって、生検標本などの微量なサンプルを用いて、数十~数百といった遺伝子の発現量を測定するにはより有用性が高く、実際にテーラーメイド医療を行っていく上で非常に実用的である。

2. 非 B 非 C 型肝細胞癌の遺伝子発現プロフィール⁷⁾

HCC は、その大半が B 型肝炎ウイルス (HBV) もしくは C 型肝炎ウイルス (HCV) による慢性肝炎および肝硬変を発生母地として生じる癌である¹⁰⁾。これら肝炎ウイルス以外にも、発展途上国ではアフラトキシンなどのカビ毒汚染、先進国ではアルコール性肝炎や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) などが HCC の原因といわれている。われわれは、これら既知の要因によらない肝発癌

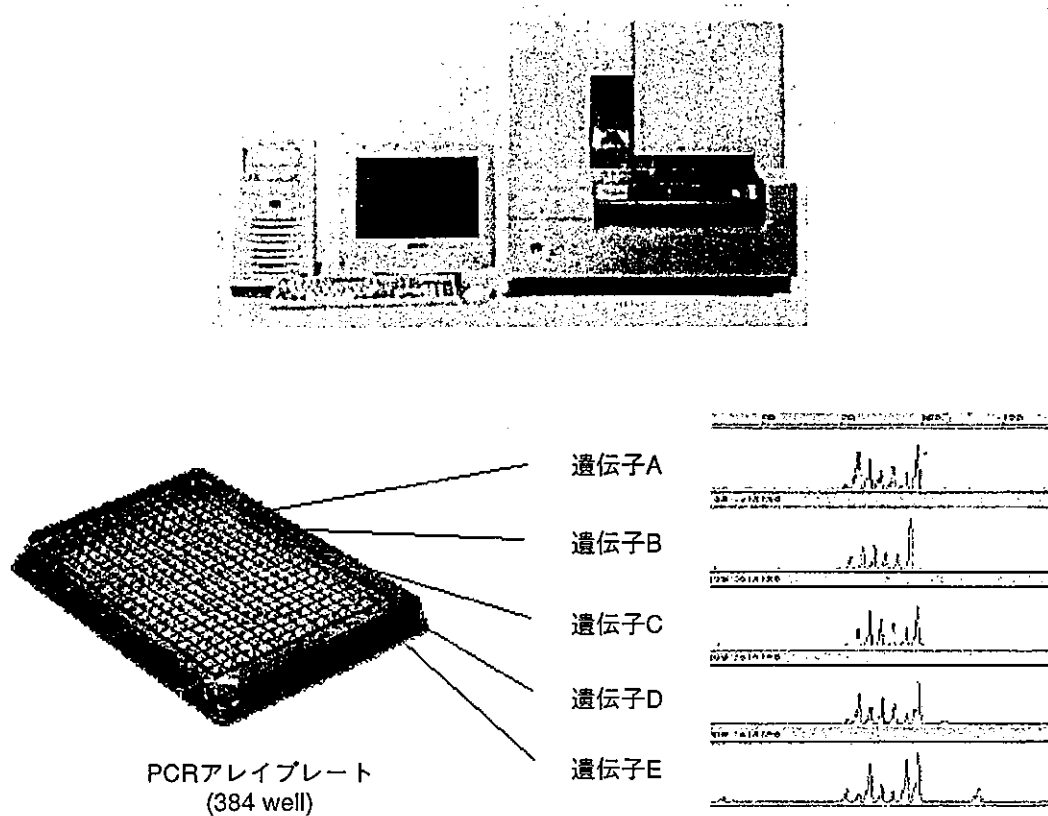


図2 PCRアレイを用いた遺伝子発現解析システム

の責任遺伝子を調べるため、HBVにもHCVにも感染していない原因不明の非B非C型HCCだけを20症例集め、それぞれの癌部と非癌部からRNAを抽出した。また、これらを正常肝とも比較するため、HBVおよびHCVに感染していない転移性肝癌などの肝切除症例31例に対し、切除された正常肝の一部からRNAを採取した。これら計68個(癌部:20個, 非癌部:17個, 正常肝:31個)の肝組織に対して、PCRアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。測定した遺伝子は、独自に作成したHCCのcDNAライブラリーからシークエンスして得られた遺伝子2,384個, 正常肝のcDNAライブラリーより得られた遺伝子130個, 転移性肝癌のcDNAライブラリーより得られた遺伝子260個に、文献より癌との関連性が報告されている遺伝子298個を加えた計3,072個である。

まず、欠測値の少なかった1,812遺伝子すべてを用いて階層的クラスタリング¹¹⁾を行ってみたところ、癌部、非癌部、正常肝のそれぞれがほぼ独立したクラスターを形成していた(図3)⁷⁾。さ

らに主成分分析¹²⁾により、各症例の発現プロファイル¹²⁾を3次元的に比較したところ、やはり3群それぞれがほぼ独立したプロファイルを示していた(図4)。この結果から、非B非C型HCCの癌部と非癌部との間だけでなく、非癌部と正常肝との間においても、その発現プロファイルが大きく異なっていることがわかった。つまり、非B非C型HCCはその発癌過程において、ウイルス性の肝発癌と同様、肝臓全体が何らかの変化を生じた後に、その一部から癌化が生じていることが示唆された。

また、癌部と非癌部との間、および非癌部と正常肝との間において有意に($P < 0.01$)発現量の相違が認められた遺伝子は、それぞれ61個と159個存在した(図5a, b)⁷⁾。なお、これらの遺伝子の信頼性は、新しい追加サンプルを用いた検証実験においても確認された。

3. 術後肝内再発のバイオマーカー

HCCは肉眼的に根治的な手術を施行した場合でも、高率に肝内再発する予後不良な癌である。

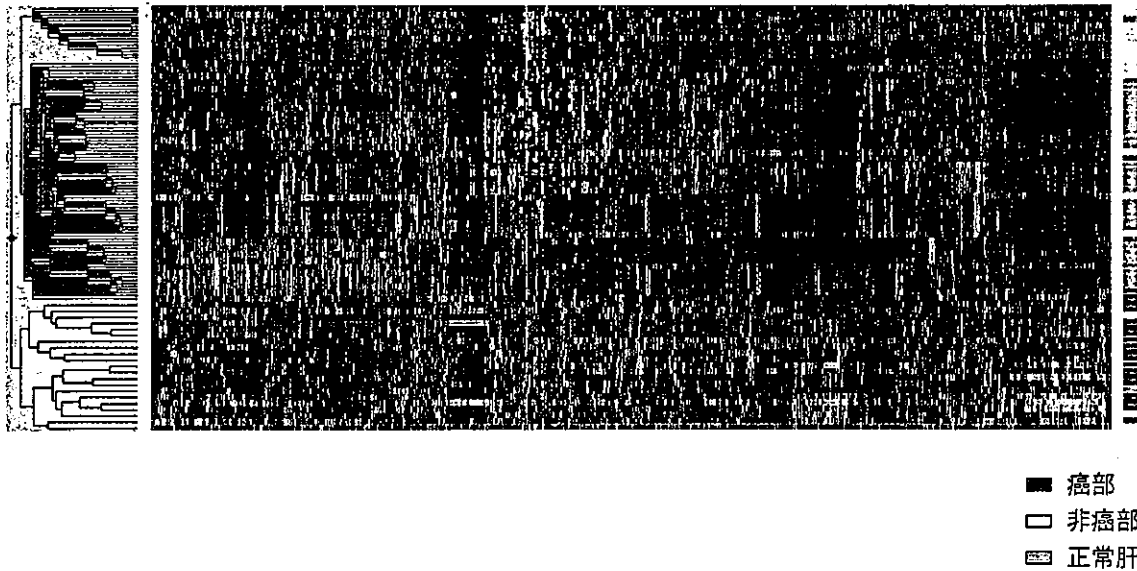
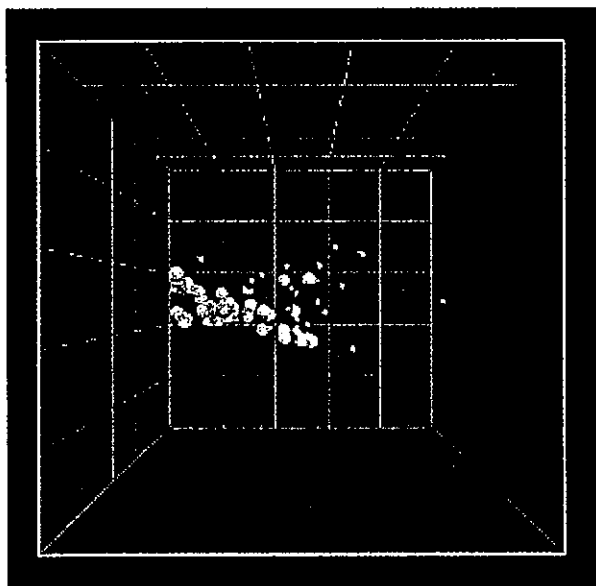


図3 非B非C型肝細胞癌の階層的クラスタリング(1812遺伝子)



● 癌部 ○ 非癌部 ◐ 正常肝

図4 非B非C型肝細胞癌の主成分分析(1812遺伝子)

再発率は、術後2年以内で約50%、5年以内で約75%といわれている^{13,14)}。その再発形式は肝内転移(IM)再発と多中心性発癌(MC)の2パターンあるとされ、前者は術後2年以内の早期再発、後者は術後4年以降の後期再発の大半を占めている¹⁵⁾。特にIM再発は、初回切除時には画像的には検出できないレベルの微小転移が残存肝に存在していたことを意味し、これを再発前に診断して制御することができれば、HCCの予

後を大きく改善できる。ただ、従来の臨床病理学的診断法では、このような診断を正確に行うには限界があるため、異なったアプローチによる新しい診断法の確立が期待されている。そこで、PCRアレイを利用した網羅的遺伝子発現解析を行うことで、術後IM再発に対する新しいバイオマーカー(再発マーカー)を探索し、その有用性について検討した。

対象は、当科にて肉眼的根治切除を施行した臨床病期I~IIIまでの20例であり、うち術後2年以内に肝内再発を生じたのは10例(再発群)、生じなかったのは10例(無再発群)であった。各症例の切除標本の癌部よりRNAを抽出し、3,072遺伝子の発現量をPCRアレイにより測定した。まず、t検定にて両群間で有意に($P < 0.01$)発現量の異なる遺伝子を選択したところ、211個の遺伝子が選ばれた。

次に、より簡単に術後IM再発を予測する手法の確立のため、Golubら¹⁶⁾が提唱しているWeighted-Votingアルゴリズムを利用し、相関スコアの上位50遺伝子のみを用いる予測式を組み立てた。この予測式と、わずか50個の遺伝子の発現量を測定することによって、約90%の正診率をもって術後IM再発の予測を行うことが可能であった。また、この新しい再発マーカー陽性群と陰性群の2群間において、その無再発生存期間をlog-rank検定にて比較したところ、有意

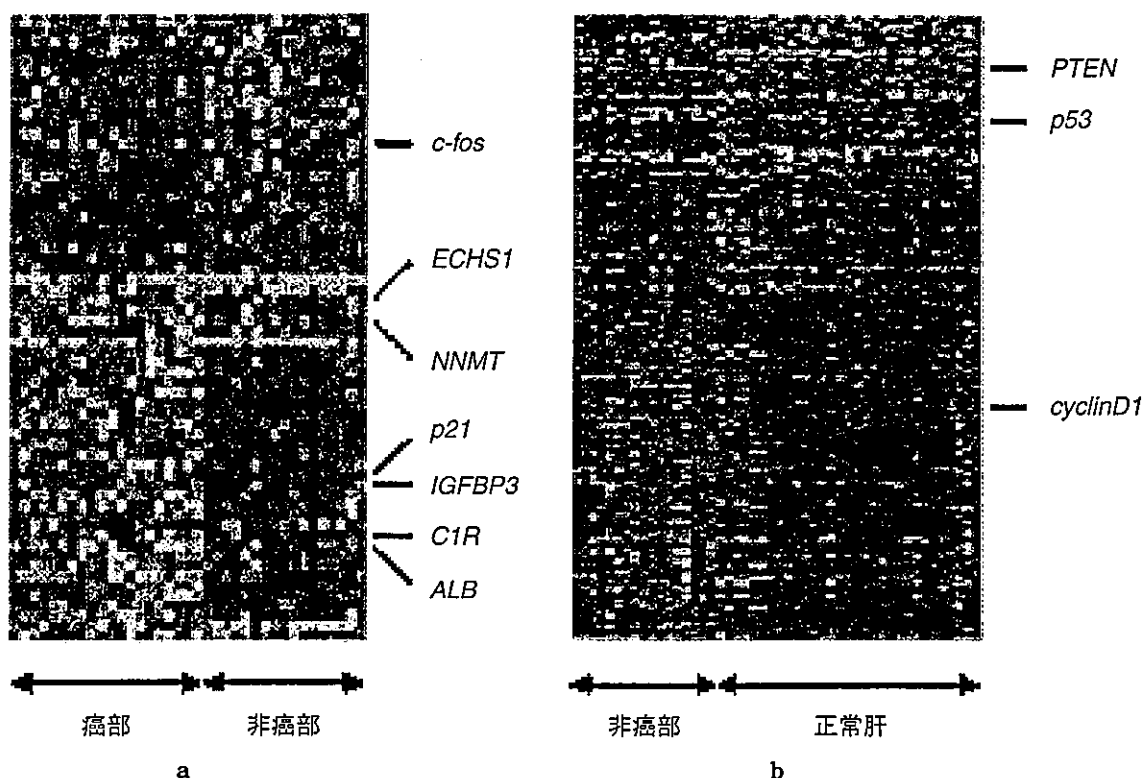


図5 非B非C型肝細胞癌において発現量の差の大きかった遺伝子
 a: 癌部 vs 非癌部, b: 非癌部 vs 正常肝

差を認めた ($P < 0.001$)。

現在、今後の臨床応用に向け、症例数をさらに蓄積した上でデータの正確性について再検討を行っているところである。

まとめ

以上、PCRアレイを用いたHCCに対する網羅的遺伝子発現解析の結果および現状について概説した。われわれは、この他にも化学療法の感受性予測など様々なバイオマーカーの探索を行っている。しかし、今までにもDNAマイクロアレイを使った様々なバイオマーカーの報告がされてきたが、その大半が少ない症例数でしか解析されておらず、検証が不十分のものがほとんどであり¹⁷⁾、網羅的遺伝子発現解析から実際の臨床応用に至ったものは皆無に等しい。したがって、今後は多症例数を用いた大規模な前向き研究を行い、エビデンスレベルの高い研究をしていくことが必要不可欠である。こうして検証された新しいバイオマーカーは、従来の臨床病理学的マーカーとうまく組み合わせることで、より精度の高い診断法の確立ならびにテーラーメイド医療の実現へ

とつながるであろう。

文献

- 1) Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al: Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 8: 816-824, 2002
- 2) Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346: 1937-1947, 2002
- 3) van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347: 1999-2009, 2002
- 4) Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al: Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 362: 362-369, 2003
- 5) Kato K: Adaptor-tagged competitive PCR; a novel method for measuring relative gene expression. *Nucleic Acids Res* 25: 4694-4696, 1997
- 6) Muro S, Takemasa I, Oba S, et al: Identification of expressed genes linked to malignancy of human colorectal carcinoma by parametric clustering of quantitative expression data. *Genome Biol* 4: R21, 2003

- 7) Kurokawa Y, Matoba R, Takemasa I, et al: Molecular features of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a PCR-array gene expression profiling study. *J Hepatol* 39: 1004-1012, 2003
- 8) Kurokawa Y, Matoba R, Nakamori S, et al: PCR-array gene expression profiling of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Canc Res*, in press.
- 9) Matoba R, Kato K, Kurooka C, et al: Correlation between gene functions and developmental expression patterns in the mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 12: 1357-1371, 2002
- 10) Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, et al: Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann NY Acad Sci* 963: 13-20, 2002
- 11) Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, et al: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14863-14868, 1998
- 12) Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, et al: MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* 30: 41-47, 2002
- 13) Poon RT, Fan ST, Ng IO, et al: Different risk factors and prognosis for early and late intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 89: 500-507, 2000
- 14) Kanematsu T, Furui J, Yanaga K, et al: A 16-year experience in performing hepatic resection in 303 patients with hepatocellular carcinoma: 1985-2000. *Surgery* 131: S153-158, 2002
- 15) Sakon M, Umeshita K, Nagano H, et al: Clinical significance of hepatic resection in hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 135: 1456-1459, 2000
- 16) Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286: 531-537, 1999
- 17) Ntzani EE, Ioannidis JP: Predictive ability of DNA microarrays for cancer outcomes and correlates: an empirical assessment. *Lancet* 362: 1439-1444, 2003

2. 治 療*

梅下浩司 左近賢人 永野浩昭 門田守人**

【要旨】肝細胞癌の再発に対して積極的に再切除が行われるようになり、その成績の解析から、初回切除時に単発かつ血管侵襲陰性で、再発までの期間が1年以上、再発時の画像上血管侵襲陰性で、肝機能良好の症例が再切除のよい適応と考えられる。肝移植については、実に多種の治療法を駆使しうる本邦の肝細胞癌治療体系の中において、その適応を定めるのが大きな課題である。肝外再発については、外科的治療も積極的に試みられているがその適応は限られており、新たな武器が必要である。

はじめに

近年の画像診断法、肝予備能評価法、および肝癌治療法の進歩に伴い、かつては予後不良であった再発肝癌においても長期生存が得られるようになってきた。本稿では、内外の文献および自験例に基づいて肝癌の再発治療につき概観するが、転移性肝癌については原発臓器により治療方針がかなり異なることから他稿に譲り、原発性肝癌、とくにその大部分を占める肝細胞癌に焦点を絞って述べる。また、肝切除後の再発を中心に述べる。

I. 肝内再発の治療

1. 切除後再発例に対する再肝切除

肝切除術は、癌病巣を確実に体内からとり除く

ことができ、肝細胞癌のもっとも根治的な治療法であることから、再発例に対しても可能であれば積極的に切除を行うべきである。

文献上再切除の報告が目立ち始めるのは、慢性肝疾患を伴う肝細胞癌患者の肝切除が安定して行われるようになった1980年代中ごろである。1986年Nagasueらは、過去5年間の肝細胞癌切除例91例中の31例の再発例のうち、9例(8例が肝硬変、1例が慢性肝炎を合併)に再肝切除を行ったと報告した¹⁾。15～45ヵ月の比較的短い追跡期間で3例が再発死亡、2例が再発を認めたことから、現在の目からみれば再切除の適応決定に問題があったかもしれないが、先駆的な業績といえよう。同年あるいは翌年に内外の諸施設よりも再切除の報告が散見されるが、いずれも1～3例程度の少数例の報告であった。

1990年代にはいり、肝細胞癌切除後再発に対する再切除につき、ある程度の症例数をそろえた臨床成績が報告されるようになった。1994年Suenagaらは、18例の再肝切除の経験を報告し

キーワード：肝細胞癌、再発、再肝切除、肝移植

* Treatment for recurrent hepatocellular carcinoma

** K. Umeshita, M. Sakon(助教授), H. Nagano, M. Monden(教授)：大阪大学大学院医学系研究科病態制御外科。

た²⁾。1979～1991年の肝細胞癌切除例134(耐術例121)中再発例が74, そのうちの18例に再切除を行った。再切除例に手術関連死亡は1例もなく, 再切除後の累積生存率は1年88%, 3年37%, 5年37%, 初回切除からみると3年88%, 5年68%, 7年45%であり, 初回切除後再発のない症例の生存率と大きな差がないとしている。ちなみに, 再切除の条件として筆者らは①肝機能が初回切除時とほとんどかわらない, ②再発病巣は3個未満の2点をあげている。

さて, 肝再切除を安全に施行しうるようになれば, どのような症例に再切除を行うのがよいのか, 長期予後からみた適応の見直しが必要となる。最近Minagawaらは, 再切除を受けた67人を対象とした解析結果を報告した³⁾。1994～2000年に肝細胞癌に対して同施設で初回切除を行った334例中の56例と, その期間前に初回切除を受けた4例, 他院で初回切除を受けた7例, 合せて67例の検討である。多変量解析の結果, 再切除後の予後に関連する独立した因子として, 再切除時に門脈腫瘍栓がないこと, 初回切除時に単発であったこと, 初回切除後1年間以上無再発であったことの三つをあげている。なお, 全再発例の中から上記の67例を再切除の対象として選択した条件は下記の通りである。すなわち, 腹水がないかあるいは利尿薬にてコントロール可能, 血清T-Bil<2.0 mg/dlであり, BilとICG15分値による筆者らの基準で決定した切除範囲で根治切除が可能な症例に再切除を行ったとしている。一方, この報告に先立ちShimadaらは, 初回切除時の組織学的な門脈侵襲の有無のみが独立した有意な予後因子であったと報告している⁴⁾。ただし, 単変量解析の段階では, 再発までの期間が1年以内か否かも有意な因子であったとしている。

肝細胞癌に対する再切除の適応を決めるうえでおそらくもっとも重要な因子は, 再発の成り立ち, すなわち多中心性の新発生なのか, あるいは肝内転移なのかの別であろう。多中心性発生であれば, 基本的に初回の腫瘍の場合と同じ基準で治療方針を組み立てればよい。しかしながら, 現時点では上記の2種類の再発を確実に鑑別する方法をわれ

われは有しない。しかし, 前段落のMinagawaら, Shimadaらの二つの論文であげられた再切除後の予後をよくする因子の多くは, 多中心性の再発との関連が示唆される因子である。たとえば, 初回切除から再発までの期間である。Sakonらが解析したごとく, 肝内転移による再発は肝切除後早期に多く発生し晩期には少なくなり⁵⁾, したがって初回切除後期間を経ての再発例は, 多中心性再発である可能性が高い。また, 切除後1年以内にかかる, 多くは悪性度の高い多発性の肝内再発例が省かれることも, 良好な予後に関与しているであろう。いずれにしても, 現時点では初回切除時に組織学的に単発かつ門脈侵襲陰性で, 再発までの期間が1年以上, 再発時の画像上門脈侵襲陰性で, 肝機能良好の症例が再切除のよい適応と考えてよいであろう。

2. 再発例に対する非切除療法

a) Interventional radiology (IVR), 放射線治療など

筆者らは, フォローアップCTで肝内再発が診断された場合, 血管造影とCTA, CTAPを行い肝内再発巣の数と分布を確実に把握することを原則としているが, そのさいまず肝動脈塞栓療法(TAE)〔抗癌薬とリピオドールを原則的に併用〕を行っている。TAEは再発例に対してもっとも多くの場合に選択される治療法であるが, 再切除が行われた症例と比較すると, 明らかに予後はわるい⁶⁾。ただし, 打田らは「segmental Lipiodol TAE」により, 切除後再発の18例で5年累積生存率50%という良好な成績を報告している⁷⁾。

種々の経皮的治療法(エタノール注入療法: PEIT, マイクロ波凝固療法: MCT, ラジオ波凝固療法)も当然肝内再発に対して施行しうるが, これらの治療法は本来結節数が少なく個々があまり大きくない場合が適応とされている。したがって, 肝内転移による再発よりも多中心性の再発により適した治療であり, 切除後再発における有用性は限られる。

最近, 本邦の施設より切除後再発例8例に対する放射線治療(X線または陽子線)の経験が報告された⁸⁾。適応として, ①再切除拒否または不能例



図1. 摘出肝のマクロ所見
3個の viable な結節(最大径1.7 cm)を認める(矢印).

で、②TAEやPEITが施行困難または効果不十分な場合をあげているが、腫瘍の存在範囲によっても規定され、再切除と同様、局所療法としての意味合いの強い治療法である。

b) 化学療法

肝内再発に対する治療としては、抗癌薬の全身投与よりも肝動脈投与(動注)が一般的である。田中らは、肝切除術後の多発遺残または多発再発31例に対してcisplatin/5-FUの動注を行い、奏効率71.0%、5年累積生存率45.7%と、いずれもヒストリカル・コントロール(TAE, PEIT)に比し有意に良好であったと報告している⁹⁾。

門脈本幹または一次分枝に腫瘍栓(Vp3, Vp4)を伴う症例はいかなる治療法を用いても予後不良であったが、筆者らの施設ではインターフェロンと5-FU動注を併用した治療法により良好な成績を得ている¹⁰⁾。肝切除後の再発例でも、門脈本幹または一次分枝に腫瘍栓を伴う場合に本法を施行し好転を得ている。なお、上記の論文の後の53例の検討でも、奏効率が5割と、ほぼ一定の結果が得られている。

3. 再発例に対する肝移植

本邦における肝移植は古くは1964年にさかのぼるが、1989年に生体肝移植が施行されて以降症例数が増加し、日本肝移植研究会の登録によれば2002年には年間440例が、2002年末までに累計2,249例が行われた。最近の成人例の増加に伴い肝細胞癌に対する肝移植も増加し、2002年末までに213例が行われている¹¹⁾。筆者らの施設では現在までに12例の肝細胞癌に対して肝移植を行ったが、肝不全に対する移植の術前検査で肝細胞癌の合併が判明した一部の例外を除き、多くがなんらかの治療後の再発例であった。とくに2例は、肝切除後の再発例であった。うち1例を提示する。

[症例提示]

症例 32歳, 男性

28歳時肝細胞癌破裂のため近医で緊急手術として外側区域部分切除を施行された。このさいはじめてB型肝炎ウイルス感染と肝硬変の存在を指摘された。その後、肝内再発に対しS4a切除とS6のMCTを、再々発に対しS3部分切除とS8お