

度診断が可能になることが期待される。その反面 LCMで得られるサンプル量では、多くの場合ターゲットとして不足するため、各遺伝子の相対的な発現量を保ちつつ mRNA を増幅する方法の開発が必要で、現在各種の方法が開発検討されているが³⁹⁾、信頼性と簡易性に問題があり、これらを克服しないと臨床に応用するのは難しい。

これに対して、後者は、癌細胞が存在するがゆえ二次的に混入した炎症細胞など癌細胞の周囲細胞もその癌の性質に少なからぬ影響を与えていると考えられるため、このような細胞も含めて肉眼的なサンプリングによる癌組織全体の性質を観察しようとするものである⁴⁰⁾。これは一般臨床病院でも十分対応可能な通常のサンプリング手段であり、デグラデーションを起こしやすい RNA の質を確保する点からも、こちらの方法を採用している報告が多いようである。

3. バイオプシーサンプルからの発現プロファイル

DNAチップの感度の向上と、RNAの抽出技術の改善により、最近バイオプシーサンプルなど微量検体の発現プロファイルを解析する報告がみられるようになった^{40, 41)}。バイオプシーサンプルの発現プロファイルによって癌の性質が再現性よく予測できるようになれば、その臨床的意義は非常に大きい。たとえば、術前化学療法に対する抗癌剤感受性診断による術後治療法の決定、術前バイオプシーサンプルの分子的悪性度診断による適切な手術方法の決定など、種々の応用が考えられる。今後、癌組織の不均一性にいかに対処できるかが最大の問題点であるが、実際の臨床現場にこれまでにない新たな情報を与えるものとして大きな役割を果たすことが期待される。

▮ 他の技術との併用

癌の特性をより詳細に知るため、今後の癌研究は、トランスクリプトームの解析だけではなく、ゲノム、プロテオーム解析技術を併用して、DNA, RNA, タンパク質すべてのレベルでの相

互作用を体系的に調べる方向に進みつつある。

ポストゲノム時代における癌研究において DNA チップとともに大きな役割を担うものとして、第一にあげられるのが SNPs (single nucleotide polymorphisms) である。癌の個性を判別するためには、癌部での遺伝子発現解析とともに、癌の宿主側のゲノム解析も重要である。SNPs は遺伝子多型のうち最も数が多くこれまでに 300 万以上が同定されており、癌関連遺伝子や薬剤感受性に関与する遺伝子の同定によって、癌の診断・治療に役立てようというものである⁴²⁾。遺伝子の多型と発現の両面を体系的に解析することで、より体系的な癌の生物学的特徴を追究し、そのゲノム構造が明らかにされることが期待される。

染色体レベルでの異常の検索に対しては、染色体上の DNA コピー数の変化や染色体の再編成を解析する CGH (comparative genomic hybridization) 法を発展させ、ゲノムワイドな解析が可能になるように CGH と cDNA マイクロアレイを組み合わせた microarray-based CGH が開発された⁴³⁾。この方法は遺伝子のコピー数の異常を定量的に解析できることが大きな特徴で、今後癌や遺伝子性疾患の原因遺伝子の同定にその有用性が期待されている。

またタンパク質レベルでは、TMA (tissue microarray) が開発され⁴⁴⁾、解析対象タンパク質の発現状態を一度に数千の組織で調べることができるようになり、DNA チップで同定された candidate 遺伝子が実際に組織中でどのような発現をしているのかを体系的に確認できるようになった。

今後の癌研究には、DNA チップと各種の解析手段を組み合わせる方向性がますます重要になると考えられる。

おわりに

癌研究において、DNA チップを用いた発現プロファイル解析は、鍵となる遺伝子の同定や、従

来の診断より強力な悪性度診断, 予後予測診断, また薬剤耐性予測診断などさまざまな成果をあげるようになった。これからもDNAチップが大きな役割を担うことに疑う余地はないが, その成果を臨床応用するために, DNAチップがもつ金銭面, 技術面での問題を克服し, 個々の症例に応じ

た診断・治療が実践されることが期待される。また, 今後はゲノム, プロテオーム解析技術とあいまって, DNA, RNA, タンパク質すべてのレベルでの情報の相互作用も含めて体系的に解析し, 癌の本質が解明されることが期待される。

文献

- 1) Chang EH, Furth ME, Scolnick EM & Lowy DR. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297, 479 (1982)
- 2) Knudson AG. Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* 34, 1 (2000)
- 3) Ponder BA. Cancer genetics. *Nature* 411, 336 (2001)
- 4) 竹政伊知朗, 門田守人. ヒト癌の遺伝子発現プロファイル解析の現況と展望: 松原謙一編. ゲノム機能—発現プロファイルとトランスクリプトーム, p83 (中山書店, 東京, 2000)
- 5) 竹政伊知朗, 門田守人, 松原謙一. 癌の悪性度とマイクロアレイ; 遺伝子発現プロファイル解析. *消外* 24, 1733 (2001)
- 6) Dulbecco R. A turning point in cancer research : Sequencing the human genome. *Science* 231, 1055 (1986)
- 7) Liang P & Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967 (1992)
- 8) Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B & Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484 (1995)
- 9) Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP et al. Suppression subtractive hybridization : A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6025 (1996)
- 10) Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14, 1675 (1996)
- 11) Schena M, Shalon D, Davis RW & Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467 (1995)
- 12) Tseng GC, Oh MK, Rohlin L, Liao JC & Wong WH. Issues in cDNA microarray analysis : Quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res* 29, 2549 (2001)
- 13) Troyanskaya O, Cantor M, Sherlock G et al. Missing value estimation methods for DNA microarrays. *Bioinformatics* 17, 520 (2001)
- 14) Eisen MB, Spellman PT, Brown PO & Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14863 (1998)
- 15) Agatonovic-Kustrin S & Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharm Biomed Anal* 22, 717 (2000)
- 16) 前田英作. 痛快! サポートベクトルマシン: 古くて新しいパターン認識手法. *情報処理* 42, 676 (2001)
- 17) Ramaswamy S & Golub TR. DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol* 20, 1932 (2002)
- 18) Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al. Molecular classification of cancer : Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531 (1999)

- 19) Tusher VG, Tibshirani R & Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5116 (2001)
- 20) DeRisi J, Penland L, Brown PO et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14, 457 (1996)
- 21) Zhao N, Hashida H, Takahashi N, Misumi Y & Sakaki Y. High-density cDNA filter analysis : A novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression. *Gene* 156, 207 (1995)
- 22) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap/>
- 23) Takemasa I, Higuchi H, Yamamoto H et al. Construction of preferential cDNA microarray specialized for human colorectal carcinoma : Molecular sketch of colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 1244 (2001)
- 24) Bittner M, Meltzer P, Chen Y et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406, 536 (2000)
- 25) Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747 (2000)
- 26) Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10869 (2001)
- 27) Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 344, 539 (2001)
- 28) Khan J, Wei JS, Ringner M et al. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 7, 673 (2001)
- 29) Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 15149 (2001)
- 30) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503 (2000)
- 31) Shipp MA, Ross KN, Tamayo P et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 8, 68 (2002)
- 32) Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M et al. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 415, 436 (2002)
- 33) Scherf U, Ross DT, Waltham M et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 24, 236 (2000)
- 34) Staunton JE, Slonim DK, Collier HA et al. Chemosensitivity prediction by transcriptional profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10787 (2001)
- 35) 竹政伊知朗, 樋口浩文, 門田守人ほか. DNA マイクロアレイでのターゲットDNAとプローブDNAの調製. *Surg Front* 8, 74 (2001)
- 36) Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis : A new challenge to computational biologists. *Genome Res* 9, 681 (1999)
- 37) 竹政伊知朗, 山崎 誠, 万井真理子ほか. 臨床応用へむけた癌の遺伝子発現解析 : DNAチップを用いた大腸癌の発現プロファイル解析. *癌の臨床* 46, 313 (2002)
- 38) Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD et al. Laser capture microdissection. *Science* 274, 998 (1996)
- 39) Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A et al. RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1663 (1990)
- 40) Assersohn L, Gangi L, Zhao Y et al. The feasibility of using fine needle aspiration from primary breast cancers for cDNA microarray analyses. *Clin Cancer Res* 8, 794 (2002)
- 41) Sotiriou C, Khanna C, Jazaeri AA, Petersen D & Liu ET. Core biopsies can be used to distinguish differences in expression profiling by cDNA microarrays. *J Mol Diagn* 4, 30 (2002)

- 42) Wang DG, Fan JB, Siao CJ et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280, 1077 (1998)
- 43) Pinkel D, Segev R, Sudar D et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20, 207 (1998)
- 44) Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4, 844 (1998)



テーマ◇これからの肝発癌研究をどう考えるか

■セッションIII：制御「肝硬変へのIFN投与は肝発癌を抑制する」-④

インターフェロン- α 併用動注化学療法 による肝細胞癌の治療

永野 浩昭・左近 賢人・門田 守人 大阪大学大学院医学系研究科病態制御外科学

Key words : 肝細胞癌, 門脈内腫瘍栓, インターフェロン, 動注化学療法, 肝切除

はじめに

門脈内腫瘍栓などの脈管侵襲を伴う進行肝細胞癌症例では、仮に肉眼的に根治的肝切除が施行できても高率に残肝再発をきたすために、1年生存率が45%と半数以上の症例が1年以内に死に至る¹⁾。この極めて高頻度の残肝再発のため、原発性肝癌取り扱い規約(第4版)²⁾においては、門脈内腫瘍栓を伴う(Vp3以上)肝細胞癌症例における肝切除の治癒度は、肉眼的な腫瘍の完全摘出の有無に関わらず、全例Cのいわゆる絶対非治癒切除に分類される。したがって、肝細胞癌切除後治療成績の向上のためには、このような進行肝細胞癌に対する治療、特に肝切除術後の再発予防対策開発こそが急務である。最近われわれは、このような症例に対し、肝動脈内化学療法(動注化学療法)にインターフェロン(interferon: IFN)の皮下注を併用し、プレリミナリーではあるが極めて良好な治療効果を得ている³⁾ので、報告する。

I. 臨床成績

1. IFN 併用化学療法の対象と方法

本療法の対象は、門脈一次分枝または本幹侵襲(Vp3以上)を伴う高度進行肝細胞癌症例である。全肝多発病変を伴う切除不能症例では、セルディング法にて肝動注カテーテルを挿入する。肝切除可能例の場合は、術中にカテーテルを留置し術後補助療法として施行する。治療方法は、5-FUは450~500 mg/日、2週間投与・2週間休薬を1クールとして持続動注する。同時にIFN- α を 5×10^6 単位/回、3回/週、4週間を1クールとして皮下投与する(図1)。本法は以前に報告された金沢大学のUrabe, Kobayashiらの方法⁴⁾をmodifyしプロトコールを作成した。

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、AST, ALTがともに100 IU/l未満などを適応としている(表1)。

2. 治療成績

現在までに門脈内腫瘍塞栓(Vp3以上)を伴う切除不能症例23例に対してIFN併用化学療法

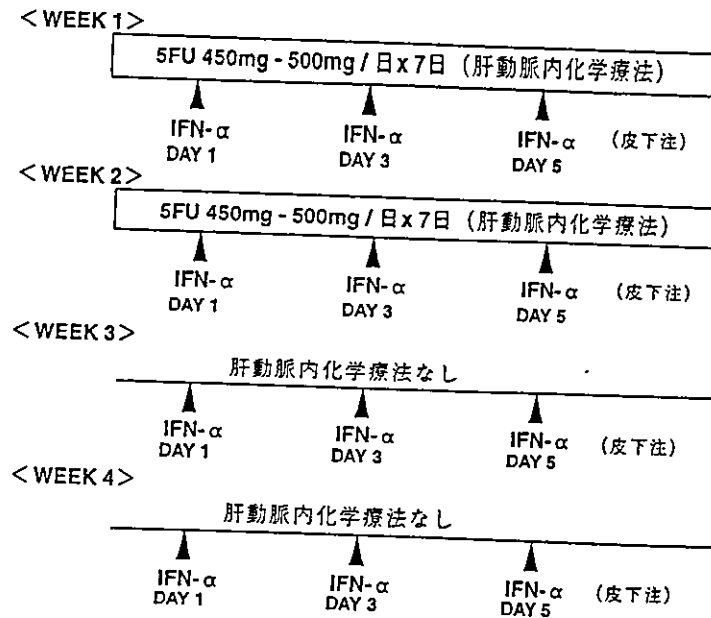


図 1 IFN 併用化学療法のプロトコール

表 1 IFN 併用化学療法の適応

1	門脈内腫瘍栓を伴う進行肝細胞癌 (Vp 3 以上)
2	遠隔転移なし
3	肝機能不良症例を除く AST < 100 IU/l, ALT < 100 IU/l, T. Bil: 正常 (閉塞性黄疸は除く)
4	腎機能正常 血清 Crnn < 1.5 mg/dl
5	PS: 0 または I
6	70 歳未満

法を施行してきた。これらの症例のうち CR 例を含めて 12 例で著効を示した。現在、観察期間は 6 カ月から最長 52 カ月に達している。

さらにわれわれは、門脈内腫瘍塞栓を伴う症例 (Vp 3 以上) において肝切除術後の補助療法として応用した。観察期間は 8~40 カ月 (平均 19 カ月) で、病巣の完全摘出を施行し得た 8 例については、無再発生存 5 例 (最長 40 カ月)、再発生存 1 例 (33 カ月)、癌死 1 例 (18 カ月)、再発他因死 1 例 (22 カ月) であった。これらの症例については、観察期間は短いものの、1 年生存率は 100% であった。一方、現在までに当科において肝切除を施行した門脈内腫瘍塞栓 (Vp 3

以上) の症例で IFN 併用化学療法を施行しなかった 23 例の 1 年生存率は 41% であり、肝切除術後の補助療法として期待し得る治療法であり、肝切除の適応拡大の可能性が十分にあると思われた。

II. 作用機序

IFN-α の抗腫瘍効果は、細胞障害作用⁵⁾、細胞周期遅延作用⁶⁾、癌抗原の発現上昇⁶⁾等の直接的作用の報告と、NK 細胞の活性化⁷⁾、マクロファージ系の活性化⁸⁾、T 細胞系の活性化⁹⁾等の間接的作用が報告されている。

さらに、IFN-α と 5-FU との併用による *in*

in vitro での作用増強の報告も多い。腫瘍細胞の apoptosis の増加¹⁰⁾, cell cycle の遅延¹¹⁾に加えて, 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¹²⁾, 薬剤併用による thymidylate synthase (TS) 阻害率の上昇効果¹³⁾, 等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 併用化学療法的作用機序について, 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。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, 肝細胞癌株のインターフェロン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¹⁵⁾。

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¹⁶⁾。この血管新生抑制効果については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ある。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中である。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ている。また, IFN 併用動注化学療法を施行した進行肝細胞癌 (Vp 4, IM 3) 症例の治療前後の末梢血単核球中の Tumor ne-

crisis 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たが, 治療無効群では認められないことがわかった¹⁶⁾。

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, インターフェロン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。

おわりに

治療抵抗性の進行肝細胞癌症例に対する治療法として, 本療法は新たな選択肢としての確立が期待されるところであり, さらなる症例の蓄積が待たれる。

文 献

- 1) 第14回全国原発性肝癌追跡調査報告, 日本肝癌研究会編, 進行印刷出版, 2000年。
- 2) 原発性肝癌取り扱い規約(第4版), 日本肝癌研究会編, 金原出版, 2001年。
- 3) Sakon M, Nagano H, Dono K et al : Combined intraarterial fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94 : 435-442, 2002.
- 4) Urabe T, Kaneko S, Matsushita E et al : 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.
- 5) Kimchi A : Cytokine triggered molecular pathways that control cell cycle arrest. *J Cell Biochem* 50 : 1-9, 1992.
- 6) Guadagni F, Schlom J, Johnston WW et al : Selective interferon-induced enhancement of tumor-associated antigens on a spectrum of freshly isolated human adenocarcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 81 : 502-512, 1989.

- 7) Ortaldo JR, Mantovani A, Hobbs D et al : Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int J Cancer* 31 : 285-289, 1983.
- 8) Uno K, Shimizu S, Ido M et al : Direct and indirect effects of interferon on *in vivo* murine tumor cell growth. *Cancer Res* 45 : 1320-1327, 1985.
- 9) Brinkmann V, Geiger T, Alkan S et al : Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 178 : 1655-1663, 1993.
- 10) Horowitz RW, Heerdt BG, Hu X et al : Combination therapy with 5-fluorouracil and IFN-alpha 2a induces a nonrandom increase in DNA fragments of less than 3 megabases in HT 29 colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 3 : 1317-1322, 1997.
- 11) Wadler S, Schwartz EL : Antineoplastic activity of the combination of interferon and cytotoxic agents against experimental and human malignancies : a review. *Cancer Res* 50 : 3473-3486, 1990.
- 12) Schwartz EL, Hoffman M, O'Connor CJ et al : Stimulation of 5-fluorouracil metabolic activation by interferon-alpha in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182 : 1232-1239, 1992.
- 13) 池田直樹, ト部 健, 種井政信 他 : 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 : 790-794, 1994.
- 14) Eguchi H, Nagano H, Yamamoto H et al : Augmentation of anti-tumor activity of 5-FU by IFN- α is associated with up-regulation of p27^{KIP1} in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6 : 2881-2890, 2000.
- 15) Kondo M, Nagano H, Sakon M et al : Expression of interferon α/β receptor in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 17 : 83-88, 2000.
- 16) 永野浩昭, 左近賢人, 門田守人 : 肝癌一進行肝癌の治療. *肝胆膵* 43 : 945-949, 2001.

* * *

表 再発後生存率向上に関与した独立予後因子

	Odds ratio (95% CI)	p value
再切除 (n=39) *	4.071 (2.212 - 7.493)	<.0001
複数治療施行	3.325 (2.204 - 5.014)	<.0001
単発再発	1.975 (1.357 - 2.874)	.0004
プロトロンビン良好	1.468 (1.018 - 2.115)	.0398

*、他治療後に施行した12例を含む。

療後に施行していた。

考察：肝切除後の残肝再発を防ぐことはいまだ困難であるが、切除後 follow-up system の確立¹⁾や初回縮小切除による残肝機能の温存による再発例に対する治療機会の増加によって、再発後生存率(R-SR)は向上している^{2,3)}。

再切除は最も有効な再発肝癌治療として確立しており⁴⁾、今回の多変量解析でも独立予後因子として検出された。特に他治療後にでも再切除を施行した場合には、R-SR 向上に関与するため、肝癌治療の選択肢として常に念頭に置くべきである。

しかし重要なことは、再発時初動治療としてどの治療を選んだ場合もその後平均2回の再発後治療が繰り返されていること、多変量解析で複数回治療を行うことがR-SR 向上に関与することである。すなわち再発肝癌のR-SR 向上のためには、一つの治療法に固執することなく、可能な治療を粘り強く継続することが重要であると考えられた⁵⁾。

結語：再発肝癌に対して複数の治療を選択すること

は、R-SR 向上に関与するため、可能な治療を可能な限り継続すべきである。特に再切除は再発時初動治療のみならず、IVR や ablation 後でも、施行し得た場合は、R-SR 向上に大きく関与するため、残肝再発治療の選択肢として常に念頭に置くべきである。なおこの方針は再発例のみならず肝癌診療全体にもあてはまると考えている。

文 献

- 1) 首藤太一, 広橋一裕, 久保正二, 他: 肝細胞癌切除例に対するフォローアップ. 臨外 57: 771-776, 2002
- 2) Shuto T, Hirohashi K, Kubo S, et al: Changes and results of surgical strategies for hepatocellular carcinoma: Results of a 15-year study on 452 consecutive patients. Surg Today 28: 1124-1129, 1998
- 3) Hirohashi K, Shuto T, Kubo S, et al: Prognostic factors after recurrence of resected hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus. J Hepatobiliary Pancreat Surg 8: 81-86, 2001
- 4) Shuto T, Kinoshita H, Hirohashi K, et al: Indications for, and effectiveness of, a second hepatic resection for recurrent hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenterol 43: 932-937, 1996
- 5) 首藤太一, 広橋一裕, 久保正二, 他: 切除後再発肝細胞癌に対する治療選択—再発例にいかなる治療の選択が最適か?— 外科治療 86: 353-354, 2002

7. 当科における肝細胞癌の診療方針

永野 浩昭 左近 賢人 門田 守人

大阪大学医学部附属病院消化器外科

索引用語：肝細胞癌, 治療

肝細胞癌は、ほとんどの症例において肝硬変を合併しているため、その治療においては、その腫瘍進展度のみならず、慢性肝障害の程度などについても十分に

考慮する必要がある。したがって、抗腫瘍効果と肝機能の保持について十分に考慮された治療法の選択が、何よりも肝要である。

治療方針：肝細胞癌症例に対する当科の治療方針を示す。肝細胞癌が疑われる症例においては、全例 MDCT (multidetector-CT), CT-AOG, 必要に応じて MRI を施行し、腫瘍個数、その局在について治療前に明確にする。また、末梢血液検査(血小板数など)、生化学的検査(T. Bil, T. P., Alb, Ch-E など)、止血検査(PT, HPT), ICG-R15(%) などにより、肝機能について十分に検索する。そのさい、HBC, HCV に関する検索についても行う。腫瘍の肉眼的進行度が Stage-I, II (腫瘍数, 2 以下) の症例で肝機能が良好な症例については、基本的に肝切除が選択されるが、Stage-I では、MCT, RF, PEI などの成績についての Informed Consent (以下 IC) は不可欠である。肝機能が不良で、腫瘍数 3 個以下、最大径 3 cm 以下については、MCT, RF, PEI が選択され、消化器内科、放射線科の担当となる。多発肝癌などの症例は原則的に CT-AOG 施行時に TAE が選択される。門脈内腫瘍栓をともなう高度進行肝細胞癌 (VP3 以上) においては、IFN 併用化学療法¹⁾を基軸にした治療が選択される。仮に腫瘍の stage は低くとも、きわめて肝機能が不良な症例は、生命的予後が肝機能に左右されるため、積極的な治療法の選択については慎重な配慮がなされるが、ミラノクライテリア²⁾と本人・ご家族の IC のもとに肝移植が選択される場合もある。また、進行肝細胞癌であっても、肝機能不良で肝移植以外の有効な治療法がない症例や、肝移植以外の方法においては制御不可能な肝細胞癌症例においては、肝外病変(リンパ節を含む)がないこと、門脈内腫瘍栓のような脈管侵襲がないことを条件に、腫瘍の個数や大きさだけでは生体肝移植の適応除外とはしていない。

治療成績：1) 2001 年 9 月末までに、当科において肝切除を施行した症例は 482 例で、腫瘍径 (cm, 2 未満, 2-5, 5-10, 10 以上) での 5 年生存率は 82, 64, 42, 41% で、5 cm をさかいに有意差を認めた ($p < 0.01$)。特に 3 cm 以下の症例については、仮に肝機能が良好で切除可能であっても、肝切除と MCT (第 15 回全国肝癌追跡調査報告³⁾の成績) に、その生存率において差が認められなかったため、消化器内科、放射線科と検討し、腫瘍の局在、十分な IC のもと治療方針の決定をする (図 1)。ただし、局所再発症例については速やかに肝切除などの他治療へ移行すること、また、小型肝細胞癌の焼灼範囲については CT-A 施行時のドレナージ領域^{4,5)}について考慮することとしている。2) 肝切除施行後の 2 年以内残肝再発危険因子について、切除全例の臨床病理学的諸因子について COX の比例ハザードモデルによる多変量解析を施行したところ、腫瘍径 5 cm 以上、組織学的 vp, 組織学的 im が独立した危険因子であった ($p = 0.009, 0.005, 0.007$)。このような症例については残肝再発を十分に念頭に置く必要があり、今後は何らかの補助療法が必要になると考えられる。3) VP3 以上の症例における、IFN 併用化学療法の施行例については、門脈内腫瘍栓をともなう進行肝細胞癌の症例を病変の局在に応じて、門脈内腫瘍栓に全肝多発病変をともなう症例 (1 群)、門脈内腫瘍栓に片葉の主腫瘍をともな

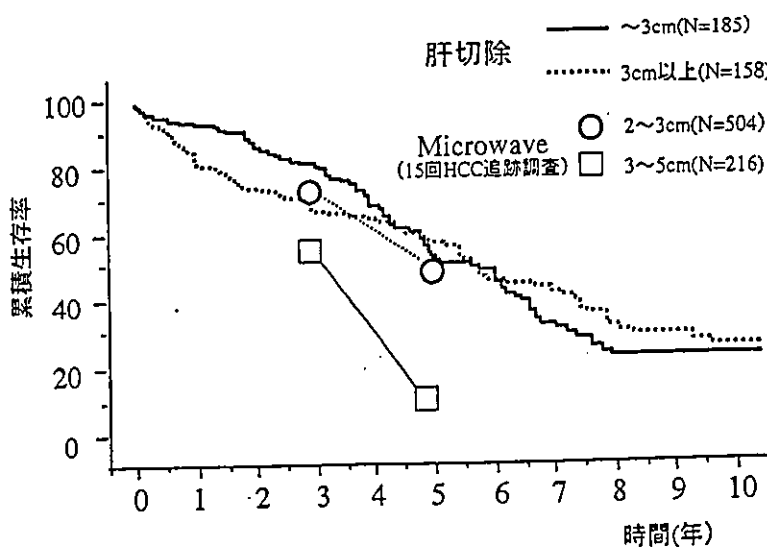


図1 肝細胞癌症例の生存曲線—腫瘍径

表1 進行肝細胞癌に対する IFN 併用化学療法

症例数	治療	観察期間(月)	奏効率	1年生存率
1群 n=23	IFN 併用動注化学療法	6-53	53%	-
2群 n=9	肝切除術 IFN 併用動注化学療法	6-43	-	100%
3群 n=16	減量肝切除術 IFN 併用動注化学療法	2-18	-	64%

表2 生体肝移植施行症例(肝細胞癌)

年齢	性別	Child-Score	腫瘍径(cm)	腫瘍数	肝癌再発	観察期間(月)	
1	58	F	B	1.9	3	-	10
2	32	M	B	1.7	多発	-	4
3	59	F	C	2.4	多発	-	2
4	54	M	C	<3.0	多発	-	1

う症例(2群), 門脈内腫瘍栓に片葉の主腫瘍と全肝多発病変をともなう症例(3群)の3タイプに分類した。1群についてはIFN併用動注化学療法を23例に施行し53%の奏効率をえた。2群については, 肝切除術と術後補助療法としてのIFN併用動注化学療法を3クール, 9例に対して施行した。これらの症例の1年生存率は100%であった。3群においては, 減量肝切除と術後のIFN併用化学療法を16例に施行した。現在観察期間は短いものの, 2例において残存肝病巣のCRをえた(表1)。今後の検討課題である。4) 消化器内科より紹介された肝硬変合併肝癌に対して成人間の生体部分肝移植を4例に施行した。その内訳は, 肝機能不良症例(ミラノクライテリア適合例):1例, 肝移植以外の他治療での制御不可能症例:1例, 上記の療法が当てはまる症例:2例であった。観察期間(1-10ヵ月)は短いものの, 全例無再発生存中である(表2)。

結語: 肝細胞癌の治療方針決定には, 詳細な腫瘍存在診断, 肝機能評価, とともに消化器内科, 放射線科, 外科の連携が必要になる。また, その中における肝臓外科の主たる役割は, 進行肝細胞癌に対する治療と, 既存の治療法では制御不可能な症例や肝機能高度不良例に対する肝移植であると考えられる。

文 献

- 1) Sakon M, Nagano H, Dono K, et al: Combined Intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous Interferon- α therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94: 435-442, 2002
- 2) Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al: Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 334: 693-699, 1996
- 3) 日本肝癌研究会: 第15回全国原発性肝癌追跡調査報告(1998-1999), 日本肝癌研究会肝癌追跡調査委員会編, 日本肝癌研究会, 京都, 2000
- 4) Sakon M, Nagano H, Shimizu J, et al: Hepatic resection of hepatocellular carcinomas based on tumor hemodynamics. *J Surg Oncol* 73: 179-181, 2000
- 5) Sakon M, Nagano H, Nakamori S, et al: Intrahepatic recurrences of hepatocellular carcinoma after hepatectomy: analysis based on tumor hemodynamics. *Arch Surg* 137: 94-99, 2002

肝細胞癌に対する新治療法の開発研究

—インターフェロンとフルオロウラシルの併用を中心に—

永野浩昭 左近賢人 門田守人

Development and research of the new therapy for hepatocellular carcinoma

— Combined interferon and 5-fluorouracil therapy —

Hiroaki Nagano, Masato Sakon, Morito Monden

Department of Surgery and Clinical Oncology,

Graduate School of Medicine, Osaka University

Abstract

The prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC) invading the major branches of the portal vein (Vp3 or 4) is extremely poor. Recently, we reported the efficacy of the combination therapy with subcutaneous interferon (IFN)-alpha and intra-arterial 5-FU for intractable HCC with Vp3 or Vp4. Forty-eight consecutive patients with HCC and Vp3 or 4 were treated with the combination therapy consisting of continuous arterial infusion of 5-FU (450-500 mg/day, 5 days/week, for the initial 2 weeks) and subcutaneous injection of IFN (5 MIU, 3 times/week, 4 weeks). The treatment outcome of these cases was very good. In addition, it is considered direct antitumor effect, the angiogenesis depression effect, and the indirect antitumor effect through immunocompetent cell, may concerned, as the mechanism.

In conclusion, combination therapy with subcutaneous IFN and intra-arterial 5-FU is therefore a promising treatment modality for intractable HCC with Vp3 or 4.

Key words: Interferon, Intraarterial perfusion chemo-therapy, Hepatocellular Carcinoma, Hepatic resection, Tumor thrombi in the major portal branches

はじめに

近年の肝細胞癌に対する治療法の進歩はめざましく、特に肝内病巣の制御に対しては、肝切除、化学塞栓療法 (transcatheter arterial embolization: TAE), 経皮的エタノール注入療法 (percutaneous ethanol injection: PEI), マイクロ波凝固療法 (microwave coagulation therapy: MCT), ラジオ波焼灼療法 (radiofrequency ablation:

RFA) などの集学的治療により、治療効果を上げている。しかし、肝細胞癌の場合、仮に腫瘍局所については十分に治療されているとしても、高率に残肝再発を来し、再度局所療法が必要になる。

肝細胞癌の治療経過において、このように再発に対する肝内局所治療を繰り返すうちに、最終的には門脈内腫瘍栓などの脈管侵襲、びまん性結節、遠隔転移などのいわゆる治療抵抗性の

病巣となる。そのような病態に陥れば、いわゆる既存の局所治療は全く効果を示さず、最終的には原病死に至る。この場合、他臓器癌であれば、一般的には抗癌剤などの適応となるが、肝細胞癌には有効な抗癌剤が少ないため治療法の選択の余地は極めて乏しい。したがって、肝細胞癌治療における更なる予後改善のためには、このような難治性進行肝細胞癌に対する新しい治療法の開発こそが、急務であると考えられる。

最近著者らは、抗癌剤(フルオロウラシル: 以下 5-FU)の肝動脈内化学療法にインターフェロン(interferon: 以下 IFN)を併用することにより、Vp3 以上の肉眼的門脈内腫瘍栓を伴う高度進行肝細胞癌に対して良好な成績をあげてきた²⁾。本稿においては、この IFN と 5-FU を用いた IFN 併用化学療法について、最近の治療成績とともにその研究成果について概説したい。

I. 悪性腫瘍に対する IFN 併用化学療法

IFN はその多彩な生理活性により生体に対して様々な作用をもたらすが、近年、大腸癌をはじめとした固形癌に対して、5-FU などの抗腫瘍剤と IFN を併用することによってその抗腫瘍効果が増強されるとの報告がなされている。Wadler ら³⁾の手術不能の大腸癌患者に IFN と 5-FU の併用療法を試み、76% の有効率を認めたとの報告以降、様々な臓器で本療法が試みられてきた。胃癌、食道癌などでも本療法の臨床応用がなされており⁴⁾、効果については様々な報告があるものの有効との報告も多く、治療不能な悪性疾患に対する選択肢として今後の結果が期待されている。

肝細胞癌に対しても同様に、Patt ら⁵⁾は AFP 値の低い肝癌症例で 31% の有効性を認めたと報告している。更に、Urabe ら⁶⁾は進行肝細胞癌症例に 5-FU と IFN に加え Cisplatin, Methotrexate を併用し、46.7% の有効性を認めたと報告し、また Leung ら⁷⁾は同様に Cisplatin, Doxorubicin を併用し、36 例の手術不能患者のうち 9 人が手術可能となり術後再発もなかったと報告している。

これらの知見をふまえ、既存の治療法では十

分な治療効果の期待できない高度進行肝細胞癌症例に対して、著者らは IFN- α と 5-FU を併用した治療法を 1997 年より行い、極めて良好な結果を得て報告してきた^{8,9)}。

II. 使用薬剤と投与方法、対象症例

IFN 併用化学療法の実際について報告する。

非手術症例においてはセルディングー法にて、肝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 450-500 mg/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)。

本療法の対象症例について示すと、当科においては、既存の治療法が全く効を奏しないとされる、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をその対象としている。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、本療法の適応としている。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 Crn n < 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 48 症例に IFN 併用化学療法(以下、IFNchemTx)を施行してきた。その内容については、門脈内腫瘍栓を伴う肝細胞癌症例を以下の 3 つのタイプに分類し、それぞれにおいて治療方針を決定した。対象となった内訳は、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): 23 例、片葉の巨大肝癌と門脈内腫瘍栓を伴う症例(B 群): 9 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、

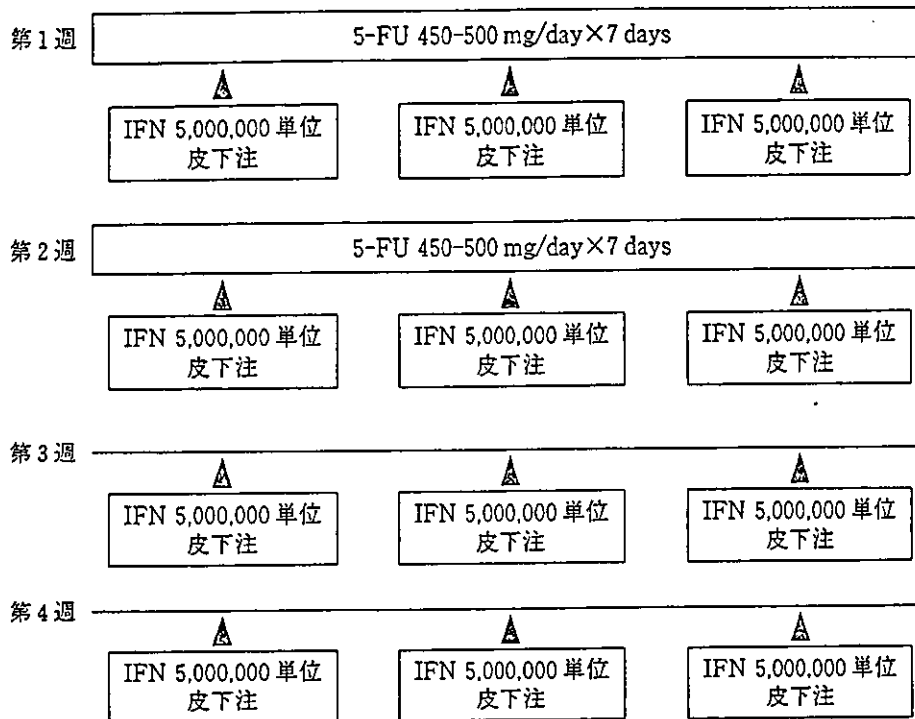


図1 IFN併用化学療法のプロトコール

表1 IFN併用化学療法の適応症例

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

IFNchemTx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(旧規約：相対的非治癒切除)を施行し、術後に補助療法としてIFNchemTx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、IFNchemTx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48症例の観察期間は4-53カ月であった。A群23例については、肝内病巣に関してCR:7例, PR:

5例の計12例53%の症例において有効であった。その一方で、11例47%については無効であり、無効例は全例6カ月以内に肝細胞癌により癌死した(表2)。23例の1年生存率は、52%であった。B群9例については、無再発生存6例(6-50カ月)、再発生存1例(36カ月)、癌死1例(18カ月：肺転移)、再発他因子1例(22カ月)で、1年生存率は100%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IFNchemTxを施行しなかった症例は現在までに18例あるが、これらの症例の1年生存率は41%で、B群(IFNchemTx施行症例)の方が治療成績が有意によかった。C群においては、いま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)を認めた症例が3例あり、現時点における1年生存率は65%である。

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

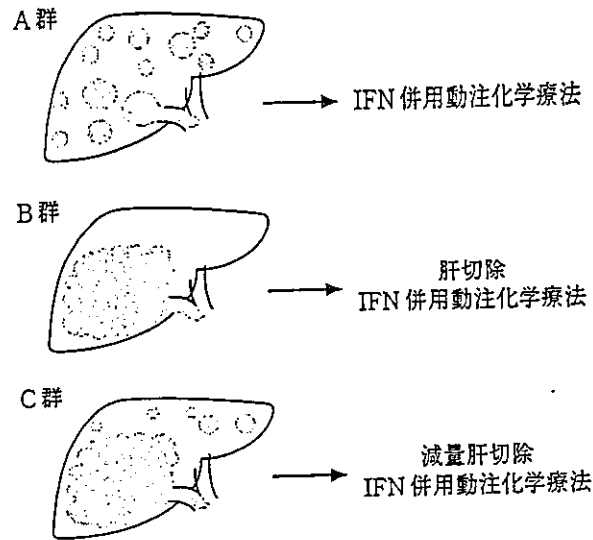


図2 門脈内腫瘍栓を伴う肝細胞癌症例の病型による治療方針

表2 A群(切除不能症例)の治療成績

	症例数	治療効果	観察期間	1年生存率
有効	n=7	CR	6-53 カ月	100%
	n=5	PR	10-12 カ月	
無効	n=11	PD	5-6 カ月	0%

表3 B群(肝切除および術後補助療法)の治療成績

		観察期間	1年生存率
無再発生存	n=6	6-43 カ月	100%
再発生存	n=1	36 カ月	
再発癌死	n=1	18 カ月	
再発他因子	n=1	22 カ月	

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¹⁰⁾、細胞周期遅延作用¹¹⁾、癌抗原の発現上昇¹²⁾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¹³⁾、マクロファージ系の活性化¹⁴⁾、T細胞系の活性化¹⁵⁾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¹⁶⁾や、薬剤併用による thymidylate synthetase (TS) 阻害率の上昇効果¹⁷⁾、腫瘍細胞の apoptosis の増加^{18,19)}、cell cycle の遅延²⁰⁾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著者らは、進行肝細胞癌に対するIFN併用化学療法の作用機序について、①IFN- α と5-FUの直接的抗腫瘍効果、②IFN- α と5-FUの併用による血管新生抑制効果、③IFN- 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。更にこの効果は、肝細胞癌株のインターフェロン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²¹⁾(図4)。更に最近では、この直接的抗腫瘍効果については、IFN受容体にシグナルが到達してから、細胞内の伝達系路の中で、Bcl-xl

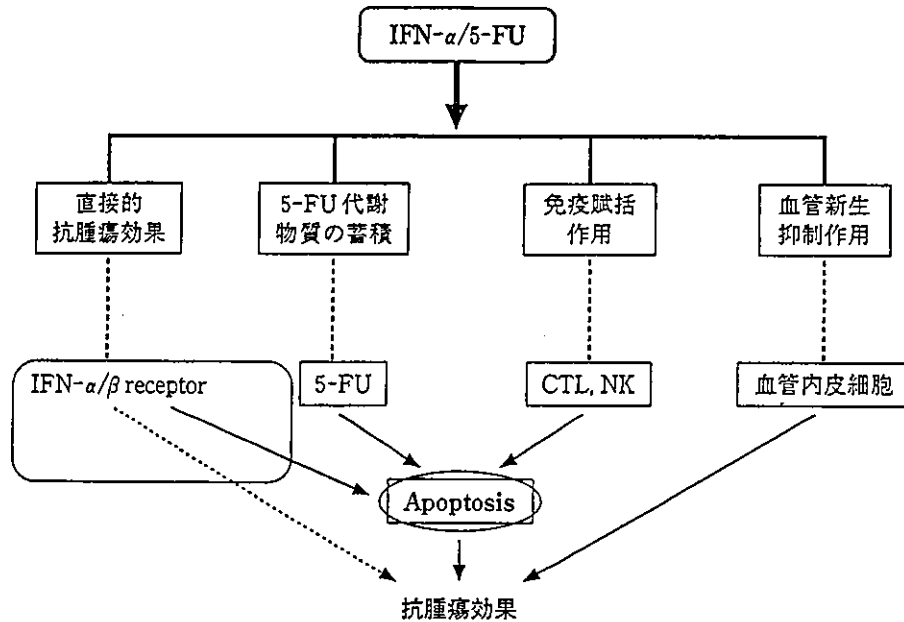


図3 IFN併用化学療法的作用機序

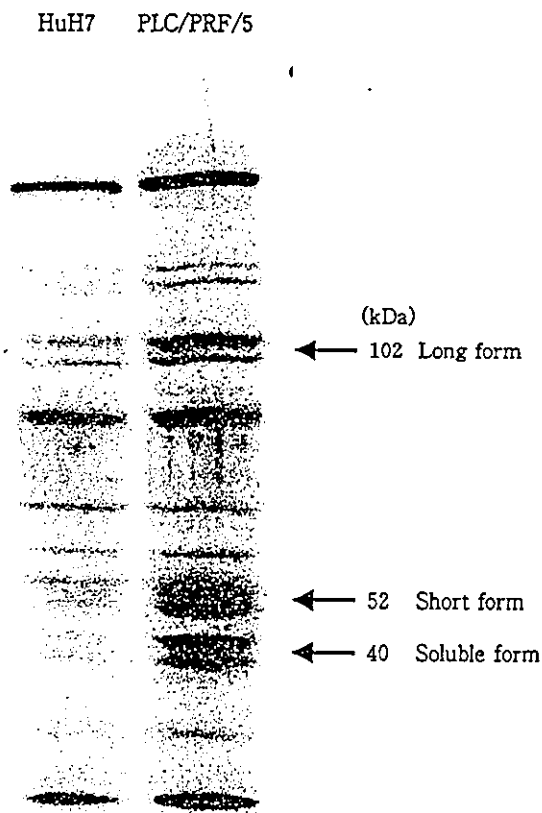


図4 2種類の肝細胞癌細胞株(HuH7とPLC/PRF/5)でのIFN-レセプターの発現^{21) 22)}

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)の方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。

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⁹⁾(図5)。この血管新生抑制効果については、現在、更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中で幾つかの因子が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、現在著者らは、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中である。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ている。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

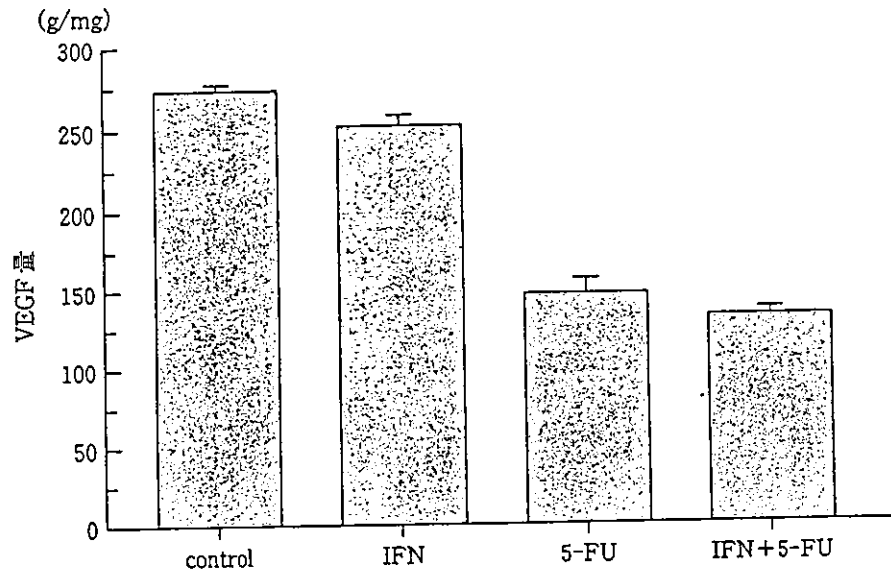


図5 肝細胞癌細胞株(HuH7)を用いた増殖抑制実験での培養上清中の VEGF 発現量の比較^{9)改}
IFN と 5-FU の併用群において、VEGF の発現は抑制されている。

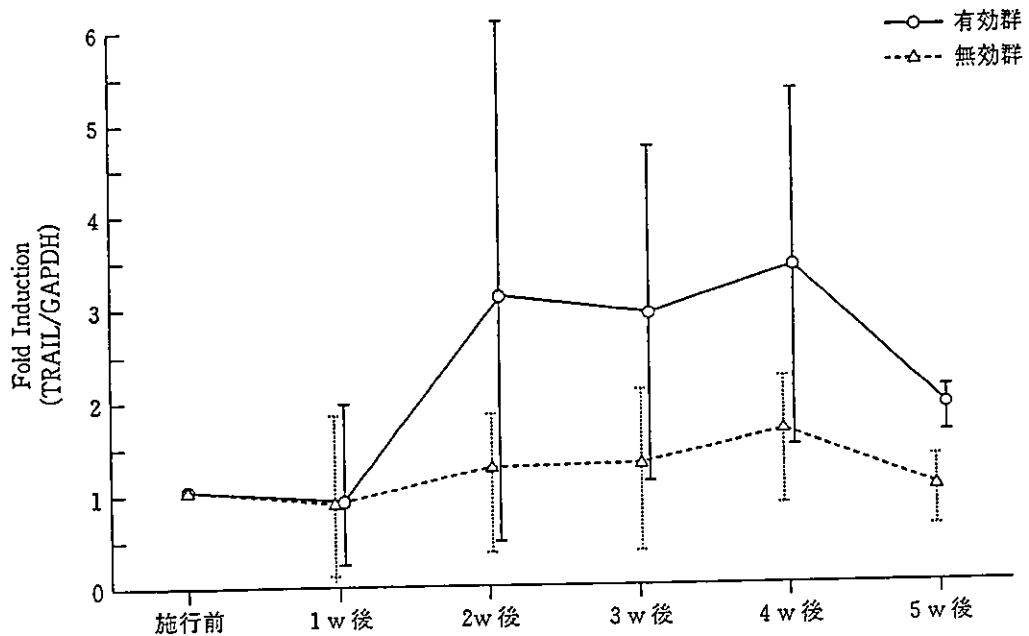


図6 IFN 併用動注化学療法を施行した進行肝細胞癌(VP4, IM3)症例の 治療前後の末梢血単核球中の TRAIL mRNA を比較^{9)改}
治療有効群では TRAIL の発現が治療前に比べて増加傾向を認めたが、治療無効 群では認められない。

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たが、治療無効群では 認められないことがわかった⁹⁾(図6)。

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、インターフェロン受容体を介し

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思 えている。

以上のように、IFNchemTx の肝細胞癌に対

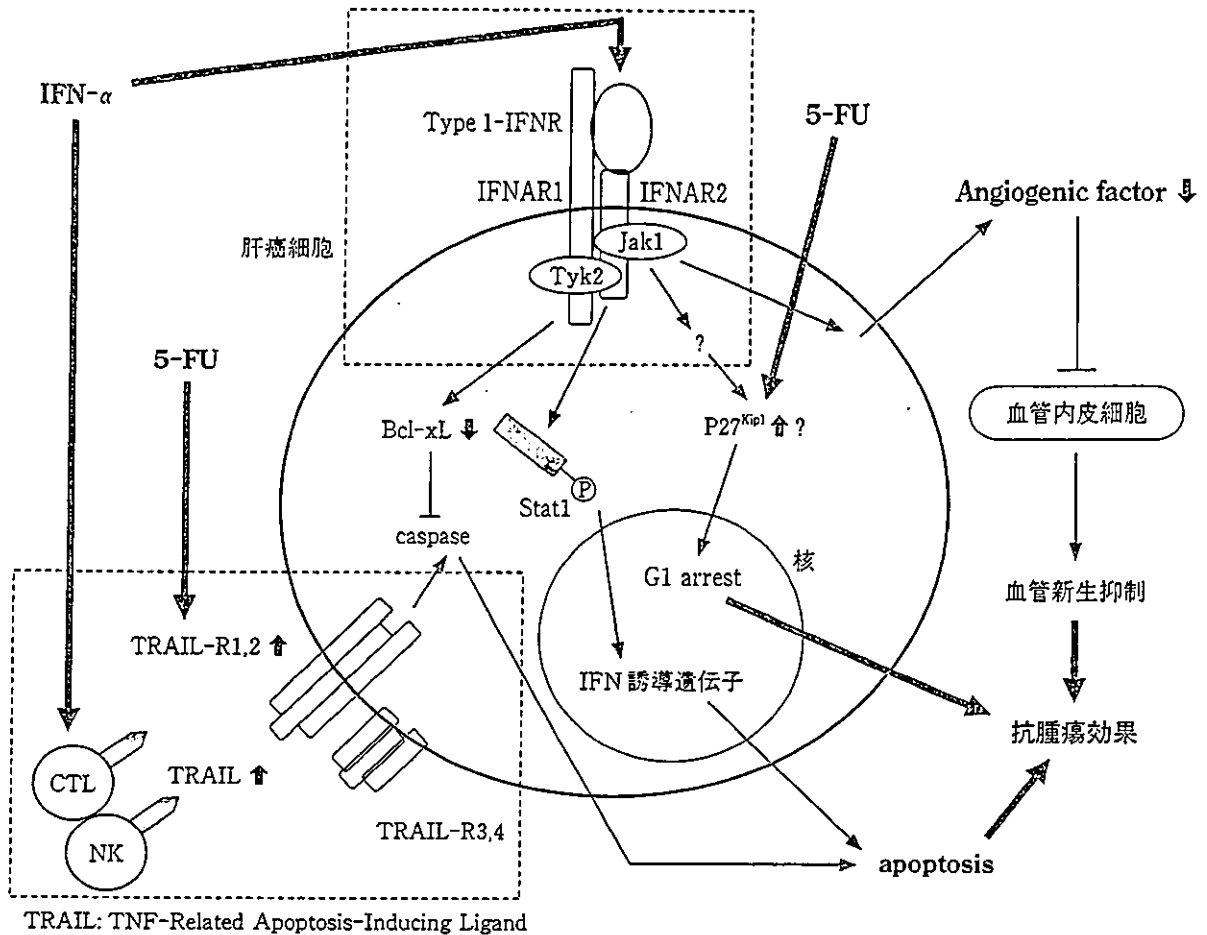


図7 IFN併用化学療法的作用機序に関する著者らの作業仮説の模式図

する抗腫瘍効果の作用機序については、幾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。現在までの著者らの解析結果を概説すると図7のようになる。今後の更なる検討が必要である。

法として、既存の治療法とは異なった機序の方法が望まれるが、本療法は新たな選択肢としての確立が期待されるところであり、更なる症例の蓄積が待たれる。

おわりに

治療抵抗性の進行肝細胞癌症例に対する治療

文献

- 1) Sakon M, et al: Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-α therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94(2): 435-442, 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: 3473-3486, 1990.
- 3) Kelsen D, et al: Interferon alfa-2a and fluorouracil in the treatment of patients with advanced esophageal cancer. *J Clin Oncol* 10: 269-274, 1992.

- 4) Lee KH, et al: Combination of 5-fluorouracil and recombinant interferon alpha-2B in advanced gastric cancer. A phase I study. *Am J Clin Oncol* 15: 141-145, 1992.
- 5) Patt YZ, et al: Low serum alpha-fetoprotein level in patients with hepatocellular carcinoma as a predictor of response to 5-FU and interferon-alpha-2b. *Cancer* 72: 2574-2582, 1993.
- 6) Urabe T, et al: 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, et al: Complete pathological remission is possible with systemic combination chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 5: 1676-1681, 1999.
- 8) Miyamoto A, et al: 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: 1447-1451, 2000.
- 9) 永野浩昭ほか: 肝癌—進行肝癌の治療. *肝胆膵* 43: 945-949, 2001.
- 10) Grander D, et al: Cytotoxic effect of interferon on primary malignant tumour cells. Studies in various malignancies. *Eur J Cancer* 29A: 1940-1943, 1993.
- 11) Kimchi A: Cytokine triggered molecular pathways that control cell cycle arrest. *J Cell Biochem* 50: 1-9, 1992.
- 12) Guadagni F, et al: Selective interferon-induced enhancement of tumor-associated antigens on a spectrum of freshly isolated human adenocarcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 81: 502-512, 1989.
- 13) Ortaldo JR, et al: Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int J Cancer* 31: 285-289, 1983.
- 14) Uno K, et al: Direct and indirect effects of interferon on *in vivo* murine tumor cell growth. *Cancer Res* 45: 1320-1327, 1985.
- 15) Brinkmann V, et al: Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med* 178: 1655-1663, 1993.
- 16) Schwartz EL, et al: Stimulation of 5-fluorouracil metabolic activation by interferon-alpha in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 1232-1239, 1992.
- 17) 池田直樹ほか: 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: 790-794, 1994.
- 18) Horowitz RW, et al: 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: 1317-1322, 1997.
- 19) Sabaawy HE, et al: Synergetic effects of retrovirus IFN-alpha gene transfer and 5-FU on apoptosis of colon cancer cells. *Acta Haematol* 101: 82-88, 1999.
- 20) Wadler S, et al: Fluorouracil and recombinant alfa-2a-interferon: an active regimen against advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 7: 1769-1775, 1989.
- 21) Eguchi H, et al: Augmentation of anti-tumor activity of 5-FU by IFN-alpha is associated with up-regulation of p27^{Kip1} in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6: 2881-2890, 2000.

Identification of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-Responsive Genes in Mouse Liver by Serial Analysis of Gene Expression

Makoto Kurachi,*† Shin-ichi Hashimoto,* Aya Obata,* Shigenori Nagai,* Tomoyuki Nagahata,* Hidekuni Inadera,‡ Hideko Sone,§ Chiharu Tohyama,§ Shuichi Kaneko,† Ken-ichi Kobayashi,† and Kouji Matsushima*¹

*Department of Molecular Preventive Medicine & CREST, School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan; †Department of Cancer Gene Regulation & CREST, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, 13-1 Takara-machi, Kanazawa, Ishikawa, 920-8641, Japan; ‡Environmental Science Center & CREST, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan; and §Environmental Health Science Division, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, 305-0053, Japan

Received February 18, 2002

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) is one of the most toxic environmental pollutants that causes various biological effects on mammals. To identify the genes involved in hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis induced by TCDD, we have conducted here serial analysis of gene expression of mouse liver 7 days after treatment with a single oral dose of 20 µg TCDD/kg body weight. We have sequenced total of 113,067 tags, including 56,420 tags and 56,647 tags from normal liver and TCDD-treated liver library, respectively. Statistical analysis showed that TCDD significantly altered 346 transcripts ($p < 0.05$) including 94 ESTs. The genes regulated by TCDD were not only the genes encoding drug metabolizing enzymes and stress response genes but also a wide variety of genes encoding cytoskeleton related proteins, signal transduction, and plasma proteins. This comprehensive gene expression analysis would provide novel genes that may help to clarify the mechanism of TCDD effects on mammalian liver, and also give a new approach for prevention and treatment. © 2002 Elsevier Science (USA)

Key Words: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; aryl hydrocarbon receptor; gene expression profile; mouse liver transcriptome; serial analysis of gene expression.

Abbreviations: AhR, aryl hydrocarbon receptor; CYP, cytochrome P450; DMSO, dimethyl sulfoxide; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GST, glutathion *S*-transferase; MT, metallothioneins; SAGE, serial analysis of gene expression; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin.

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-3-5841-3393. E-mail: koujim@m.u-tokyo.ac.jp.

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, or simply called as “dioxin”) is one of the most toxic environmental pollutants and the representative compound for polycyclic aromatic hydrocarbons. TCDD induces various biological responses; induction of xenobiotics metabolizing enzymes, behavioral abnormalities, teratogenicity, immunotoxicity, thymus atrophy, reproductive disorders, epithelial disorders, wasting syndrome, hepato-toxicity and cancer (1, 2). The risks of exposure to TCDD have provoked concern over their potential toxicity. In a recent re-evaluation of the carcinogenicity of TCDD, the IARC has upgraded the classification from possible human carcinogen (group 2B) to human carcinogen (group 1) (3).

The liver, the largest organ in the body, functions in biosynthesis and metabolism of numerous molecules such as carbohydrates, amino acids, lipids, plasma proteins, drugs and xenobiotics. Animal experiments revealed that lipophilic TCDD accumulates mostly in the liver and to less extent in fat tissue though absorption from intestine. Oral intake of contaminated food is a major source of TCDD (4). Concerning the liver, epidemiologic studies in accidentally exposed populations revealed hepato-toxicity (elevation of serum aminotransferases) (5, 6), and chronic TCDD treatment promoted liver tumor formation in laboratory animals (7, 8). TCDD has also proved to be positive in cell transformation assays in cultured rodent and human cells (9, 10). Although recent studies revealed that TCDD toxicity is mainly mediated by the aryl hydrocarbon receptor (AhR), which is a member of the basic region/helix-loop-helix/Per-AhR-Sim (bHLH-PAS) family and functions as ligand-activated transcriptional factor,