

**COMBINATION THERAPY WITH IFN- $\alpha$  AND 5-FU RESULT IN COMPLETE RESPONSE IN 14 CASES OUT OF 64 WITH ADVANCED HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND PORTAL VEIN INVASION.** *Shuntaro Obi, Shuichiro Shiina, Takuma Teratani, Shinpei Sato, Yukihiro Koike, Masatoshi Akamatu, Tomonori Fujishima, Ryosuke Tateishi, Miho Kanda, Takashi Ishikawa, Haruhiko Yoshida, Takashi Kawabe, Masao Omata, Tokyo University, Tokyo, Japan*

**ACKGROUND:** Hepatocellular carcinoma (HCC) with tumor invasion of the portal vein (PVI) has a poor prognosis. In our previous study, median survival was 3 months, and 1 year survival was 0% in "natural course". This combination therapy was initially proposed by Wadler et al. in 1988, using colon cancer cell lines. Subsequently, several studies indicated certain benefits but others not. This pilot study by IFN- $\alpha$  5FU, we have observed extraordinary beneficial effects in Japanese patients in the advanced hepatocellular carcinoma and portal vein invasion.

**METHODS:** Sixty-four patients with HCC with PVI (main trunk or 1<sup>st</sup> branch) were treated by combination with natural IFN- $\alpha$  (5MU on Days 1,3, and 5 / a week) via i.m. and 5-FU (500 mg for 5 hours on Days 1-5 / a week) via hepatic artery from implanted injection port. In principle, patients were to receive two serial courses of combination and subsequent two serial courses of interferon only. We compared survival of natural course in historical control with survival of this chemotherapy. The objective response was classified according to the ECOG criteria.

**RESULTS:** Fourteen of 64 (22%) patients showed complete response (CR) with disappearance of HCC and portal vein invasion (evaluated by tumor markers, dynamic-

CT scan) after treatment, and the other 20/64 (31%) showed partial response (PR) (response rate [CR + PR/All cases], 53%). The 1 year survival rate was 38% in the patients treated by the combination therapy. It is comparable to 0% in untreated cohort in addition, the 14 patients with complete response showed 80%. Adverse reactions were tolerable nausea and loss of appetite.

**CONCLUSIONS:** This combination therapy achieved marked favorable results and may be useful in treating patients with HCC with Portal vein invasion. We are now in a prospective control trial.

**Disclosures:**

Masatoshi Akamatu - No relationships to disclose  
Tomonori Fujishima - No relationships to disclose  
Takashi Ishikawa - No relationships to disclose  
Miho Kanda - No relationships to disclose  
Takashi Kawabe - No relationships to disclose  
Yukihiro Koike - No relationships to disclose  
Shuntaro Obi - No relationships to disclose  
Masao Omata - No relationships to disclose  
Shinpei Sato - No relationships to disclose  
Shuichiro Shiina - No relationships to disclose  
Ryosuke Tateishi - No relationships to disclose  
Takuma Teratani - No relationships to disclose  
Haruhiko Yoshida - No relationships to disclose

# Relevance Network between Chemosensitivity and Transcriptome in Human Hepatoma Cells<sup>1</sup>

Masaru Moriyama,<sup>2</sup> Yujin Hoshida, Motoyuki Otsuka, Shinichiro Nishimura, Naoya Kato, Tadashi Goto, Hiroyoshi Taniguchi, Yasushi Shiratori, Naohiko Seki, and Masao Omata

Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-8655 [M. M., Y. H., M. O., N. K., T. G., H. T., Y. S., M. O.]; Cellular Informatics Team, Computational Biology Research Center, Tokyo 135-0064 [S. N.]; and Department of Functional Genomics, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670 [N. S.], Japan

## Abstract

Generally, hepatoma is not a chemosensitive tumor, and the mechanism of resistance to anticancer drugs is not fully elucidated. We aimed to comprehensively evaluate the relationship between chemosensitivity and gene expression profile in human hepatoma cells, by using microarray analysis, and analyze the data by constructing relevance networks.

In eight hepatoma cell lines (HLE, HLF, Huh7, Hep3B, PLC/PRF/5, SK-Hep1, Huh6, and HepG2), the baseline expression levels of 2300 genes were measured by cDNA microarray. The concentrations of eight anticancer drugs (nimustine, mitomycin C, cisplatin, carboplatin, doxorubicin, epirubicin, mitoxantrone, and 5-fluorouracil) needed for 50% growth inhibition were examined and used as a measure of chemosensitivity. These data were combined and comprehensive pairwise correlations between gene expression levels and the 50% growth inhibition values were calculated. Significant correlations with significance were used to construct networks of similarity.

Fifty-two relations, including 42 genes, were selected. Among them, nearly 20% were various types of transporters, and most of them negatively correlated with chemosensitivity. Transporter associated with antigen processing 1 was associated with resistance to mitoxantrone, consistent with previous reports. Other transporters were not reported previously to associate with chemosensitivity. Resistance to doxorubicin and its analogue, epirubicin, were positively correlated with

topoisomerase II  $\beta$  expression, whereas it negatively correlated with expression of carboxypeptidases A3 and Z. Response to nimustine was associated with expression of superoxide dismutase 2.

Relevance networks identified several negative correlations between gene expression and resistance, which were missed by hierarchical clustering. Our results suggested the necessity of systematically evaluating the transporting systems that may play a major role in resistance in hepatoma. This may provide useful information to modify anticancer drug action in hepatoma.

## Introduction

Hepatoma is a major cause of death even in developed countries, and its incidence is increasing (1). Despite the progress of therapeutic technique (2), the efficacy of radical therapy is hampered by frequent recurrence and advance of the tumor (3). Although chemotherapy was initially expected to provide a breakthrough for the treatment of advanced hepatoma, the overall results were disappointing (4, 5). We cannot identify the few patients who will respond to chemotherapy, and we do not have clear explanation of the mechanism of resistance to treatment.

The development of hepatoma is a complicated process, associated with numerous genetic factors. Large-scale transcriptional profiling allows us to obtain large amounts of data about complicated biological processes. However, to interpret the result of DNA microarray experiments, we have to extract the biologically significant information from the many changes that are random or not related to the phenomena studied.

Relevance networks offer a method to construct networks of similarity with various type of information, including mutual information and the correlation status (6). In this study, we applied this methodology to provide new information on chemosensitivity in hepatoma.

## Materials and Methods

**Hepatoma Cells.** Eight hepatoma cell lines (HLE, HLF, Huh7, Hep3B, PLC/PRF/5, SK-Hep1, Huh6, and HepG2) were obtained from RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japan). They were maintained using DMEM containing 10% fetal bovine serum.

**Anticancer Drugs.** We tested eight drugs used currently for the treatment of hepatoma in clinical practice: an antimetabolite (5-FU<sup>3</sup>), two platinum anticancer agents (CDDP and

Received 12/2/02; accepted 12/2/02.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> Supported in part by the Health Science Research Grants for Medical Frontier Strategy Research from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan, and by grants-in-aid for scientific research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

<sup>2</sup> To whom requests for reprints should be addressed, at Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan. Phone: 81-3-3815-5411, extension 33056; Fax: 81-3-3814-0021; E-mail: moriyamam-int@h.u-tokyo.ac.jp.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: 5-FU, 5-fluorouracil; ACNU, nimustine; ADM, doxorubicin; CBDCA, carboplatin; CDDP, cisplatin; CA1, carbonic anhydrase 1; CPA3, carboxypeptidase A3; CPZ, carboxypeptidase Z; EpiADM, epirubicin; GI50, 50% growth inhibition activity of the drug; topo, topoisomerase; MIT, mitoxantrone; MMC, mitomycin C; SOD, superoxide dismutases; TAP, transporter associated with antigen processing; TRG, T-cell receptor  $\gamma$  locus; TOP2B, DNA topoisomerase II  $\beta$ .

CBDCA), two alkylating agents (ACNU and MMC), and three (topo) II inhibitors (ADM, EpiADM, and MIT). CDDP, CBDCA, ADM, MMC, MIT, and 5-FU were purchased from Sigma Co. (St. Louis, MO). ACNU was obtained from Sankyo Co. (Tokyo, Japan). EpiADM was obtained from Pharmacia Co. (Peapack, NJ).

**Measurement of Response to Drugs.** The response of each cell line to the anticancer drugs was determined as follows. Briefly, cells were grown in 24-well microplates (IWAKI Glass, Chiba, Japan) and exposed to the drugs for 48 h. Cell growth was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. The drug concentration required to inhibit cell growth by 50% in comparison with untreated controls was designated as the growth inhibition activity of the drug (GI50). Data were averages of three independent experiments.

**RNA Extraction.** Total cellular RNA was extracted using an acid guanidine isothiocyanate phenol-chloroform method according to the manufacturer's instructions (ISOGEN Reagent; Nippon Gene Co., Tokyo, Japan). RNA was treated with RNase-free DNase to remove contaminating genomic DNA, and RNA integrity was confirmed by gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Polyadenylic acid mRNA was obtained using the Oligotex-dT30 mRNA purification kit (TaKaRa Co., Tokyo, Japan).

**cDNA Microarray.** We assessed gene expression using in-house cDNA microarray developed by ourselves in the Helix Research Institute (Chiba, Japan; Ref. 7). A total of 2300 named, sequence-validated human cDNAs (Research Genetics) were spotted onto carbodiimide-coated glass slides using a robot (SPBIO-2000; Hitachi Software Engineering Co., Tokyo, Japan).

Microarray experiments were performed as described previously (8), and for each gene, expression was compared with expression in normal human liver RNA (Clontech, Palo Alto, CA) using the Cy5: Cy3 ratios. To control for labeling differences, reactions were carried out at least in duplicate, and the fluorescent dyes were switched. Each pair of probes was hybridized to a separate microarray. We have confirmed previously the reproducibility of such experiments (7-10).

**Microarray Data Analysis.** Spots were only included if their raw fluorescence intensities were at least 1.5 times the local background. We adjusted raw data of fluorescence ratios (Cy5: Cy3) by log transformation (base 2), median centering, and normalization. Subsequently, we filtered data on various genes for additional analyses. Genes were included if one or more cell lines had fluorescence ratios  $\geq 2.0$  or  $\leq 0.5$ , and maximum minus minimum values of log fluorescent ratios  $\geq 1.0$ .

To ascertain that the range of values of each gene expression ratio was sufficient for subsequent analysis, an entropy value,  $H$ , was calculated using the following formula:

$$H = - \sum_{x=1}^{10} p(x) \log_2(p(x))$$

where  $p(x)$  is the probability that a value was within decile  $x$  of that gene expression ratio. Genes within the lowest 5% of entropy values were removed, to avoid falsely high values in subsequent correlation analyses, because of outliers.

**Relevance Networks.** Using log-transformed expression ratios of selected genes and the GI50 values of the anticancer drugs, similarity metrics,  $R$ , were calculated in a comprehensive pair-wise manner as a square of the Pearson correlation coefficient with original sign (positive or negative). The correlation coefficient,  $r$ , was calculated by the following formula:

$$r = \frac{\sum (x_i - x_{mean})(y_i - y_{mean})}{\sqrt{\sum (x_i - x_{mean})^2 \sum (y_i - y_{mean})^2}}$$

where  $x_i$  represents the log expression ratio ( $\log_2$  Cy5: Cy3) of gene  $x$  in cell line  $i$ , whereas  $y_i$  is the log response ( $\log_{10}$  GI50) to drug  $y$  in cell line  $i$ . To generate a reference distribution of  $R$ , measurements of expression ratios and GI50 values were randomly permuted 100 times, and calculated  $R$ s were recorded. On the basis of these random data, we set threshold values of  $R$  for selection of genes with significance levels of  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ , and  $P < 0.05$ . We considered that for a given pair of genes, a relationship with  $R$  higher than the threshold value may represent a significant biological relationship. We then connected these genes with each other to form clusters or relevance networks of related genes and drugs. For these calculations, we developed custom Perl codes (included in bioperl release 1.2).<sup>4</sup> Finally, the networks were visualized as graphs using a custom JAVA application. The functions of the selected genes were obtained from web-based databases, e.g., the National Center for Biotechnology Information-Locuslink,<sup>5</sup> Gene Ontology,<sup>6</sup> Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,<sup>7</sup> and other linked databases.

## Results

**GI50 Values of Anticancer Drugs.** Table 1 summarizes the GI50 values of eight anticancer drugs in eight hepatoma cell lines. Drugs and their analogues (CDDP and CBDCA; ADM and EpiADM) showed relatively similar ranges and average GI50 values. Mitomycin-C and MIT showed largest and smallest variance, respectively. The entropy values of GI50 measurements range from 1.75 to 2.75, whereas, those of filtered genes range from 1.55 to 3.00 (the 5% percentile is 1.90), suggesting the entropy values of CBDCA, EpiADM, and mitomycin-C were relatively small compared with those of the filtered gene expression ratios.

**Relevance Networks Between Gene Expression Ratios and the GI50 Values.** Among eight anticancer drugs and 42 genes, a total of 53 relations showed  $R$ s above the threshold. Among them, 20 relationships (38%) showed significance at  $P < 0.001$ , and Fig. 1 illustrates these. Detailed properties of selected genes are shown in Table 2. As expected, drugs and their analogues (CDDP and CBDCA; ADM and EpiADM) were connected with each other. Nearly 20% of selected genes were involved in various types of transport and had negative correlation with the GI50 values, whereas ~6% of genes on our

<sup>4</sup> Internet address: <http://www.bioperl.org/>.

<sup>5</sup> Internet address: <http://www.ncbi.nih.gov/>.

<sup>6</sup> Internet address: <http://www.geneontology.org/>.

<sup>7</sup> Internet address: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>.

Table 1 GI50 values of eight anticancer drugs in eight hepatoma cell lines\*

Drug	Mechanism of action	Log <sub>10</sub> GI50 value			H <sup>b</sup>
		Mean	SD	Range	
5-FU	DNA synthesis inhibitor	7.60	2.65	4.65–12.95	2.50
CDDP	Platinum agent (alkylating)	7.39	3.90	3.77–15.57	2.16
CBDCA	Platinum agent (alkylating)	6.33	3.65	3.84–14.90	1.75
ACNU	Alkylating agent	5.00	1.05	3.60–6.30	2.25
MMC	Alkylating agent	8.22	6.77	3.30–24.58	1.75
ADM	topo II inhibitor (anthracycline)	6.32	2.52	3.51–10.52	2.75
EpiADM	topo II inhibitor (anthracycline)	7.41	3.95	3.89–15.97	1.75
MIT	topo II inhibitor (anthracenedione)	4.46	0.89	3.35–6.04	2.75

\* GI50 values are log-transformed (base 10).

<sup>b</sup> H, entropy value of the GI50 values for each drug.

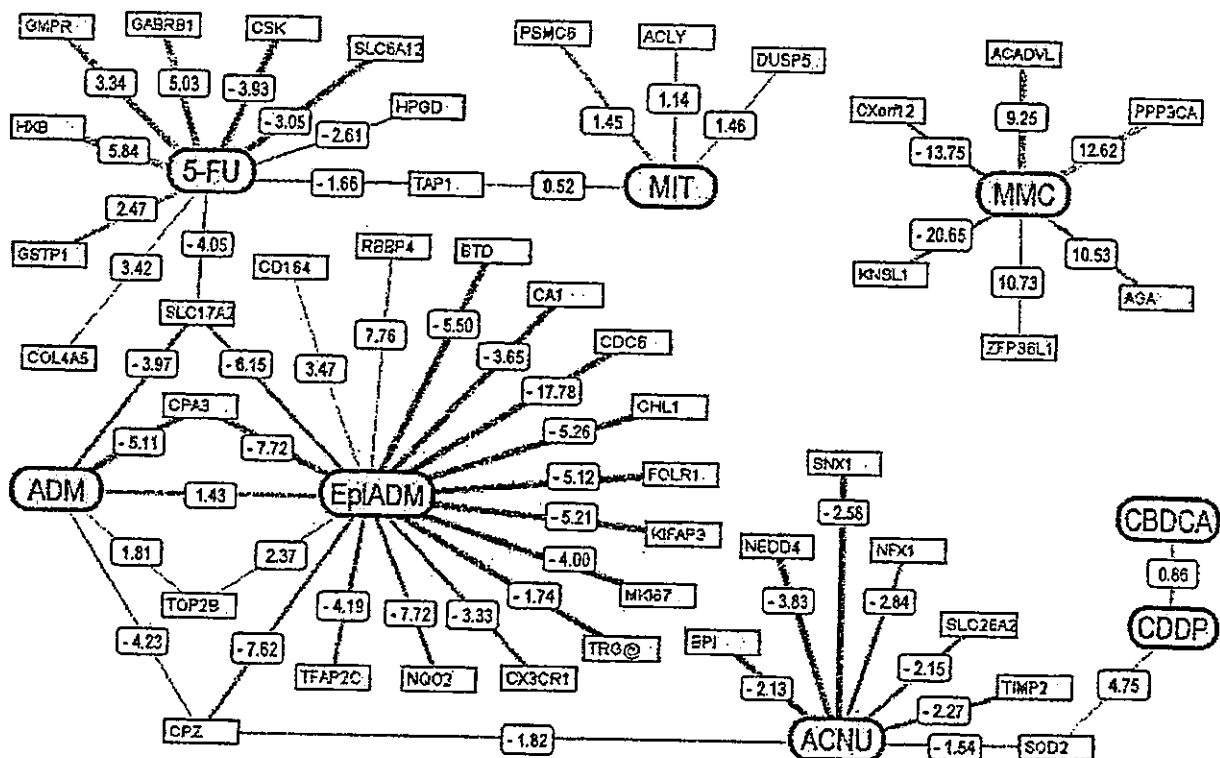


Fig. 1. Relevance network between resistance to anticancer drugs and expression of various genes. Light blue nodes represent anticancer drugs. Yellow nodes represent genes of which the level of expression is significantly associated with resistance (GI50) to anticancer drugs. Red connecting lines indicate positive correlation, and blue connecting lines indicate negative correlation. The thickest lines represent a significance level of  $P < 0.001$ . Intermediate lines represent a significance level of  $P < 0.01$ . Thinnest lines represent a significance level of  $P < 0.05$ . Numbers attached to the connecting lines show the slope of the regression line. For detailed information about the genes shown, see Table 2.

microarray encode transporters. Approximately 10% of selected genes were associated with cell cycle control and cell proliferation.

Several enzymes shared similar response to ADM and EpiADM: *CPA3*, *CPZ*, and *TOP2B* had similar correlation status between the two drugs. *SOD2* was positively correlated with CDDP and negatively correlated with ACNU. *TAP1* was positively correlated with MIT and negatively correlated with 5-FU. *CA1* and *TRG* were negatively correlated with EpiADM.

## Discussion

In cancer, response to anticancer drugs might be determined by a delicate balance of various factors in complicated systems in cells, rather than by just one or a few such factors (11). To understand drug response, applying genome-wide simultaneous analysis is a logical approach. However, elucidating response mechanisms remains challenging. The cancer may be heterogeneous in location and time course for each tumor even in an individual, and its properties may be

Table 2 Genes associated with chemosensitivity

Drug	Symbol	Name	Biological process	Molecular function	Cellular component	Locus	ID <sup>a</sup>
5-FU	COL4A5	Collagen type IV $\alpha 5$	Structure	Collagen	Basement membrane	Xq22	1287
	CSK	C-src tyrosine kinase	Cell cycle, phosphorylation	Tyrosine kinase	Cytoplasm	15q23-q25	1445
	GABRB1	GABA A receptor $\beta 1$	Signaling small molecule transport	GABA-inhibited Cl channel	Membrane	4p12	2560
	GMFR	Guanosine monophosphate reductase	Cold response, nucleic acid metabolism	GMP reductase	—	6p23	2766
	GSTP1	Glutathione S-transferase $\pi$	Detoxification	Glutathione S-transferase	—	11q13	2950
	HPGD	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	Electron transport	Prostaglandin-D synthase	—	4q34-q35	3248
	HXB	Hexabrachion	Adhesion	Ligand binding/carrier	Extracellular matrix	9q33	3371
	SLC6A12	Solute carrier family 6 member 12	Small molecule transport	GABA transporter	Membrane	12p13	6539
	SLC17A2	Solute carrier family 17 member 2	Sodium transport, phosphate metabolism	Sodium phosphate symporter	Membrane	6p21.3	10246
	TAP1	Transporter 1 ATP-binding cassette subfamily B	Defense, peptide transport	ABC transporter	Membrane	6p21.3	6890
	SOD2	Superoxide dismutase 2	Oxidative stress response	Manganese superoxide dismutase	Mitochondrion	6q25.3	6648
	CDDP	BPI	Bactericidal/permeability-increasing protein	Immunity	Gram-negative bacterial binding	Membrane	20q11.23-q12
CPZ		Carboxypeptidase Z	Proteolysis	Metalloprotease	—	4p16.1	8532
NEDD4		Neural precursor cell exp. dev. down-regulated 4	Sodium transport, ubiquitination, transcription	Ubiquitin-protein ligase	Cytoplasm	15q	4734
NFX1		Nuclear transcription factor X-box binding 1	Inflammation, repression of transcription	Transcription factor	Nucleus	9p13.1-p12	4799
SLC26A2		Solute carrier family 26 member 2	Sulfate transport	Sulfate transporter	Membrane	5q31-q34	1836
SNX1		Sorting nexin 1	Endocytosis	Degradation tagging	Membrane	15q22.1	6642
SOD2		Superoxide dismutase 2	Oxidative stress response	Manganese superoxide dismutase	Mitochondrion	6q25.3	6648
TIMP2		Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	Metalloprotease inhibitor	Metalloprotease inhibitor	—	17q25	7077
ACADVL		Acyl-Coenzyme A dehydrogenase very long chain	Energy, fatty acid $\beta$ -oxidation	Long-chain acyl-CoA dehydrogenase	Mitochondrion	17p13-p11	37
AGA		Aspartylglucosaminidase	Deglycosylation	N4-( $\beta$ -N-acetylglucosaminyl)-L-	Lysosome	4q32-q33	175
CXorf12		Chromosome X open reading frame 12	?	—	—	Xq28	8269
ADM		KNSL1	Kinesin-like 1	Mitosis	Microtubule motor	Kinesin, spindle	10q24.1
	PPP3CA	Calcineurin A $\alpha$	Signalling	Phosphatase	—	4q21-q24	5530
	ZFP36L1	Zinc finger protein 36 C3H type-like 1	Growth ?	Transcription factor	Nucleus	14q22-q24	677
	CPA3	Carboxypeptidase A3	Proteolysis	Secretory granule metalloexopeptidase	—	3q21-q25	1359
	CPZ	Carboxypeptidase Z	Proteolysis	Metalloprotease	—	4p16.1	8532
	SLC17A2	Solute carrier family 17 member 2	Sodium transport, phosphate metabolism	Sodium phosphate symporter	Membrane	6p21.3	10246
	TOP2B	Topoisomerase II $\beta$	DNA topology	DNA topoisomerase	Nucleus	3p24	7155

EpiADM	BTD	Biotinidase	Biotin metabolism, differentiation, development	Biotin carboxylase	—	3p25	686
	CA1	Carbonic anhydrase 1	Respiration, acid-base balance, aqueous humor	Carbonate dehydratase	Cytoplasm	8q13-q22.1	759
	CD164	Sialomucin	Adhesion, immunity, proliferation inhibition	Adhesion of CD34+ cells	Membrane	6q21	8763
	CDC6	Cell division cycle 6	DNA replication inhibition, proliferation inhibition	Nucleotide binding	Nucleus, Cytoplasm	17q21.3	990
	CHL1	Cell adhesion molecule (homolog of L1)	Adhesion, signalling	—	Membrane	—	—
	CPA3	Carboxypeptidase A3	Proteolysis	Secretory granule metalloexopeptidase	—	3q21-q25	1359
	CPZ	Carboxypeptidase Z	Proteolysis	Metalloprotease	—	4p16.1	8532
	CX3CR1	Chemokine (C-X3-C) receptor 1	Chemotaxis, defense, adhesion	Chemokine receptor	Membrane	3p21.3	1524
	FOLR1	Folate receptor 1	Folate transport, endocytosis	Tumor antigen, GPI-anchored receptor	Membrane	11q13.3-q14.1	2348
	KIFAP3	Kinesin-associated protein 3	Signalling, chromosome assembly	Linker ?	Endoplasmic reticulum	1q23.2	22920
	MKI67	Antigen identified by Ki-67	Cell cycle, proliferation	—	Nucleus	10q25-qter	4288
	NCO2	NAD(P)H dehydrogenase quinone 2	Electron transport	NADPH dehydrogenase	—	6pter-q12	4835
	RBBP4	Retinoblastoma binding protein 4	Proliferation inhibition	Repressor of transcription	Nucleus	1p34.3	5928
	SLC17A2	Solute carrier family 17 member 2	Sodium transport, phosphate metabolism	Sodium phosphate symporter	Membrane	6p21.3	10246
	TFAP2C	Transcription factor AP-2 $\gamma$	Oncogenesis, signalling, transcription	Transcription factor	—	20q13.2	7022
	TOP2B	Topoisomerase II $\beta$	DNA topology	DNA topoisomerase	Nucleus	3p24	7155
MIT	TRC@	T-cell receptor $\gamma$ locus	Immunity	T-cell receptor	—	7p15-p14	6965
	ACLY	ATP citrate lyase	ATP, citrate, CoA metabolism	ATP-citrate (pro-S)-lyase	Citrate lyase	17q12-q21	47
	DUSP5	Dual specificity phosphatase 5	Heat shock response	Protein tyrosine phosphatase	—	10q25	1847
	PSMC6	Proteasome 26S subunit ATPase 6	Proteolysis	Proteasome ATPase	26S proteasome	12q15	5706
	TAP1	Transporter 1 ATP-binding cassette sub-family B	Defense, peptide transport	ABC transporter	Membrane	6p21.3	6890

\* ID indicates the National Center for Biotechnology Information LocusLink ID.

organ-specific. Aiming to get new insights into such a complicated mechanism, we used a relevance network of similarity based on DNA microarray data to study hepatoma.

Previous microarray research on this disease showed that some growth factors and detoxification-related genes might be associated with its cancer development (12–18). In comparison, our current study suggested that low levels of expression of specific intra- and intercellular transporters might be associated with its resistance to drugs. Most of the transporters showed negative correlation with the GI50 values, and these correlations were not identified by hierarchical clustering. The gene expression profiles of these transport systems may be an efficient and practical way to understand chemosensitivity, because most of the genes code for membrane proteins, and it is difficult to analyze their function individually (in fact, none of them is included in the Protein Data Bank entry).

Our analysis also picked up several genes reported previously to be associated with response to anticancer drugs. *TOP2B* was associated with resistance to two anthracyclines, ADM and EpiADM. The  $\alpha$  isoform of *TOP2* is a target for anthracycline and anthracenedione, and its transcription was positively correlated with resistance to topo II inhibitors. The association between *TOP2B* expression and the resistance of cancers to topo II inhibitors correlated positively with susceptibility to topo II inhibitors, whereas the association between *TOP2B* expression and the resistance to cancers to topo II inhibitors varies among different organs and different drugs (11). In our experiments, *TOP2B* expression was positively correlated with resistance to ADM and EpiADM.

Expression of two carboxypeptidases, *CPA3* and *CPZ*, was negatively correlated with resistance to ADM and EpiADM. A previous study showed that carboxypeptidase G2, an enzyme that hydrolyzes the COOH-terminal glutamate residue, improves response to another anticancer drug, methotrexate (19). It may be possible that in hepatoma, *CPA3* and *CPZ* could decrease resistance to ADM and EpiADM.

*CA7*, which was reportedly associated with colon cancer development (20), showed negative correlation with resistance to EpiADM. *TRG* also showed negative correlation with resistance to EpiADM. This is consistent with prior reports that polymorphisms in *TRG* are associated with early onset colorectal cancer (21).

Superoxide, a toxic free radical, reportedly plays an important role in anticancer effects of anthracycline (11). *SOD2* inactivates this free radical, but in this study its expression was not associated with resistance to the anthracycline derivatives tested. On the other hand, *SOD2* expression is negatively correlated with resistance to nitrosourea in various cancer cells (22). Our data also indicated a negative correlation between *SOD2* expression and resistance to ACNU, also a nitrosourea.

*TAP1*, a member of multidrug resistance family, is associated with resistance to MIT (23). Consistent with this, we found that *TAP1* expression showed a specific positive correlation with MIT GI50.

Cluster analysis does not always provide a complete interpretation of microarray data, and the application of more

than one analysis technique can illuminate different relationships (24). Relevance network analysis can capture negative correlations that are missed in hierarchical clustering and simultaneously display them with positive correlations. On the other hand, relevance network analysis has several limitations. First, large-scale networks may not be detected if individual links are weak, because during analysis all of the links that are subthreshold are discarded. Second, the analysis may not necessarily assign equal statistical weight to all of the observations. Variances of measurements are inhomogeneous; that is, there may be very little variation in most of the samples and great variation in only a few of the samples, and the analysis may give greater weight to the latter. Third, this is not a globally optimal network. Fourth, comprehensive pair-wise calculation of the dissimilarity measure requires extensive computing resources (25).

In summary, our results highlighted the importance of various types of transporters that may affect chemosensitivity in hepatoma. However, most of them are ubiquitous molecules, and, thus, a study of these alone will not allow us to understand whole mechanism of chemosensitivity. Establishment of systems biology models, e.g., focused on transport systems rather than one or two individual transporters, will help to understand anticancer drug action in hepatoma (26).

## References

1. El-Serag, H. B., and Mason, A. C. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 340: 745–750, 1999.
2. Shiina, S., Teratani, T., Obi, S., Hamamura, K., Koike, Y., and Omata, M. Nonsurgical treatment of hepatocellular carcinoma: from percutaneous ethanol injection therapy and percutaneous microwave coagulation therapy to radiofrequency ablation. *Oncology*, 62: 64–68, 2001.
3. Llovet, J. M., Bustamante, J., Castells, A., Vilana, R., Ayuso, M. del C., Sala, M., Bru, C., Rodes, J., and Bruix, J. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology*, 29: 62–67, 1999.
4. Simonetti, R. G., Liberati, A., Angiolini, C., and Pagliaro, L. Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. *Ann. Oncol.*, 8: 117–136, 1997.
5. Chan, E. S-Y., Chow, P. K-H., Tai, B-C., Machin, D., and Soo, K-C. Neoadjuvant and adjuvant therapy for operable hepatocellular carcinoma (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 1, Oxford: Update Software, 2001.
6. Butte, A. J., Tamayo, P., Slonim, D., Golub, T. R., and Kohane, I. S. Discovering functional relationships between RNA expression and chemotherapeutic susceptibility using relevance networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 12182–12186, 2000.
7. Maeda, S., Otsuka, M., Hirata, Y., Mitsuno, Y., Yoshida, H., Shiratori, Y., Masuho, Y., Muramatsu, M., Seki, N., and Omata, M. cDNA microarray analysis of *Helicobacter pylori*-mediated alteration of gene expression in gastric cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284: 443–449, 2001.
8. Yoshikawa, T., Nagasugi, Y., Azuma, T., Kato, M., Sugano, S., Hashimoto, K., Masuho, Y., Muramatsu, M., and Seki, N. Isolation of novel mouse genes differentially expressed in brain using cDNA microarray. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275: 532–537, 2000.
9. Azuma, T., Takei, M., Yoshikawa, T., Nagasugi, Y., Kato, M., Otsuka, M., Shiraiwa, H., Sugano, S., Mitamura, K., Sawada, S., et al. Identification of candidate genes for Sjogren's syndrome using MRL/lpr mouse model of Sjogren's syndrome and cDNA microarray analysis. *Immunol. Lett.*, 81: 171–176, 2002.
10. Otsuka, M., Kato, M., Yoshikawa, T., Chen, H., Brown, E. J., Masuho, Y., Omata, M., and Seki, N. Differential expression of the L-plastin gene in

- human colorectal cancer progression and metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289: 876-881, 2001.
11. Tannock, I. F., and Goldenberg, G. G. Drug resistance and experimental chemotherapy. In: I. F. Tannock and R. P. (eds.), *The Basic Science of Oncology*, 3<sup>rd</sup> Ed., pp. 392-419. New York: McGraw-Hill, 1998.
  12. Feitelson, M. A., Sun, B., Tufan, N. L. S., Liu, J., Pan, J., and Lian, Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene*, 21: 2593-2604, 2002.
  13. Delpuech, O., Trabut, J. B., Carnot, F., Feuillard, J., Brechot, C., and Kremsdorf, D. Identification, using cDNA microarray analysis, of distinct gene expression profiles associated with pathological and virological features of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 21: 2926-2937, 2002.
  14. Xu, X. R., Huang, J., Xu, Z. G., Qian, B. Z., Zhu, Z. D., Yan, Q., Cai, T., Zhang, X., Xiao, H. S., Qu, J., Liu, F., Huang, Q. H., Cheng, Z. H., Li, N. G., Du, J. J., Hu, W., Shen, K. T., Lu, G., Fu, G., Zhong, M., Xu, S. H., Gu, W. Y., Huang, W., Zhao, X. T., Hu, G. X., Gu, J. R., Chen, Z., and Han, Z. G. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding non-cancerous liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 15089-15094, 2001.
  15. Chen, X., Cheung, S. T., So, S., Fan, S. T., Barry, C., Higgins, J., Lai, K. M., Ji, J., Dudoit, S., Ng, I. O. L., Rijn, M., Botstein, D., and Brown, P. O. Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol. Biol. Cell.*, 13: 1929-1939, 2002.
  16. Shirota, Y., Kaneko, S., Honda, M., Kawai, H., and Kobayashi, K. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology*, 33: 832-840, 2001.
  17. Lee, J. S., and Thorgeirsson, S. S. Functional and genomic implications of global gene expression profiles in cell lines from human hepatocellular cancer. *Hepatology*, 35: 1134-1143, 2002.
  18. Zembutsu, H., Ohnishi, Y., Tsunoda, T., Furukawa, Y., Katagiri, T., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Nomura, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Hirata, K., and Nakamura, Y. Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs. *Cancer Res.*, 62: 518-527, 2002.
  19. Marais, R., Spooner, R. A., Light, Y., Martin, J., and Springer, C. J. Gene-directed enzyme prodrug therapy with a mustard prodrug/carboxypeptidase G<sub>2</sub> combination. *Cancer Res.*, 56: 4735-4742, 1996.
  20. Sowden, J., Leigh, S., Talbot, I., Delhanty, J., and Edwards, Y. Expression from the proximal promoter of the carbonic anhydrase 1 gene as a marker for differentiation in colon epithelia. *Differentiation*, 53: 67-74, 1993.
  21. Uthoff, S. M., Hunt, L. E., Grant, B. S., Young, V. V., Eichenberger, M. R., Cobbs, G. A., and Galandiuk, S. T-cell receptor  $\gamma$ : a microsatellite marker for colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 9: 88-93, 2002.
  22. Oberley, L. W. Anticancer therapy by overexpression of superoxide dismutase. *Antioxid. Redox. Signal.*, 3: 461-472, 2001.
  23. Lage, H., Perltz, C., Abele, R., Tampe, R., Dietel, M., Schadendorf, D., and Sinha, P. Enhanced expression of human ABC-transporter tap is associated with cellular resistance to mitoxantrone. *FEBS Lett.*, 503: 179-184, 2001.
  24. Quackenbush, J. Computational analysis of microarray data. *Nat. Rev. Genet.*, 2: 418-427, 2001.
  25. Kohane, I. S., Kho, A. T., and Butte, A. J. Genomic data-mining techniques. In: *Microarrays for an integrative genomics*. The MIT Press, 149-214, 2002.
  26. Kitano, H. Systems biology: a brief overview. *Science (Wash. DC)*, 295: 1662-1664, 2002.



# 実験 肝臓

## マイクロアレイの使い方

### 肝癌細胞における 抗癌剤感受性に関連する 遺伝子の解析

肝癌細胞株を用いて、抗癌剤感受性に強い関連を有する遺伝子群の抽出、および遺伝子発現プロファイルによる投与前の抗癌剤感受性予測の可能性を検討した。細胞株8種、抗癌剤8種を用いてMTTアッセイにて50%増殖抑制濃度(GI50)を求め、投与前の細胞からmRNAを抽出しin-house cDNAマイクロアレイで遺伝子発現比を測定した。遺伝子発現比とGI50からPearsonの相関係数を算出、各薬剤について感受性に強い相関を示す遺伝子を抽出した。抗癌剤感受性群、非感受性群間で有意に発現差のみられる遺伝子を種々のアルゴリズムを用いて抽出、LOOCVで比較し、最も予測能の高い遺伝子セットを用いて階層クラスターを行うと2群は明瞭に分類された。遺伝子発現比とGI50のすべての組み合わせから有意な相関を抽出し、JAVAアプリケーションで相関ネットワークを描出した。癌化学療法のトランスレーショナルリサーチにおいて、マイクロアレイの活用は今後ますます重要になると考えられる。

はじめに

近年、cDNAマイクロアレイという新しいテクノロジーが導入、利用されてきている。この方法の最大の特徴は、多数の遺伝子の発現状況を一度に、同時に解析できるという「網羅性」にあると言える。したがって、複数の遺伝子異常を背景とする悪性腫瘍の研究においては非常にパワフルなツールとなり得る。

わが国において悪性腫瘍による死亡は増加の一途をたどっており、なかでも、肝癌は胃癌、肺癌につぐ第3位の位置を占めており<sup>1)</sup>、世界的に見ても増加傾向にある<sup>2)</sup>。ラジオ波焼灼療法を中心とする根治的局所療法<sup>3)</sup>の進歩がある一方で、高率な再発という問題が常に存在するため、経過の最終段階においては局所治療ではコントロール不能となり、動注、あるいは全身化学療法が選択されることも多い。肝癌に対する化学療法は、ほかの消化器癌に比し、効果が乏しい傾向にある。その

東京大学大学院医学系研究科消化器内科  
森山 優

同 消化器内科  
星田有人

同 消化器内科  
大塚基之

同 消化器内科助手  
加藤直也

千葉大学大学院医学研究院機能ゲノム学助教授  
関 直彦

東京大学大学院医学系研究科消化器内科教授  
小俣政男

ようななかで、ごく少数ではあるが化学療法が奏効する例も経験される。しかし、何故その症例が奏効するのかという理由、機序は不明であり、われわれは事前に奏効する症例を予測する術をもちあわせていないため、抗癌剤を実際に投与してみなければ効果があるか否かを見分けることができないのが実情である。

そこでわれわれは、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルと、悪性腫瘍の化学療法に対する感受性とを関連づけ、感受性を規定する因子の同定、あるいは感受性の予測に応用できないかと考えた。まず手はじめに、肝癌培養細胞株を用いて、抗癌剤感受性に強い関連を有する遺伝子群の抽出、および、遺伝子発現プロファイルから投与前に抗癌剤感受性を予測し得る可

能性につき検討したので、その一端を本稿で紹介させていただくこととする。

## 1 方法

1. 培養細胞株の抗癌剤感受性の測定  
今回使用した肝癌培養細胞株は、Huh7, Hep3B, PLC/PRF5(Alexander), HLE, HLF, SK-Hep1の6つの肝細胞癌と、HepG2, Huh6の2つの肝芽腫、計8種である。抗癌剤は、わが国において肝癌に保険適応のあるもの、日常臨床に使用されているものという観点から、シスプラチン(CDDP)、カルボプラチン(CBDCA)、ニムスチン(ACNU)の3種のアルキル化薬、ドキシソルピシン(ADM)、エピルピシン(EpiADM)、マイトマイ

シンC(MMC)、ミトキサントロン(MIT)の4種の抗生物質、および代謝拮抗剤5-FUの計8種を選択した。

抗癌剤感受性の測定、数値化は、米国立癌研究所のNCI60にならいい、MTTアッセイを用いて行った。各細胞株を事前に一定数でプレートに撒き抗癌剤添加48時間後に細胞を回収、MTT試薬を添加し吸光度を測定した測定値から、抗癌剤無添加の細胞に対する50%増殖抑制濃度(GI50)を各薬剤につき求め、抗癌剤感受性の指標とした(図1)。

2. cDNAマイクロアレイによる遺伝子発現比の測定

われわれが今回用いたのは、Research Genetics社から購入した2,280個の既知遺伝子をスポットした

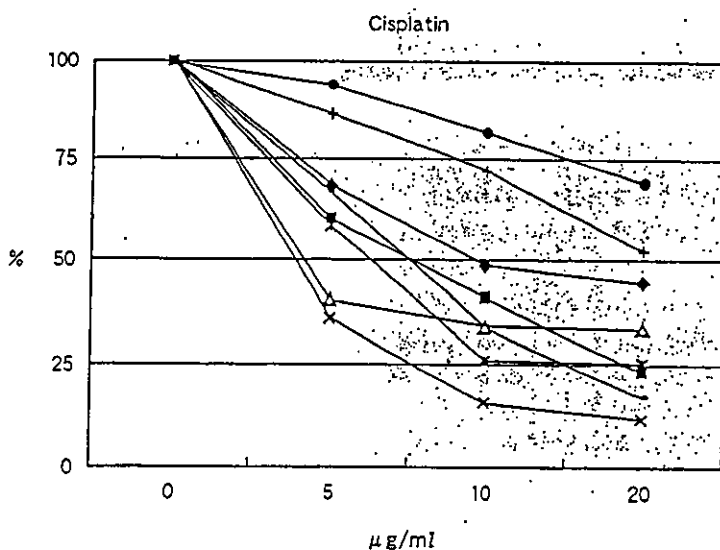


図1 MTTアッセイによる抗癌剤感受性の測定—シスプラチンの例

◆ : HLE  
■ : HLF  
△ : Huh7  
× : Hep3B  
\* : HepG2  
● : Alex  
+ : SKHep1  
— : Huh6

# 肝癌細胞における抗癌剤感受性に関連する遺伝子の解析

in-house cDNA マイクロアレイである。実験の詳細については本稿の読者にはすでになじみ深いものと思われるのでここでは割愛する<sup>9)</sup>。われわれは、抗癌剤添加前の mRNA を抽出して発現解析に用いたが、これは抗癌剤投与前の感受性の予測を念頭に置いたためである。階層クラスタリングには Eisen らの Cluster, TreeView を用いた<sup>9)</sup>。

### 3. 抗癌剤感受性と相関を示す遺伝子の抽出

8種の細胞株において遺伝子発現比と各薬剤に対する GI 50 とから、遺伝子、抗癌剤間の Pearson 相関係数を算出し、絶対値の大きいものから並べ直した。上位の遺伝子は、各薬剤における GI 50 と強い相関を有すると考えられる。

### 4. 感受性予測のための遺伝子の抽出

各抗癌剤において8細胞株を GI 50 に基づき便宜的に GI 50 低値群、高値群(それぞれ感受性群、非感受性群とみなす)の2群に分け、両群間で有意に発現差が認められる遺伝子を抽出した。cDNA マイクロアレイのデータは定量的に問題があるため、抽出のためのアルゴリズムとして細胞名のランダム入替(10,000回)をベースにした以下に示す数種の方法を用いた。t-検定<sup>7)</sup>、順位和検定<sup>8)</sup>、発現比を上昇、低下、不変の3カテゴリーに分ける方法<sup>10)</sup>、判別スコアを用いる方法<sup>11,12)</sup>である。それぞれの方法の予測の正診率およびその有意性を leave-one-out cross validation (LOOCV) を用いて

計算、比較し、最も予測能が高い遺伝子セットを採用した<sup>9)</sup>。これらの解析に用いた Perl code は Bioperl project (<http://www.bioperl.org>) に投稿しており、Bioperl release 1.0 に収載されている。

### 5. 相関ネットワークの描出

遺伝子発現比と GI 50 間の総あたり 737,000 通りの組み合わせにおいて Pearson の相関係数を計算し、遺伝子および薬剤名のランダム入替(100通り)に基づき算出した閾値より高い相関を有意な相関とした<sup>13)</sup>。これらのデータを用い、われわれが開発した JAVA アプリケーションを用いて遺伝子、抗癌剤間の相関ネットワークを描出した<sup>14)</sup>。

## 2 結果

### 1. 抗癌剤感受性と相関を示す遺伝子群

8種の抗癌剤それぞれについて、感受性に強い相関を示す遺伝子の上位を例として表1に示す。この結果を概観すると、

- ① 同系統の薬剤(ドキシソルビシンとその誘導体であるエビルビシン、シスプラチンとその誘導体であるカルボプラチン)において、同じ遺伝子を選ばれる傾向がある
- ② 同一の遺伝子が、ある薬剤については正の相関、別の薬剤に対しては負の相関と、正反対の挙動を示すことがある

などのことがみえてくる。

### 2. 感受性予測のための遺伝子の抽出

LOOCV にて最も高い正診率を示した遺伝子セットによる階層クラスタの1例を図2に示す。5-FU に対して感受性の高い細胞株(Hep 3 B, SK-Hep 1, Hep G 2, HLE)と感受性の低い細胞株(Huh7, Huh6, HLF, Alexander)が2つのクラスターに明瞭に分けられている。これを主成分分析<sup>15)</sup>を用いて3次元表示すると、感受性群の4つの細胞株が互いに近接して描出される(図3)。

### 3. 相関ネットワークの描出

遺伝子発現間の相関ネットワークの一部を図4に示す。今回は示していないが、遺伝子と抗癌剤間の相関も複数ピックアップされた。これらの手法は未知の相関のスクリーニングとして有用と考えられる。また、単なる相関のみならず、遺伝子発現制御のネットワーク解析もすでに確立された研究分野としてバイオインフォマティクスの重要な柱となっている<sup>16)</sup>

おわりに

cDNA マイクロアレイのデータを利用した、抗癌剤感受性に関連する遺伝子の解析法につき概説した。最近では市販のマイクロアレイも簡単に入手することが可能であり、発現データ自体を手にするのは容易になってきている。マイクロアレイのデータは「宝の山」であるが、その膨大なデータの適切な解析が不可欠であることは言うまでもない。マイクロアレイデータの定量的改善の試みも着実に進められており<sup>17-19)</sup>、アレイデータ解析(アレイ

表1 抗癌剤感受性に相関を示す遺伝子群の例

	Gene	Pearson correlation coefficient
5-FU	Glutathione S-transferase pi-1	0.915
	Acetylcholinesterase precursor	0.825
	Smad 5	0.824
	Interleukin 6	0.824
	Transforming growth factor $\beta$	0.805
	Interleukin 1 receptor	0.767
	Annexin 4	0.757
cisplatin	Cytochrome c oxidase	0.891
	Transforming growth factor $\beta$	-0.821
	Crystallin zeta	0.654
	Interleukin 8	0.629
	Insulin-like growth factor receptor	-0.601
	NEDD 4	0.568
carboplatin	Cytochrome c oxidase	0.797
	Crystallin zeta	0.779
	Interleukin 8	0.752
	Interleukin 15	0.697
	Transforming growth factor $\beta$	-0.587
	Apaf-1	0.563
doxorubicin	Carboxypeptidase A 3	-0.962
	Biotinidase	-0.879
	Carbonic anhydrase	-0.832
	Annexin 8	-0.745
	NEDD 4	-0.716
	AFP	0.654
epirubicin	Biotinidase	-0.984
	Carbonic anhydrase	-0.945
	Carboxypeptidase A 3	-0.928
	Annexin 8	0.896
	MAP kinase	-0.866
	Glutathione S-transferase pi-1	0.761
mitoxantrone	Cytochrome p 450	-0.773
	p 53	-0.768
	Apaf-1	0.758
	P-glycoprotein	-0.721
	Retinoic acid receptor	-0.692
mitomycin C	Cystein protease	-0.908
	ERF-1	0.821
	Glutathione S-transferase M 4	0.807
	YSK-1	0.786
	Dystrobrevin zeta	-0.774
nimustine	NEDD 4	-0.941
	AFP	0.821
	Biotinidase	-0.812
	MAP kinase	-0.779
	p 53	-0.774
	Annexin 8	-0.766

# 肝癌細胞における抗癌剤感受性に関連する遺伝子の解析

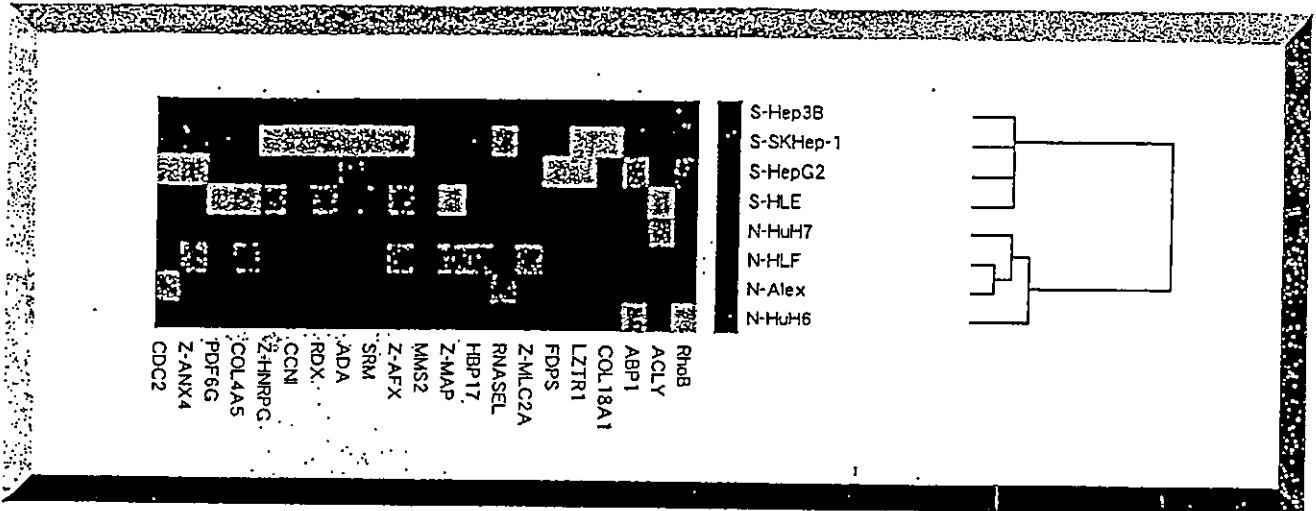


図2 予測遺伝子セットでの階層クラスターによる抗癌剤感受性の分類—5 FU の例

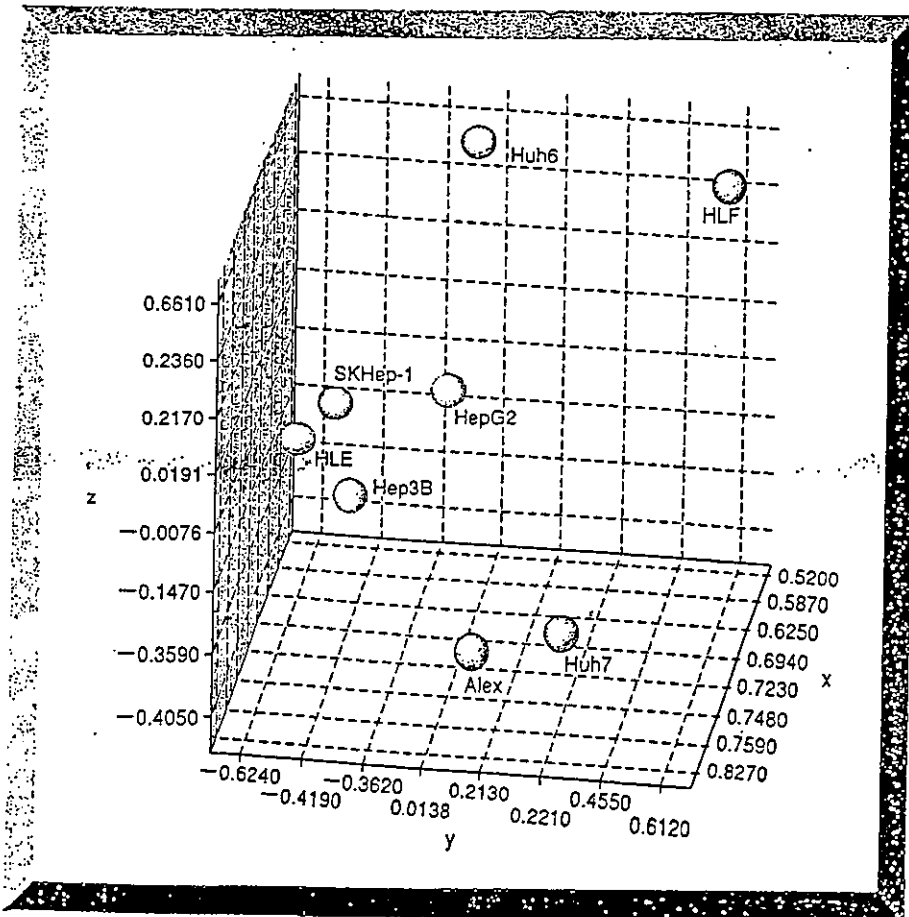


図3 抗癌剤感受性分類の主成分分析による3次元表示

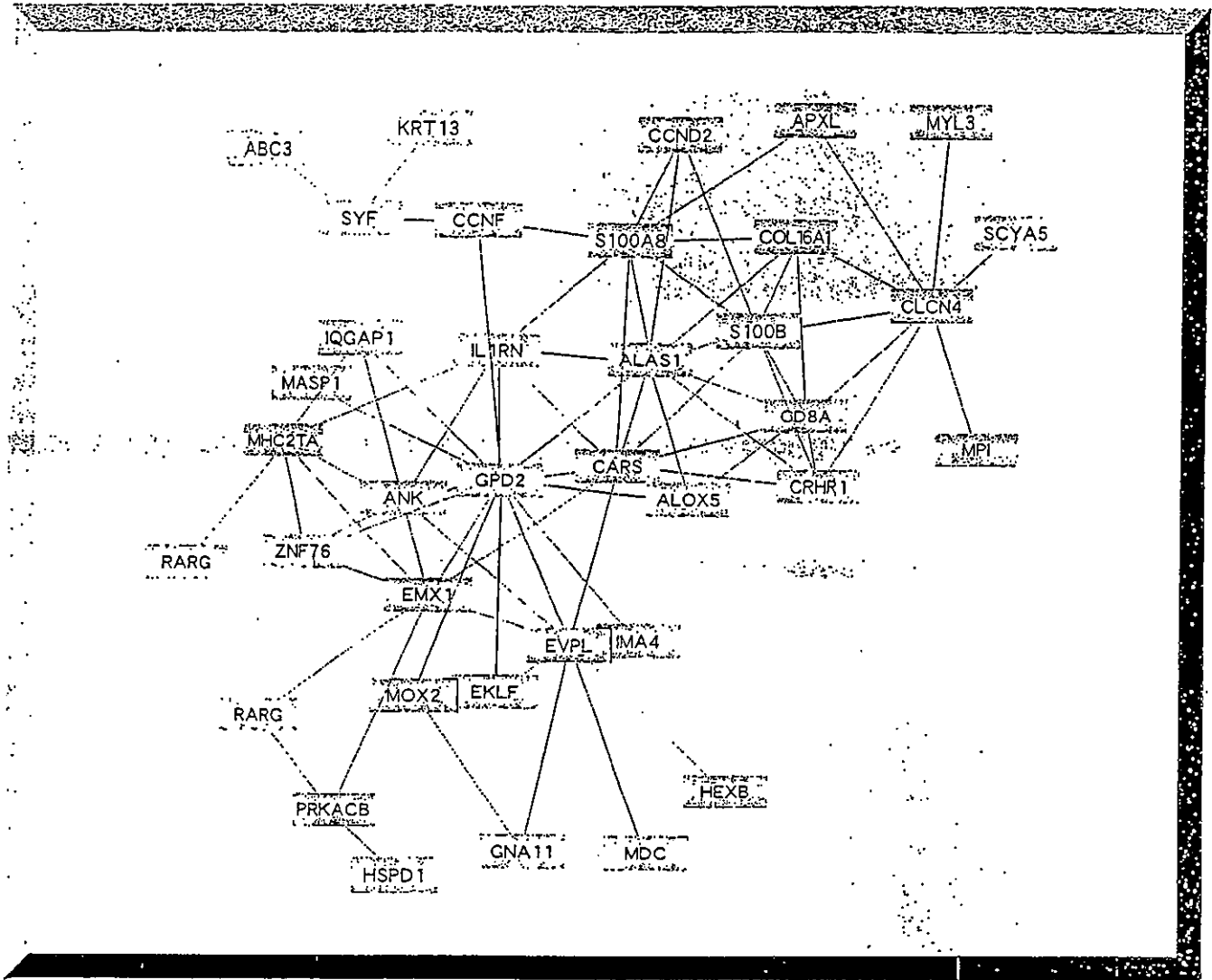


図4 遺伝子発現間の相関ネットワークの例

ンフォーマティクス)は、分子生物学の重要な一分野として今後さらに洗練されていくものと考えられる。

今回、肝癌細胞株を用いたひとつのモデルケースを提示したが、将来的には臨床応用を視野に入れた検討を進めている。このような方法論により得られた実験データに、さらに臨床データ

を合わせて解析した情報を臨床の現場へ還元していくという、癌化学療法におけるトランスレーショナルリサーチが現実的に可能になりつつある。これらは、個々の患者の多様性に対応するパーソナライズな医療の発展を強力に推進するものと考えられる。

\*

謝辞

相関ネットワーク描出のためのアプリケーション作製にあたり、生命情報科学研究センター、西村信一郎氏に多大なご協力を頂きました。この場をお借りして深謝致します。

# 肝癌細胞における抗癌剤感受性に関連する遺伝子の解析

## References

- 1) 清澤研道:日本の肝がんの特徴. 肝がん白書. 日本肝臓学会 編, 東京, 1999, pp.5-8
- 2) El-Serag HB, Manson AC: Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 340: 745-750, 1999
- 3) 椎名秀一朗:肝細胞癌の経皮的局所療法. 日本消化器病学会雑誌 98: 809-813, 2001
- 4) Scherf U, Ros DT, Waltham M et al: A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 24: 236-244, 2000
- 5) Yoshikawa T, Nagasui Y, Azuma T et al: Isolation of novel mouse genes differentially expressed in brain using cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 532-537, 2000
- 6) 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
- 7) Radmacher MD, McShane LM, Simon R: A paradigm for class prediction using gene expression profiles, Technical report 001, National Cancer Institute, July 1, 2001
- 8) Hoshida Y, Moriyama M, Otsuka M et al: Improvement of chemosensitivity prediction by transcriptional profiling in hepatoma cells. *Genome Informatics* 12: 257-258, 2001
- 9) Hoshida Y, Moriyama M, Otsuka M et al: Identification of genes associated with sensitivity to 5-fluorouracil and cisplatin in hepatoma cells. *J Gastroenterol* (in press)
- 10) Ono K, Tanaka T, Tsunoda T et al: Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 60: 5007-5011, 2000
- 11) Ben-Dor A, Bruhn L, Friedman N et al: Tissue classification with gene expression profiles. *J Comput Biol* 7: 559-583, 2000
- 12) 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
- 13) Butte AJ, Tamayo P, Slonim D et al: Discovering functional relationships between RNA expression and chemotherapeutic susceptibility using relevance network. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12182-12186, 2000
- 14) Hoshida Y, Moriyama M, Otsuka M et al: Relevance network between transcriptome and chemosensitivity in hepatoma cells. Proceeding of 6th Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology (RECOMB 2002), Washington DC, April 18-21, 2002
- 15) Duda RO, Hart PE, Stork DG: Pattern Classification. Wiley-Interscience, New York, 2001, pp. 573-581
- 16) Maki Y, Tominaga D, Okamoto M et al: Development of a system for the inference of large scale genetic networks. *Pac Symp Biocomput* 446-458, 2001
- 17) Li F, Stormo GD: Selection of optimal DNA oligos for gene expression arrays. *Bioinformatics* 17: 1067-1076, 2001
- 18) Nishida N, Wakui M, Tokunaga K: Highly specific and quantitative gene expression profiling based on DNA computing. *Genome Informatics* 12: 259-260, 2001
- 19) Takenaka S, Yamashita K, Takagi M et al: DNA sensing on a DNA probe-modified electrode using ferrocenylnaphthalene diimide as the electrochemically active ligand. *Anal Chem* 72: 1334-1341, 2000

## 阪大病院におけるTAEの現況

大阪大学大学院医学系研究科 医用制御工学講座画像応用治療分野

大須賀慶悟, 村上卓道, 友田 要, 金 東石, 堀 雅敏, 中田早紀, 三上恒治, 東原大樹, 桑原雅知, 大西裕満, 安部久志, Azzam Khankan, 中村仁信

### 【はじめに】

大阪大学医学部附属病院(以下, 当院)における肝細胞癌(HCC)に対するTAEの現況について述べる。当院では, 消化器内科・消化器外科・放射線科が, 2週間毎にカンファレンスを行い, 各症例毎に肝切除・経皮的アブレーション・肝動脈塞栓療法(TAE)・動注化学療法など治療方針を検討し, 患者へのインフォームド・コンセントにより最終決定している。当院では, DDW-Japan 2003で提唱された4つの推奨指針, すなわち, ①リピオドールと抗癌剤の混合物を注入後, ゼラチン・スポンジ細片で塞栓するのが抗腫瘍効果の点から望ましい, ②単発・多発を問わず亜区域・区域動脈レベルから塞栓を行うことが抗腫瘍効果向上と合併症軽減の点から推奨される, ③動脈血流に乏しい肝細胞癌にはTACEを行うべきではない, ④小肝癌のTAE後の局所再発率は高率なので手術や経皮的局所療法で全腫瘍が治療可能な場合は第一選択とはならない, に沿ってTAEを実践している<sup>1)</sup>。従って, TAEの適応は, ①多血性HCC, ②根治的手術やアブレーションの適応がない, ③肝機能が保たれる(Child分類A・B), そして④門脈高度浸潤(Vp3/4)を認めないことである。原則として, TAEは単回治療とし, 再発・残存など必要時に繰り返す。その他, 5cm以上の大型HCCに対する手術待機中の術前TAEや, 3cm前後のHCCにおけるアブレーション前のTAEなども行う場合がある。

以下, 当院におけるTAEの方法, 最近の集計結果, および成績について概説する。

### 【TAEの方法】

可能な限りangio-CT装置によるCT during arteriography (CTAP) およびCT hepatic arteriography (CTHA)により, 門脈血流, 腫瘍の局在・血行動態, 肝内転移などを評価している。抗癌剤は, 塩酸エピルピシン10mgに対してリピオドール1~1.2mlの割合で混合したwater-in-oil状態の懸濁液を用い, 懸濁液の量は腫瘍径や血流多寡により調節している。抗腫瘍効果の点では, 懸濁液が腫瘍内および周囲門脈枝に強く貯留することが望ましいが, 非癌部肝実質への影響も考慮した加減が必要である。塞栓物質は, ゼラチン・スポンジ細片(約1mm)を造影剤に浸した浮遊液を用いている。小型・少数個のHCCでは, 個々の病変に対してマイクロカテーテルを用いて区域・亜区域レベルでの選択的TAEを行い, 一方, 大型・多発HCCでは, 片葉毎に分割してTAEを行ったり, 過量の抗癌剤・リピオドールを避

けるため, ゼラチン・スポンジ細片や独自の高吸水性ポリマーなど塞栓物質単独によるTAEを考慮している<sup>2)</sup>。

### 【最近の集計】

Fig.1に当院過去3年間(2001~2003年)のHCC治療の内訳(n=1269)を示す。TAEが約43%と最多を占めており, そのうち93%がリピオドール・抗癌剤懸濁液を用いたTAE(Lp-TAE)であった。即ちLp-TAEは切除不能あるいは再発HCC治療における中心的な役割を果たしている。

特に2003年TAE施行204例の内訳を詳しく見る。宿主因子として, 男性157例・女性47例, 年齢36~84歳(平均67歳)で, 肝予備能はChild分類A 146例(72%)・B 57例(27%)・C 1例(1%)と良好例が多数を占めた。背景肝疾患は, HCV陽性145例(71%)・HBV陽性36例(18%)・両者陽性3例(1%)・両者陰性18例(9%)・自己免疫性2例(1%)であった。また初発 52例(25%)・再発152例(75%)と再発例が多数を占め, そのうち切除後再発が39例(19%)であった。腫瘍因子として, T因子は, T1 26例(13%)・T2 95例(46%)・T3 75例(37%)・T4 8例(4%)で, T2あるいはT3が8割以上を占めた。Vp因子は, Vp0 193例(96%), Vp1 3例(1%), Vp2 4例(2%) Vp3/4 4例(2%)で, 概ね門脈浸潤例は除外されている。IM因子は, IM0 59例(29%)・IMs 4例(2%)・IM1 21例(10%)・IM2 44例(22%)・IM3 76例(37%)で, IM3のいわゆる両葉多発HCCが4割弱を占める一方, 腫瘍個数は, 1個58例(28%)・2個39例(19%)・3個22例(11%)・4個10例(5%)・5個4例(2%)・6個以上71例(35%)で, 3個以下の少数個例も6割近くを占めている。

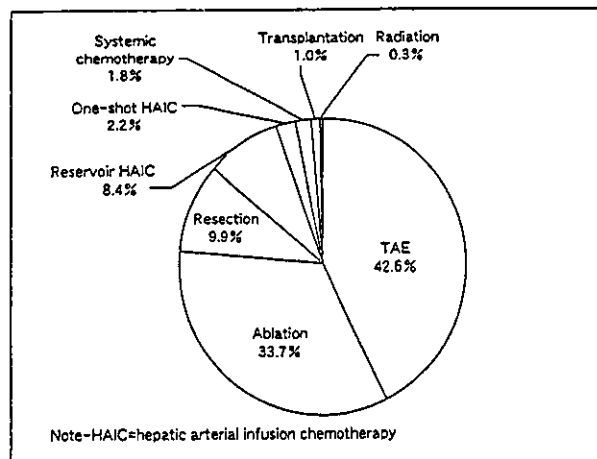


Fig.1 Treatments of HCC in Osaka University Hospital (n=1269, 2001-2003)



主腫瘍径は、2cm以下96例(47%)・3cm以下44例(21%)・5cm以下44例(21%)・10cm以下17例(8%)・10cm超6例(3%)で、3cm以下の小型例が7割弱、あるいは5cm以下の小型+中型例でほぼ9割を占めている。

TAEの選択性は、片葉71例(34%)、区域53例(25%)、亜区域以下82例(40%)で、より選択的なTAEをする傾向が強く、全肝TAEは施行されていない。また3例(1%)で右下横隔動脈からの肝外供血路のTAEが行われた。Table 1にLp-TAE 193例(95%)における主腫瘍径別の塩酸エピルピシンおよびリピオドールの平均使用量を示す。腫瘍径が大きいほど、両者とも使用量は増える傾向を認めるが、5~10cm以上の大型HCCにおいても塩酸エピルピシン40mg以下、リピオドール5~7ml程度に留まっている。また全体の平均使用量は、塩酸エピルピシン28.6mg、リピオドール3.54mlであり、TAE1回当たりとしては適量範囲と思われる。

### 【生存率】

Table 2に本邦の代表的な報告と自検例における生存率を示す<sup>1,3-6)</sup>。1994~2000年の間に初期治療としてTAEを施行した5cm以下2個以下(Child分類Cを除く)の症例(n=93)において、生存率は1年100%、3年79%、5年53%であり、Child分類別では、Child Aで1年100%、3年84%、5年58%、Child Bで1年100%、3年73%、5年46%と比較的良好な結果を認めた。適切な患者選択によりTAEでも肝切除に匹敵する成績が得られる可能性を示唆している。

### 【まとめ】

当院におけるTAEの現況を概説した。特徴として、①TAEの9割以上で、Lp-TAEを施行していること、②対象として小~中型・少数個のHCCが比較的多いこと、③方法として、区域・亜区域レベルの選択的Lp-TAEが主体であること、④適量の抗癌剤・リピオドール量を使用し、巨大例での過量投与は避けていること、などが挙

げられる。TAE後も、早期再発検出により高度進行状態への移行を回避することが肝心である。今後、ラジオ波凝固術に代表されるアブレーションの増加が予想されるが、TAE併用による局所制御の向上も期待される。従ってTAEの適応については、関連各科との継続的な症例検討が有意義であり、適切な治療選択や組合せによる集学的なHCC治療成績の向上が望まれる。

### ●文献

- 1) 村上卓道：局所療法—Radiological Intervention(肝動脈塞栓療法)、コンセンサス2004 肝疾患 治療、各務伸一監修、アークメディア、東京、2004、p182-192。
- 2) Osuga K, Khankan AA, Hori S, et al: Transarterial embolization for large hepatocellular carcinoma with use of superabsorbent polymer microspheres: initial experience. J Vasc Interv Radiol 13: 929-934, 2002.
- 3) Nishimine K, Uchida H, Matsuo N, et al: Segmental transarterial chemoembolization with Lipiodol mixed with anticancer drugs for nonresectable hepatocellular carcinoma: follow-up CT and therapeutic results. Cancer Chemother Pharmacol. 1994; 33 Suppl: S60-S68.
- 4) Matui O, Kadoya M, Yoshikawa J, et al: Small hepatocellular carcinoma: treatment with subsegmental transcatheter arterial embolization. Radiology 1993; 188: 79-83.
- 5) Takayasu K, Muramatsu Y, Maeda T, et al: Targeted transarterial oily chemoembolization for small foci of hepatocellular carcinoma using a unified helical CT and angiography system: analysis of factors affecting local recurrence and survival rates. AJR Am J Roentgenol 176: 681-688, 2001.
- 6) 日本肝癌研究会. 第16回全国原発性肝癌追跡調査報告(2000~2001).

Table 1 Mean doses of epirubicin and Lipiodol by maximum tumor size (n=193, 2003)

	< 2 cm (n=93)	< 3 cm (n=42)	< 5 cm (n=39)	< 10 cm (n=17)	10 cm < (n=2)	Overall (n=193)
epirubicin (mg)	25.3	27.6	34.0	36.5	40.0	28.6
Lipiodol (ml)	2.97	3.38	4.38	4.63	7.30	3.54

Table 2 Survival rates after TAE in Japanese studies

Authors	N	Indications	Survival rates (%)		
			1y	3y	5y
Nishimine, Nara, 1992 <sup>2)</sup>	98	mean size 3.8cm, IM0-1	89	59	30
Matsui, Kanazawa, 1994 <sup>4)</sup>	82	size ≤ 4 cm, n ≤ 2	100	78	53
Takayasu, Tokyo, 2001 <sup>5)</sup>	54	size ≤ 5 cm, n ≤ 2	93	77	NA
Osaka University Hospital (1994~2000) <sup>1)</sup>	93	size ≤ 5 cm, n ≤ 2	100	79	53
		Child A	100	84	58
		Child B	100	73	46
LCSGJ (1990~2001) <sup>6)</sup>	22,910		77	43	24

Note- LCSGJ = Liver Cancer Study Group of Japan; IM = intrahepatic metastasis

## 動 注

大須賀慶悟\*<sup>1</sup> 村上 卓道\*<sup>1</sup> 中田 早紀\*<sup>1</sup> 友田 要\*<sup>1</sup> 永野 浩昭\*<sup>2</sup>  
門田 守人\*<sup>2</sup> 中村 仁信\*<sup>2</sup>

[*Jpn J Cancer Chemother* 31(13):2114-2117, December, 2004]

Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy (HAIC): Keigo Osuga\*<sup>1</sup>, Takamichi Murakami\*<sup>1</sup>, Saki Nakata\*<sup>1</sup>, Kaname Tomoda\*<sup>1</sup>, Hiroaki Nagano\*<sup>1</sup>, Morito Monden\*<sup>2</sup> and Hironobu Nakamura\*<sup>2</sup> (\*<sup>1</sup>Dept. of Radiology, \*<sup>2</sup>Dept. of Surgical and Clinical Oncology, Osaka University Graduate School of Medicine)

## Summary

Hepatic arterial infusion chemotherapy (HAIC) has been often selected as a therapeutic option for advanced hepatocellular carcinoma (HCC) with intrahepatic metastases or portal vein thrombosis, which is not eligible for hepatic resection, tumor ablation, or embolization. Among various regimens, HAIC, consisting of 5-fluorouracil (5-FU) in combination with either low-doses of cisplatin (CDDP) or interferon- $\alpha$  has been reported to improve the response rates for advanced HCC. As both regimens require the use of an implanted port-catheter system, maintaining the patency of hepatic arteries is an important factor for the intrahepatic drug distribution and the efficacy of HAIC. Recently, a new product, CDDP powder has been also developed for intraarterial use, which adds a new option to HAIC. However, the long-term outcome or the survival benefit remains unclear with HAIC, and it may be significantly affected by liver function and cirrhosis. None of the regimens have been proved to be the standard for HAIC, and prospective multi-center clinical studies with standardized protocol are needed in the future. Key words: Hepatocellular carcinoma, Hepatic arterial infusion chemotherapy, Address request for reprints to: Dr. Takamichi Murakami, Dept. of Radiology, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

要旨 肝内多発や門脈浸潤を伴うような進行肝細胞癌においては、手術・PEIT・ラジオ波凝固療法・TAEなど既存の局所療法では奏効が期待できないため、しばしば動注化学療法が選択される。動注化学療法は、様々なレジメの工夫により奏効率の向上が図られてきたが、5-FUをkey drugとしたlow-dose FP療法やIFN併用療法など多剤併用の持続動注による高い奏効率が現在注目されている。いずれも皮下埋込式のリザーバーの使用を前提としており、良好な効果を得るには肝内薬剤分布や血管開存性も重要な要件である。最近、新たにone-shot動注用CDDP製剤も登場し、動注化学療法の選択肢がさらに広がっていくものと思われる。しかし、動注化学療法の長期成績については併存する肝硬変の関与も大きく、いまだ延命効果への寄与に関する客観的データは示されていない。いずれのレジメも標準的治療と評価される段階には至っておらず、今後は厳密なプロトコールによる大規模な臨床試験による評価が必要である。

## はじめに

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma: HCC) は、近年の画像診断や腫瘍マーカーによるスクリーニングの進歩により早期発見・早期治療が可能となってきた。しかし、腫瘍進行度や肝予備能により肝切除や肝移植など手術が選択される症例は約30%にとどまり、その一方、治療後

の肝内再発率は約30%と高い<sup>1)</sup>。切除不能例や再発例では、TAE・PEIT・ラジオ波凝固療法 (radiofrequency ablation: RFA) など経皮的治療が反復され、特に少数個・小型HCCでは良好な治療効果が得られる。しかし、びまん性多発・門脈浸潤など高度進行状態に移行し、これら既存の治療法の継続が困難になると治療選択は化学療法が主体となる場合が多い。そもそもHCCは抗癌剤低

\*<sup>1</sup> 大阪大学大学院医学系研究科・病態制御外科

別刷請求先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 \*<sup>1</sup> 大阪大学大学院医学系研究科・医用制御工学講座画像応用治療分野 (放射線医学)

村上 卓道

0385-0684/04/号500/論文/JCLS

表1 HCCに対する動注化学療法的主要成績

薬剤	報告者(年)	症例数	奏効率	備考
単剤				
DDP-H (動注用 CDDP)	後期II相試験	80	34%	
CDDP	Carr (2002)	26	42%	
EPI	永末 (1986)	53	15%	
SMANCS	田口 (1991)	167	36%	
多剤併用				
5-FU/CDDP	永松 (2001)	45	53%	
5-FU/CDDP	Ando (2002)	48	48%	Vp 2~4
5-FU/CDDP/ADM	太田 (2003)	9	44%	Vp 2~4
5-FU/IFN	Sakon (2000)	8	63%	Vp 3~4
5-FU/IFN	永野 (2003)	40	48%	Vp 3~4

ADM: doxorubicin, EPI: epirubicin, CDDP: cisplatin

感受性で、肝硬変合併による肝障害の問題も無視できず、少なくとも全身化学療法の果たす役割は低いと考えられる。その反面、HCCは進行期でも比較的肝内に病変がとどまることから、高い局所濃度が得られる肝動注による予後改善に期待がもたれ、種々のレジメが模索されているが、投与量や投与方法について一定の見解はない。本稿では、本邦において最近注目されている動注薬剤やレジメの動向について述べる。

## I. 投薬方法

進行期に多い中・低分化型HCCは、通常肝動脈に栄養される多血性腫瘍であり、動注により病変への高い薬剤濃度分布が図れる。投薬方法は、大別して、one-shot動注および皮下埋込式リザーバーによる持続動注がある。one-shot動注は、血管造影手技により抗癌剤の単回投与の反復を行うもので、その都度入院を繰り返す必要がある。一方、リザーバーによる持続動注では、外来でも簡単に抗癌剤の持続・反復投与が行える。IVRによる経皮的留置技術やポート・カテーテルなどの留置器具の進歩は目覚しく、良好な肝内薬剤分布や血管開存性の向上に寄与している。留置方法は、大腿動脈あるいは左鎖骨下動脈経路で、側孔付カテーテルを肝動脈末梢(肝末梢固定法)や胃十二指腸動脈(GDAコイル法)に先端固定留置し、消化管・脾保護のため適宜コイル塞栓により血流改変を加える方法が一般化しており、カテーテル逸脱や閉塞などのトラブルも減少した<sup>2)</sup>。

## II. 動注における薬剤選択

One-shot動注では濃度依存性の高いepirubicin, MMCやCDDPなどが適している。最近、肝動注用CDDP製剤が新たに保険認可されたが、その詳細は後述する。一方、リザーバー動注では時間依存性の高い5-FUをkey drugとしてcisplatin (CDDP), leucovorin, イ

ンターフェロン(interferon: IFN)などをbiochemical modulatorとして用いる傾向が強い。腫瘍への選択性や薬剤濃度維持など効果増強を図るため、抗癌剤担体としての油性造影剤Lipiodolや、一時的塞栓物質である微小澱粉球(スフェレックス)を併用する方法もある。しかし、同時に抗癌剤の肝内停滞により非癌部肝組織への障害も高まるため、併用の可否は肝予備能に依存する。また、いずれも塞栓効果を有するためX線透視下でオーバーフローしないことを確認しながらの注入が原則である。特にリザーバーからのLipiodolの使用は、カテーテル材質の合成樹脂の破損の原因となるので注意が必要である。Lipiodolとの懸濁を前提とした油溶性抗癌剤SMANCSは、単剤動注としては35.9%と高い奏効率が得られている<sup>3)</sup>。しかし、血管閉塞や肝萎縮などの合併症の頻度が高いため、その使用は限られているのが現状である。投与量を制限したり、区域レベル以下の選択的投与を行うなどの対策が必要である。

HCCに対する動注療法の主要成績を表1に示す。単剤および多剤併用いずれも奏効率に大きな幅があり、一概に比較は難しい。現状では単剤動注よりもリザーバー動注による多剤併用療法の成績が若干良好の印象があるが、どの組み合わせが最も効果的か、また本当に多剤併用が単剤に比し優れているかは対象症例の腫瘍進行度や宿主背景の不統一性もあり、後方視的に比較評価することは難しい。ましてや動注療法の延命効果については、対照群との無作為比較試験でしか実証し得ないが、本邦で施行するのは極めて困難な状況である。様々なレジメが試みられるなか、リザーバー動注によるlow-dose FP療法および5-FU/IFN併用療法の成績が注目されている。また最近、新たにone-shot動注用のCDDP製剤が保険認可され、その有用性に期待がもたれる。

### III. Low-dose FP 療法

5-FU を effector (key drug), 少量 CDDP を modulator としてリザーバーより併用投与する方法である。5-FU の抗腫瘍効果の機序の一つとして、細胞内代謝産物 FdUMP によるチミジン合成酵素 (TS) 阻害にて DNA 合成が阻害される。一方、CDDP は腫瘍細胞膜に作用しメチオニンの細胞内への移送が阻害する。その結果、細胞内メチオニンプールが減少し細胞内でメチオニン合成酵素が誘導される。それにカップリングする葉酸系代謝が亢進し 5, 10-CH<sub>2</sub>-FH<sub>4</sub>が増加するため 5-FU の効果が増強する。また、CDDP は蛋白結合型の total platin の状態で血中に長期存在しながら modulator 作用を発揮する。投与方法は、CDDP 10 mg/1 時間および 5-FU 250 mg/5 時間の 5 日間連続投与と 2 日間休薬を 4 週間施行し 1 クールとし、これを反復する。low-dose FP 療法の治療成績は総じて良好で、進行 HCC (n=45) において奏効率 53.3%, 1 年生存率 84%<sup>4)</sup>, Vp 2 以上の門脈腫瘍栓を伴う HCC (n=48) において奏効率 48%, 1 年生存率 45%<sup>5)</sup>などが報告されている。また、進行 HCC に対して low-dose FP 療法をベースにした多剤併用の有効性も示唆されている。たとえば、low-dose FP 療法に leucovorin を加えた場合の奏効率 (n=9) は 56% で、low-dose FP 療法 (n=10) の 20% に比べて有意に高い<sup>6)</sup>。当施設では Vp 2 以上の門脈浸潤を伴う多発進行 HCC (n=9) において、low-dose FP 療法に doxorubicin を加えた FAP 療法を行うことにより、CR 1 例を含む奏効率 44% を得ている<sup>7)</sup>。

### IV. IFN 併用 5-FU 動注化学療法

IFN が抗癌薬の作用を修飾することが報告され、各種抗癌薬の全身あるいは動注療法との併用が試みられている。IFN- $\alpha$  単剤でも抗腫瘍効果として細胞障害、細胞周期遅延、癌抗原の発現上昇、NK 細胞・マクロファージ・T 細胞系活性化などの作用が報告されているが、肝細胞癌に対する単剤での有効性は疑問視されている<sup>8)</sup>。当施設では 1997 年より、既存の治療法で奏効が期待できない高度門脈浸潤 HCC (Vp 3/4) を対象に IFN- $\alpha$ /5-FU 併用療法を行い、初期成績として奏効率 63% (n=8) を報告している<sup>9)</sup>。この IFN- $\alpha$ /5-FU 併用療法の作用機序については、① IFN 受容体を介した直接的抗腫瘍効果、② 免疫担当細胞を介した間接的抗腫瘍効果、③ 血管新生抑制効果、などの関与が考えられている。現在のプロトコールでは、5-FU は 500 mg/日の 5 日間投与・2 日間休薬を 2 週間施行、2 週間休薬を 1 クールとして持続動注する。同時に IFN- $\alpha$  を 5 $\times$ 10<sup>6</sup> 単位/回、3 回/週、4 週間で

1 クールとして皮下投与する。また、副作用や動注による肝障害を考慮して、適応条件を 70 歳未満、T-Bil 正常、GOT・GPT 100 IU/l 未満、血小板数 8 $\times$ 10<sup>4</sup>/mm<sup>3</sup>以上、血清クレアチニン 1.5 mg/dl 以下、PS (0,1) としている。門脈内腫瘍栓に全肝多発病変を伴う最近の症例 (n=40) では奏効率 47.5%, 1 年生存率 50% を得ている<sup>10)</sup>。

### V. 動注用 CDDP 製剤

CDDP は泌尿生殖器系癌、頭頸部癌、非小細胞肺癌、神経芽細胞腫、食道癌、胃癌などに対する点滴静注用抗癌剤として既承認の白金錯体化合物である。CDDP は癌細胞内の DNA 鎖と結合し、DNA 合成とそれに引き続く癌細胞分裂を阻害することにより、殺細胞効果を発揮し、その抗腫瘍効果は濃度依存性である。肝細胞癌に対する CDDP の感受性も注目され、国内では静注療法<sup>11)</sup>における奏効率 9%、動注療法<sup>12)</sup>における奏効率 19% が報告されており、局所投与である動注療法のほうが優れた傾向を示している。しかし、従来の点滴静注用製剤の肝動脈内投与は、保険適応外使用である上、低濃度 (0.5 mg/ml)・大容量のため注入時間を要し、肝動注療法には適さないという問題もあった。そこで、濃度依存性による殺細胞効果を高め、かつ注入時間の短縮を図るべく、より高濃度 (約 1.5 mg/ml)・少容量に調整可能な微粉末化 CDDP 製剤 (動注用アイエーコール・日本化薬㈱) が肝動注用として開発され、2004 年 7 月に保険適応に認可された。本剤開発時の後期第 II 相臨床試験では、至適用量 65 mg/m<sup>2</sup>での one-shot 反復動注の奏効率は 33.8% であった。単剤動注の成績としては TACE で最頻用される epirubicin の奏効率 15.1% を大きく上回っており<sup>13)</sup>、動注用 CDDP は高い有効性が期待できるが、30% 台の奏効率自体は臨床的に十分とはいえず、さらなる投与法の工夫が必要と思われる。これまでも静注用製剤を施設独自に粉末化して Lipiodol 混合液を作製したり<sup>14)</sup>、ゼラチン・スポンジを用いて塞栓術と併用するなど報告されている<sup>15)</sup>が、投与方法や至適投与量について一定の見解はない。また、リザーバー・システムからの少量連続投与については、現在 1 本 100 mg のバイアル製剤しかないため必ずしも適さない。

#### まとめ

現在、肝内多発や門脈浸潤を伴う進行 HCC が肝動注療法の主な対象と考えられるが、その適応は肝予備能や全身状態に左右される。最近では 5-FU を key drug とした low-dose FP 療法や IFN 併用療法が高く注目されているが、いずれもリザーバーの使用が前提で、良好な肝内薬剤分布や血管開存性が重要な要件である。また、新