

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

# L3分画および血流中癌細胞テロメラーゼを指標とした 肝細胞癌のサーベイランスの有用性に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 青 柳 豊

平成19(2007)年4月

## 目次

I. 総括研究報告	
L3 分画および血流中癌細胞テロメラーゼを指標とした肝細胞癌の サーベイランスの有用性に関する研究	1
主任研究者 青柳 豊 新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学教授	
II. 分担研究報告	
1. L3 分画および血流中癌細胞テロメラーゼを指標とした肝細胞癌の サーベイランスの有用性に関する研究	8
分担研究者 恩地 森一 国立大学法人愛媛大学消化器内科教授	
2. L3 分画および血流中癌細胞テロメラーゼを指標とした肝細胞癌の サーベイランスの有用性に関する研究	12
分担研究者 田中 榮司 国立大学法人信州大学消化器内科助教授	
3. L3 分画および血流中癌細胞テロメラーゼを指標とした肝細胞癌の サーベイランスの有用性に関する研究	17
分担研究者 高木 均 国立大学法人群馬大学病態制御内科助教授	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)

総括研究報告書

AFP-L3 分画および血流中癌細胞テロメラーゼを指標とした  
肝細胞癌のサーベイランスの有用性に関する研究

主任研究者 青柳 豊 新潟大学大学院医歯学総合研究科 消化器内科学分野 教授

研究要旨

本研究は、本邦における年間死亡 34000 人余りの肝癌患者に対して治療前後の AFP-L3 分画ならびに流血中肝癌細胞のテロメラーゼ (hTERT) 活性の動きに基づき治療法を選択し、肝癌患者の予後改善を図ることを目的とする。本方式による肝癌治療のアルゴリズムの確立は、肝癌の予後改善に寄与するとともに、これらを基盤とした適切な治療程度の確保と治療回数の減少は、結果として在院日数の短縮や医療費削減に寄与すると考えられる。平成 18 年度は前向き試験として無再発生存に着目して登録を開始し、肝癌患者 190 例、249 回の治療データを解析した。その結果、治療前後の AFP 濃度、AFP-L3 分画、PIVKA-II は無再発生存期間を有意に層別化し、治療前よりも治療後測定値での有意性が強いこと(治療前/治療後: AFP,  $p=0.0006/p<0.0001$ ; AFP-L3,  $p<0.0001/p<0.0001$ ; PIVKA-II,  $p=0.0012/p<0.0001$ )を確認した。更に、HCC 再発の規定因子として、腫瘍ステージ、および各種腫瘍マーカーを用い多変量解析を行ったところ、治療後の AFP-L3 は他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子( $p<0.0001$ )であることを確認した。一方、血流中肝癌細胞の hTERT 活性についても 3 施設において 94 例の治療前後 hTERT 定性を行い、無再発生存の解析を行った。結果、hTERT 定性陽性・陰性の 2 群間における無再発生存の比較においては、有意な差は確認できなかったが( $p=0.33$ )、治療前の血液中癌細胞陽性症例の無再発生存率が低い傾向が認められた。

分担研究者

恩地 森一：国立大学法人愛媛大学

消化器内科 教授

田中 榮司：国立大学法人信州大学

消化器内科 助教授

高木 均：国立大学法人群馬大学

病態制御内科 助教授

A. 研究目的

肝細胞癌の生物学的悪性度の指標である血清 AFP-L3 分画、血流中肝癌細胞のテロメラーゼ活性の推移による肝癌患者の予後推定を確立する。これら 2 種の生物学的悪性度の指標を加えた新しい治療アルゴリズムの構築により、適切な治療程度の確保と治療回数の減少を指向し、肝癌患者の治療入院期間の短縮、結果としての在院日数の短縮や医療費削減への寄与を計る。

## B. 研究方法

1) 平成 18 年度は前向き試験として、比較的短期間に評価が可能と推測される無再発生存に着目して登録を開始し、4 施設における肝癌患者 190 例、249 回の治療データを集積し解析した。各症例の治療前後 AFP、PIVKA-II、AFP-L3 分画を測定し、各マーカーの多寡により肝癌患者を層別化し、無再発生存の差異を Kaplan-Meier 法で計算し、Logrank 検定で群間比較を行った。また、各種治療法における L3 分画の多寡による患者の層別化と、AFP 低値症例における L3 分画の多寡による患者の層別化も試み、同様の手法で無再発生存の群間比較を行った。さらに Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行い、再発規定因子を検討した。

2) 血流中肝癌細胞の hTERT 活性については、3 施設における肝癌患者 94 例の治療前後 hTERT 定性の結果を集積し解析を行った。各症例は治療前後に採血を行い、抗体付き磁気 beads で細胞を分離した後、RNA 抽出、cDNA 合成を行い、 $\beta$  actin、IL-2r、hTERT の発現を PCR で確認した。hTERT および IL-2r 発現の有無により末梢血中癌細胞陽性群、非陽性群の 2 群に分け、

tumor stage (肝癌取扱い規約 5 版) との相関および AFP、PIVKA-II、AFP-L3 分画の各種マーカーとの関連性を検討し、無再発生存を Kaplan-Meier 法で計算し、Logrank 検定で群間比較した。

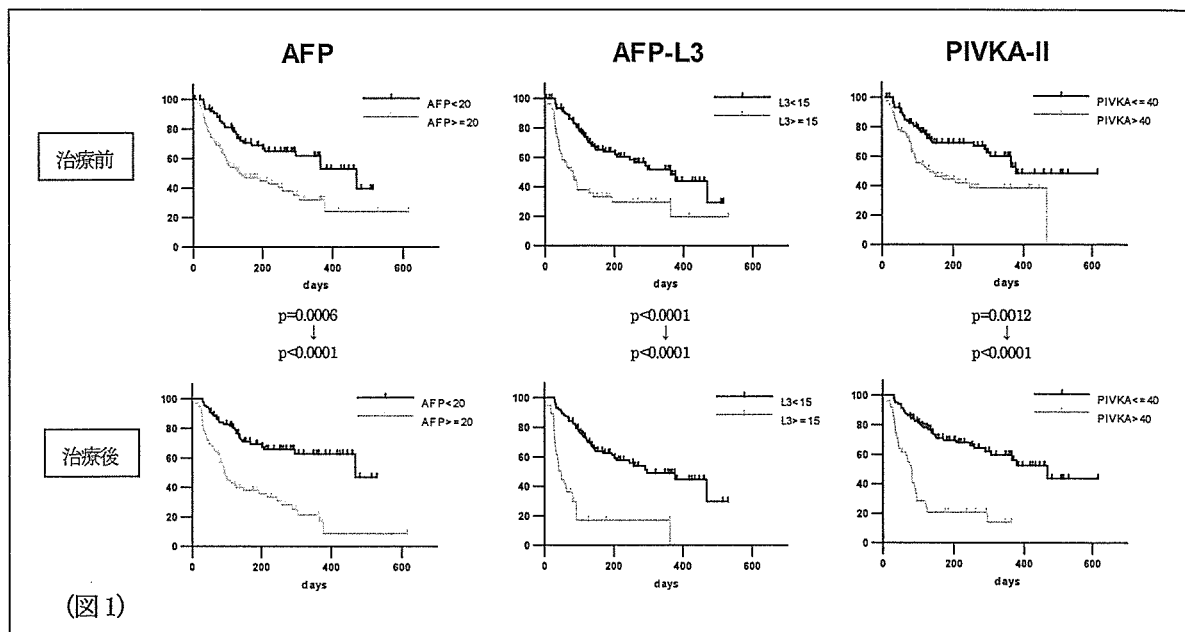
(倫理面への配慮)

対象症例のデータは連結可能匿名化を行った上で解析を行っており、本研究に関する倫理面への配慮については、本学の遺伝子倫理委員会の審議を経てその指針を受けている。

## C. 研究結果

1) 18 年度は前向き試験として比較的短期間に評価が可能と推察される無再発生存に着目して登録を開始し、肝癌患者 190 例、249 回の治療データを解析し、以下の点を確認した。

①治療前後の AFP 濃度、AFP-L3 分画、PIVKA-II はともに治療後の無再発生存期間を有意に層別化し、治療前よりも治療後測定値での有意性が強いこと (治療前/治療後: AFP,  $p=0.0006/p<0.0001$ ; AFP-L3,  $p<0.0001/p<0.0001$ ; PIVKA-II,  $p=0.0012/p<0.0001$ ) を確認した (図 1)。



②HCC 再発の規定因子として、腫瘍ステージ、および各種腫瘍マーカーを用い多変量解析を行ったところ、治療後の AFP-L3 は他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子 ( $p < 0.0001$ ) であることを確認した (表 1)。

Cox回帰分析	
Variable	P value
TNM stage	0.0292
治療後AFP	0.5905
治療後AFP-L3	<0.0001
治療後PIVKA-II	0.0017

(表 1)

③治療前 AFP-L3 の多寡と無再発生存の関連では、手術 (Op)、ラジオ波焼灼 (RFA) では差が認められなかったが、動脈塞栓療法 (TACE)、動

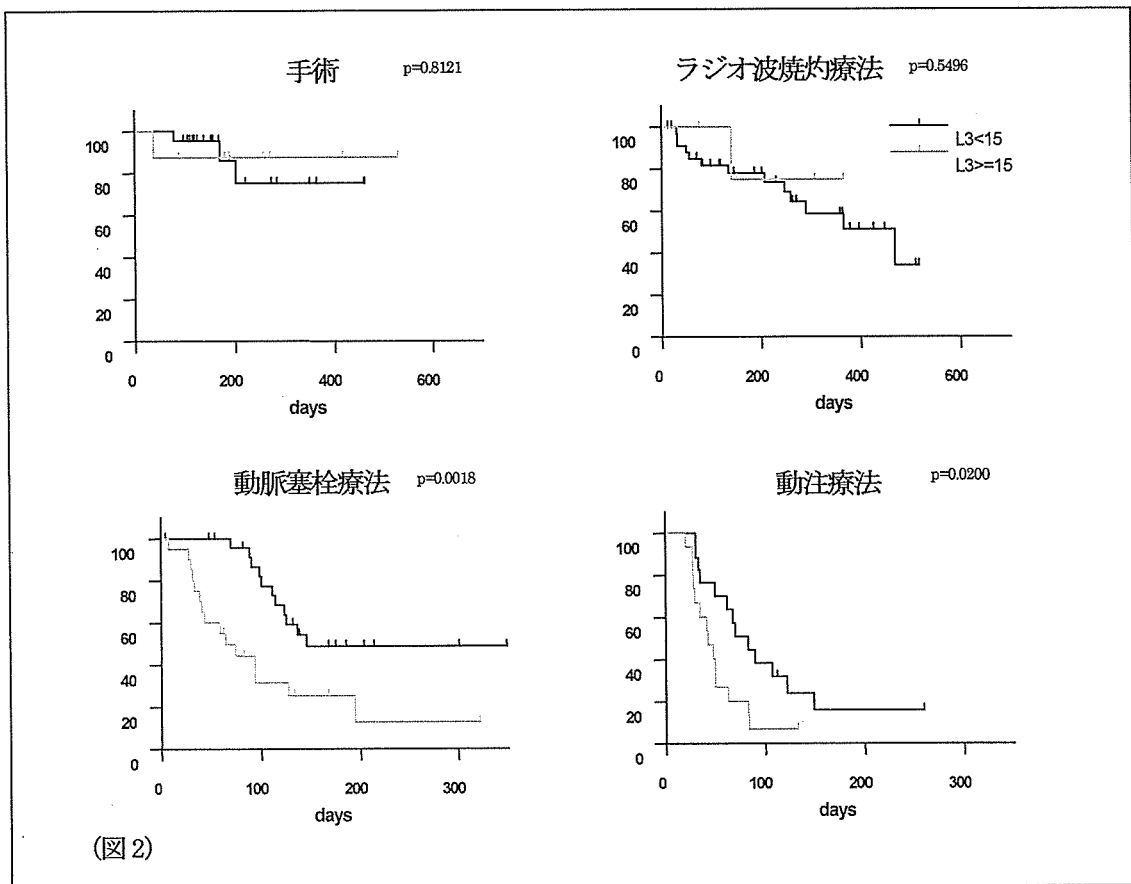
注療法 (HAIC) では短期間の無再発生存においても有意差を認めた (図 2)。

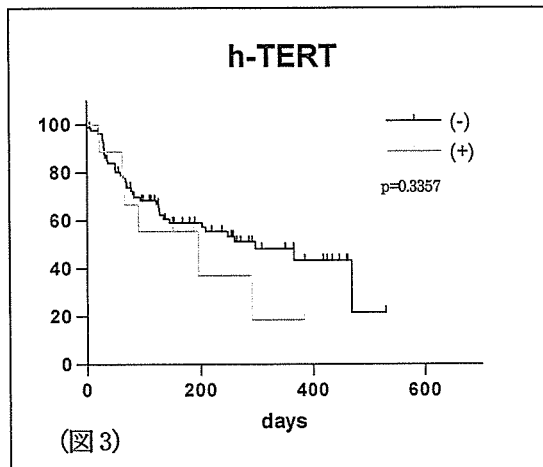
2) 血流中肝癌細胞の hTERT 活性定性については 3 施設における肝癌患者 94 例の治療前後 hTERT 定性の結果を前向きに集積し解析を行い、以下の点を確認した。

①治療前肝癌患者 94 例中 9 例 (9.5%) に、定性 hTERT mRNA が検出された。

②hTERT 定性陽性群と陰性群における、Tumor stage との関連性および AFP、PIVKA-II、AFP-L3 分画の各種マーカー値との関連性の検討では有意な群間差は認めなかった。

③計 73 例の hTERT 定性陽性群と陰性群における無再発生存に関しては、有意差を認められなかったが ( $p = 0.33$ )、治療前 hTERT 定性陰性者に比較して陽性者では無再発生存の短縮傾向を認めた (図 3)。





(図 3)

#### D. 考察

平成17年度に行ったHCC症例の生命予後に関する後向き研究において、従来のスコアリングシステムでは「癌の解剖学的進展度」が同等と評価される症例の中に、予後良好な症例と予後不良な症例が混在していることを明らかとなり、AFP-L3分画を指標とすることで、その弁別が可能であることを確認した。加えて、外科切除以外の治療法がAFP-L3分画の多寡により術後の生命予後を規定されるのに対し、治療法として外科切除を選択した症例に関しては、AFP-L3分画の多寡によらず良好な治療成績を残していることを報告した。換言すれば、「癌の生物学的悪性度」の高いHCC症例に対しては、外科切除を中心とした、よりradicalな治療法を選択することが予後改善につながることを示したことになり、従来のスコアリングシステムにAFP-L3分画を評価項目として加えることによって、治療法選択と予後予測を一元的に行うことのできる理想的なシステム開発が可能であることが示唆された。

一般的に後向き研究では、対象症例の選択や除外の基準、検査方法、収集されるべき情報、治療方法、フォローアップ方法（期間や無再発確認の間隔や方法）等が施設間や年代で不均一であり、それにより、生存率の推定や、その有

意差検定を行う際にバイアスが生じることがある。

平成18年度は、先に得られた後ろ向き研究の知見に対し確証的な結果を得るため、一定の基準の下で計測・データ収集できる前向き研究を行い、比較的短期間に評価可能な、無再発生存期間をアウトカムとして、腫瘍マーカーの多寡が患者の予後に及ぼす影響を評価した。その結果、治療前後のAFP濃度、AFP-L3分画、PIVKA-IIはともに治療後の無再発生存期間を有意に層別化し、治療前よりも治療後測定値での有意性が強いこと、L3についてはPIVKA-II、AFP低値例においても無再発生存期間を良好に層別化し、治療2ヶ月後の測定によって、優れた予後予測能力を発揮することを確認した。さらに、多変量解析では、HCC再発の規定因子として、治療後のAFP-L3が他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子であることが明らかとなった。これら、前年度の知見と矛盾しない結果が得られた一方、治療法別に検討した結果では、外科切除とラジオ波焼灼術は、無再発生存の観点からは、AFP-L3分画の高い群、低い群で治療成績が同等であると評価された。これは、生命予後をアウトカムとした前年度の後ろ向き研究により得られた、術前のAFP-L3分画に影響を受けない治療法は手術療法のみである、という結果と乖離した結論であった。これは、経過観察期間が短いこと、登録症例数が少ないことが影響している可能性が十分に考えられる。このような、外科切除もラジオ波焼灼術も選択可能な症例において、いずれの治療がより適切であるかの結論とその選択基準を明確にすることは、本研究の最も重要な課題であると考えられる。次年度以降はこの問題に重点を置き、更なる症例の蓄積と追跡調査を行う予定である。

一方、もう一つの生物学的悪性度の指標として着目した hTERT を指標とした末梢血中癌細胞の検出に関しては、生命予後をアウトカムとした前年度の後ろ向き研究で、その治療前測定の意義が示唆されており、平成 18 年度は AFP-L3 と同様に比較的短期間に評価可能な無再発生存期間をアウトカムとして、患者の予後に及ぼす影響を前向きに評価した。その結果、hTERT 陽性症例数は治療前肝癌患者 94 例中では 9 例 (9.5%)、であり、既報の陽性症例率である約 55% (Clin. Cancer Res., 9: 3004-11, 2003) から期待される陽性率よりも低値であった。無再発期間に関する検討では治療前 hTERT 定性陰性者に比較して陽性者では無再発生存の短縮傾向 ( $p=0.33$ ) を認めたが、有意な差は確認できず、この点も生命予後をアウトカムとした前年度の後ろ向き検討で確認されたものとは異なる結果であった。これは、登録症例数と観察期間、PCR 手技上の問題(偽陰性、偽陽性)に加え、抗体結合磁気 Beads を用いた定性法において用いている Ber-EP4 の肝癌細胞表出の頻度が当初予想していたよりも低いことが大きな要因であると考えられる。現在、新潟大学では血中癌細胞由来 hTERT のより正確な検出・評価を目的に、リアルタイム PCR を用いた感度上昇の試みを行っている。同手法での hTERT 陽性感度は、治療前肝癌患者 102 例中 5 例 (4.7%)、治療後肝癌患者 86 例中では 9 例 (10.4%) と、前述の定性 PCR と同様に低値であったが、治療後定量陽性者において無再発生存の有意な短縮を認めている ( $p=0.047$ )。血中癌細胞由来 hTERT の検出については、これまで登録された症例の追跡調査を引き続き行う予定であるが、同時に、hTERT 測定手技の改良を検討していく必要があると考えられる。

## E. 結論

肝癌患者 190 例、249 回の治療データを前向きに解析した結果、治療後の AFP-L3 は他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子 ( $p<0.0001$ ) であることを確認した。血中肝癌細胞 hTERT 検出では、無再発生存における有意差は確認できなかったが ( $p=0.33$ )、治療前の血液中癌細胞陽性症例の無再発生存率が低い傾向が認められた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takamura M, Narisawa R, Maruyama Y, Yokoyama J, Fukuhara Y, Kawai H, Yamagiwa S, Sato Y, Matsuda Y, Sugimura K, Ichida T, Aoyagi Y. A primary follicular lymphoma of the duodenum treated successfully with radiation therapy. Intern Med. 2006; 45(5):309-11.
- 2) Wakai T, Shirai Y, Suda T, Yokoyama N, Sakata J, Cruz PV, Kawai H, Matsuda Y, Watanabe M, Aoyagi Y, Hatakeyama K. Long-term outcomes of hepatectomy vs percutaneous ablation for treatment of hepatocellular carcinoma  $\leq 4$  cm. World J Gastroenterol. 2006; 28:12(4):546-52.
- 3) Tsuboi Y, Ohkoshi S, Yano M, Suzuki K, Tsubata SS, Ishihara K, Ichida T, Sugitani S, Shibasaki K, Aoyagi Y. Common clinicopathological features of the patients with chronic hepatitis B virus infection who developed hepatocellular carcinoma after seroconversion to anti-HBs—a consideration

of the pathogenesis of HBV-induced hepatocellular carcinoma and a strategy to inhibit it. *Hepatogastroenterology*. 2006 Jan-Feb;53(67):110-4.

4) Kawauchi Y, Suzuki K, Watanabe S, Yamagiwa S, Yoneyama H, Han GD, Palaniyandi SS, Veeraveedu PT, Watanabe K, Kawachi H, Okada Y, Shimizu F, Asakura H, Aoyagi Y, Narumi S. Role of IP-10/CXCL10 in the progression of pancreatitis-like injury in mice after murine retroviral infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Aug;291(2):G345-54.

5) Yano M, Ohkoshi S, Suzuki K, Ito S, Wakabayashi H, Sugiyama M, Watanabe T, Maeda H, Hatakeyama SA, Hatano T, Kobayashi Y, Takei S, Kohjiro H, Tsuboi Y, Takahashi T, Ishikawa T, Kamimura T, Ichida T, Aoyagi Y. Absence of pretreatment markers that predict the emergence of YMDD mutants during lamivudine treatment—the results of a prospective multi-center study. *Hepatogastroenterology*. 2006 Jan-Feb;53(67):124-7.

6) Honma N, Genda T, Matsuda Y, Yamagiwa S, Takamura M, Ichida T, Aoyagi Y. MEK/ERK signaling is a critical mediator for integrin-induced cell scattering in highly metastatic hepatocellular carcinoma cells. *Lab Invest*. 2006 Jul;86(7):687-96.

7) Hanawa T, Suzuki K, Kawauchi Y, Takamura M, Yoneyama H, Han GD, Kawachi H, Shimizu F, Asakura H, Miyazaki J, Maruyama H, Aoyagi Y. Attenuation of mouse acute colitis by naked hepatocyte growth factor gene transfer into the liver. *J Gene Med*. 2006

May;8(5):623-35.

8) Yang XH, Yamagiwa S, Ichida T, Matsuda Y, Sugahara S, Watanabe H, Sato Y, Abo T, Horwitz DA, Aoyagi Y. Increase of CD4+ CD25+ regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2006 Aug;45(2):254-62.

9) 合志 聡, 小林正明, 青柳 豊, 経皮内視鏡的胃瘻造設術 (PEG) 後の長期栄養管理, 栄養評価と治療 23:590-593, 2006.

10) 塚田健一郎, 宮林千春, 古川浩一, 寺尾ゆみ子, 窪田芳樹, 綱島勝正, 青柳 豊. 上部消化管内視鏡検査後に, 一過性全健忘を来した 3 症例, *Gastroenterological Endoscopy*48:1215-1220, 2006.

11) 山際 訓, 松田康伸, 青柳 豊, VI 肝臓, 5 肝細胞癌の病態と診断 *Annual Review 消化器*, 276-282, 2006, 編集: 戸田剛太郎, 税所宏光, 寺野彰, 幕内雅敏 中外医学社

12) 青柳 豊 腫瘍マーカーの診断と予後推定のおける意義, *AFP, AFP L3 分画*, *臨床消化器内科 増刊号* 21:157-164, 2006, 日本メディカルセンター

13) 埜孝泰, 大越章吾, 青木洋平, 竹内学, 山際訓, 松田康伸, 野本実, 青柳 豊, 比較的若年の女性に起こった肝静脈閉塞症の一例, *臨床消化器内科*, 21, 1197-1202, 2006, 日本メディカルセンター.

## 2. 学会発表

五十嵐正人, 田村 康, 日浅陽一, 恩地森一, 梅村武司, 田中榮司, 柿崎 暁, 高木 均, 青柳 豊: 無再発生存期間から見た前向き検討による各種肝細胞癌腫瘍マーカーの意義, 第 43 回日本肝臓学会総会, 2007. 5. 31 発表予定.



H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)  
分担研究報告書

AFP-L3 分画および血流中癌細胞テロメラーゼを指標とした  
肝細胞癌のサーベイランスの有用性に関する研究

分担研究者 恩地 森一 国立大学法人愛媛大学 消化器内科学分野 教授

研究要旨

本研究は、本邦における年間死亡 34000 人余りの肝癌患者に対して治療前後の AFP-L3 分画ならびに流血中肝癌細胞のテロメラーゼ(hTERT)活性の動きに基づき治療法を選択し、肝癌患者の予後改善を図ることを目的とする。本方式による肝癌治療のアルゴリズムの確立は、肝癌の予後改善に寄与するとともに、これらを基盤とした適切な治療程度の確保と治療回数の減少は、結果として在院日数の短縮や医療費削減に寄与すると考えられる。平成 18 年度は前向き試験として無再発生存に着目して登録を開始し、肝癌患者 190 例、249 回の治療データを解析した。その結果、治療前後の AFP 濃度、AFP-L3 分画、PIVKA-II は無再発生存期間を有意に層別化し、治療前よりも治療後測定値での有意性が強いこと(治療前/治療後:AFP,  $p=0.0006/p<0.0001$ ; AFP-L3,  $p<0.0001/p<0.0001$ ; PIVKA-II,  $p=0.0012/p<0.0001$ )を確認した。更に、HCC 再発の規定因子として、腫瘍ステージ、および各種腫瘍マーカーを用い多変量解析を行ったところ、治療後の AFP-L3 は他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子( $p<0.0001$ )であることを確認した。一方、血流中肝癌細胞の hTERT 活性についても 3 施設において 94 例の治療前後 hTERT 定性を行い、無再発生存の解析を行った。結果、hTERT 定性陽性・陰性の 2 群間における無再発生存の比較においては、有意な差は確認できなかったが( $p=0.33$ )、治療前の血液中癌細胞陽性症例の無再発生存率が低い傾向が認められた。

A. 研究目的

肝細胞癌の生物学的悪性度の指標である血清 AFP-L3 分画、血流中肝癌細胞のテロメラーゼ活性の推移による肝癌患者の予後推定を確立する。これら 2 種の生物学的悪性度の指標を加えた新しい治療アルゴリズムの構築により、適切な治療程度の確保と治療回数の減少を指向し、肝癌患者の治療入院期間の短縮、結果としての在院

日数の短縮や医療費削減への寄与を計る。

B. 研究方法

1) 平成 18 年度は前向き試験として、比較的短期間に評価が可能と推測される無再発生存に着目して登録を開始し、4 施設における肝癌患者 190 例、249 回の治療データを集積し解析した。各症例の治療前後 AFP、PIVKA-II、AFP-L3 分画を測定し、各マーカーの多寡により肝癌患

者を層別化し、無再発生存の差異をKaplan-Meier法で計算し、Logrank検定で群間比較を行った。また、各種治療法におけるL3分画の多寡による患者の層別化と、AFP低値症例におけるL3分画の多寡による患者の層別化も試み、同様の手法で無再発生存の群間比較を行った。さらにCox比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行い、再発規定因子を検討した。

2) 血流中肝癌細胞のhTERT活性については、3施設における肝癌患者94例の治療前後hTERT定性の結果を集積し解析を行った。各症例は治療前後に採血を行い、抗体付き磁気beadsで細胞を分離した後、RNA抽出、cDNA合成を行い、 $\beta$ actin、IL-2r、hTERTの発現をPCRで確認した。hTERTおよびIL-2r発現の有無により末梢血中癌細胞陽性群、非陽性群の2群に分け、tumor stage(肝癌取扱い規約5版)との相関およびAFP、PIVKA-II、AFP-L3分画の各種マーカーとの関連性を検討し、無再発生存をKaplan-Meier法で計算し、Logrank検定で群間比較した。

(倫理面への配慮)

対象症例のデータは連結可能匿名化を行った上で解析を行っており、本研究に関する倫理面への配慮については、本学の遺伝子倫理委員会の審議を経てその指針を受けている。

### C. 研究結果

1) 18年度は前向き試験として比較的短期間に評価が可能と推察される無再発生存に着目して登録を開始し、肝癌患者190例、249回の治療データを解析し、以下の点を確認した。

①治療前後のAFP濃度、AFP-L3分画、PIVKA-IIはともに治療後の無再発生存期間を有意に層別化し、治療前よりも治療後測定値での有意性が強いこと(治療前/治療後:AFP,  $p=0.0006/p<$

$0.0001$ ;AFP-L3,  $p<0.0001/p<0.0001$ ;PIVKA-II,  $p=0.0012/p<0.0001$ )を確認した。

②HCC再発の規定因子として、腫瘍ステージ、および各種腫瘍マーカーを用いた多変量解析を行ったところ、治療後のAFP-L3は他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子( $p<0.0001$ )であることを確認した。

③治療前AFP-L3の多寡と無再発生存の関連では、手術(Op)、ラジオ波焼灼(RFA)では差が認められなかったが、動脈塞栓療法(TACE)、動注療法(HAIC)では短期間の無再発生存においても有意差を認めた。

2) 血流中肝癌細胞のhTERT活性定性については3施設における肝癌患者94例の治療前後hTERT定性の結果を前向きに集積し解析を行い、以下の点を確認した。

①治療前肝癌患者94例中9例(9.5%)に、定性hTERTmRNAが検出された。

②hTERT定性陽性群と陰性群における、Tumor stageとの関連性およびAFP、PIVKA-II、AFP-L3分画の各種マーカー値との関連性の検討では有意な群間差は認めなかった。

③計73例のhTERT定性陽性群と陰性群における無再発生存に関しては、有意差を認められなかったが( $p=0.33$ )、治療前hTERT定性陰性者に比較して陽性者では無再発生存の短縮傾向を認めた。

### D. 考察

平成17年度に行ったHCC症例の生命予後に関する後向き研究において、従来のスコアリングシステムでは「癌の解剖学的進展度」が同等と評価される症例の中に、予後良好な症例と予後不良な症例が混在していることを明らかとなり、AFP-L3分画を指標とすることで、その弁別が可能であることを確認した。加えて、外科切除以

外の治療法が AFP-L3 分面の多寡により術後の生命予後を規定されるのに対し、治療法として外科切除を選択した症例に関しては、AFP-L3 分面の多寡によらず良好な治療成績を残していることを報告した。換言すれば、「癌の生物学的悪性度」の高い HCC 症例に対しては、外科切除を中心とした、より radical な治療法を選択することが予後改善につながることを示したことになり、従来のスコアリングシステムに AFP-L3 分面を評価項目として加えることによって、治療法選択と予後予測を一元的に行うことのできる理想的なシステム開発が可能であることが示唆された。

一般的に後向き研究では、対象症例の選択や除外の基準、検査方法、収集されるべき情報、治療方法、フォローアップ方法（期間や無再発確認の間隔や方法）等が施設間や年代で不均一であり、それにより、生存率の推定やその有意差検定を行う際にバイアスが生じることがある。

平成 18 年度は、先に得られた後ろ向き研究の知見に対し確証的な結果を得るため、一定の基準の下で計測・データ収集できる前向き研究を行い、比較的短期間に評価可能な、無再発生存期間をアウトカムとして、腫瘍マーカーの多寡が患者の予後に及ぼす影響を評価した。

その結果、治療前後の AFP 濃度、AFP-L3 分面、PIVKA-II はともに治療後の無再発生存期間を有意に層別化し、治療前よりも治療後測定値での有意性が強いこと、L3 については PIVKA-II、AFP 低値例においても無再発生存期間を良好に層別化し、治療 2 ヶ月後の測定によって、優れた予後予測能力を発揮することを確認した。さらに、多変量解析では、HCC 再発の規定因子として、治療後の AFP-L3 が他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子であることが明らかとなった。これら、前年度の知

見と矛盾しない結果が得られた一方、治療法別に検討した結果では、外科切除とラジオ波焼灼術は、無再発生存の観点からは、AFP-L3 分面の高い群、低い群で治療成績が同等であると評価された。これは、生命予後をアウトカムとした前年度の後ろ向き研究により得られた、術前の AFP-L3 分面に影響を受けない治療法は手術療法のみである、という結果と乖離した結論であった。これは、経過観察期間が短いこと、登録症例数が少ないことが影響している可能性が十分に考えられる。このような、外科切除もラジオ波焼灼術も選択可能な症例において、いずれの治療がより適切であるかの結論とその選択基準を明確にすることは、本研究の最も重要な課題であると考えられる。次年度以降はこの問題に重点を置き、更なる症例の蓄積と追跡調査を行う予定である。

一方、もう一つの生物学的悪性度の指標として着目した hTERT を指標とした末梢血中癌細胞の検出に関しては、生命予後をアウトカムとした前年度の後ろ向き研究で、その治療前測定の意義が示唆されており、平成 18 年度は AFP-L3 と同様に比較的短期間に評価可能な無再発生存期間をアウトカムとして、患者の予後に及ぼす影響を前向きに評価した。その結果、hTERT 陽性症例数は治療前肝癌患者 94 例中では 9 例 (9.5%)、であり、既報の陽性症例率である約 55% (Clin. Cancer Res., 9: 3004-11, 2003) から期待される陽性率よりも低値であった。無再発期間に関する検討では治療前 hTERT 定性陰性者に比較して陽性者では無再発生存の短縮傾向 ( $p=0.33$ ) を認めたが、有意な差は確認できず、この点も生命予後をアウトカムとした前年度の後ろ向き検討で確認されたものとは異なる結果であった。これは、登録症例数と観察期間、PCR 手技上の問題(偽陰性、偽陽性)に加え、抗体結

合磁気 Beads を用いた定性法において用いている Ber-EP4 の肝癌細胞表出の頻度が当初予想していたよりも低いことが大きな要因であると考えられる。血中癌細胞由来 hTERT の検出については、これまで登録された症例の追跡調査を引き続き行う予定であるが、同時に、hTERT 測定手技の改良を検討していく必要があると考えられた。

#### E. 結論

肝癌患者 190 例、249 回の治療データを前向きに解析した結果、治療後の AFP-L3 は他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子 ( $p < 0.0001$ ) であることを確認した。血中肝癌細胞 hTERT 検出では、無再発生存における有意差は確認できなかったが ( $p = 0.33$ )、治療前の血液中癌細胞陽性症例の無再発生存率が低い傾向が認められた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hiraoka A, Kumagi T, Hirooka M, Uehara T, Kurose K, Iuchi H, Hiasa Y, Matsuura B, Michitaka K, Kumano S, Tanaka H, Yamashita Y, Horiike N, Mochizuki T, Onji M: Prognosis following transcatheter arterial embolization for 121 patients with unresectable hepatocellular carcinoma with or without a history of treatment. *World Journal of Gastroenterology* 12(13):2075-2079, 2006
- 2) Hirooka M, Iuchi H, Kumagi T, Shigematsu S, Hiraoka A, Uehara T, Kurose K, Horiike N,

Onji M: Virtual Sonographic Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma Visualized on CT but Not on Conventional Sonography. *American Journal of Roentgenology* 186: 255-260, 2006

- 3) Hiasa Y, Blackard JT, Lin W, Kamegaya Y, Horiike N, Onji M, Schmidt EV, Chung RT: Cell-based models of sustained, interferon-sensitive hepatitis C virus genotype 1 replication. *J Virol Methods* 132: 195-203, 2006
- 4) Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Kang JH, Hige S, Kuramitsu T, Suzuki K, Tanaka E, Okada S, Tokita H, Asahina Y, Inoue K, Kakumu S, Okanoue T, Murawaki Y, Hino K, Onji M, Yatsushashi H, Sakugawa H, Miyakawa Y, Ueda R, Mizokami M. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2006 Aug;44(2):326-34.
- 5) Michitaka K, Horiike N, Duong TN, Yagura M, Harada H, Shibayama T, Inui A, Fujisawa T, Matsuura K, Hiasa Y, Onji M. Heterogeneity of hepatitis B virus genotype D in Japan. *Intervirology*. 2007;50(2):150-5

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 4. 特許取得

なし

##### 5. 実用新案登録

なし

##### 6. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)  
分担研究報告書

AFP-L3 分画および血流中癌細胞テロメラーゼを指標とした  
肝細胞癌のサーベイランスの有用性に関する研究

分担研究者 田中 榮司 国立大学法人信州大学 消化器内科学分野 助教授

研究要旨

本研究は、本邦における年間死亡 34000 人余りの肝癌患者に対して治療前後の AFP-L3 分画ならびに流血中肝癌細胞のテロメラーゼ (hTERT) 活性の動きに基づき治療法を選択し、肝癌患者の予後改善を図ることを目的とする。本方式による肝癌治療のアルゴリズムの確立は、肝癌の予後改善に寄与するとともに、これらを基盤とした適切な治療程度の確保と治療回数の減少は、結果として在院日数の短縮や医療費削減に寄与すると考えられる。平成 18 年度は前向き試験として無再発生存に着目して登録を開始し、肝癌患者 190 例、249 回の治療データを解析した。その結果、治療前後の AFP 濃度、AFP-L3 分画、PIVKA-II は無再発生存期間を有意に層別化し、治療前よりも治療後測定値での有意性が強いこと (治療前/治療後: AFP,  $p=0.0006/p<0.0001$ ; AFP-L3,  $p<0.0001/p<0.0001$ ; PIVKA-II,  $p=0.0012/p<0.0001$ ) を確認した。更に、HCC 再発の規定因子として、腫瘍ステージ、および各種腫瘍マーカーを用い多変量解析を行ったところ、治療後の AFP-L3 は他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子 ( $p<0.0001$ ) であることを確認した。一方、血流中肝癌細胞の hTERT 活性についても 3 施設において 94 例の治療前後 hTERT 定性を行い、無再発生存の解析を行った。結果、hTERT 定性陽性・陰性の 2 群間における無再発生存の比較においては、有意な差は確認できなかったが ( $p=0.33$ )、治療前の血液中癌細胞陽性症例の無再発生存率が低い傾向が認められた。

A. 研究目的

肝細胞癌の生物学的悪性度の指標である血清 AFP-L3 分画、血流中肝癌細胞のテロメラーゼ活性の推移による肝癌患者の予後推定を確立する。これら 2 種の生物学的悪性度の指標を加えた新しい治療アルゴリズムの構築により、適切な治療程度の確保と治療回数の減少を指向し、肝癌患者の治療入院期間の短縮、結果としての在院

日数の短縮や医療費削減への寄与を計る。

B. 研究方法

1) 平成 18 年度は前向き試験として、比較的短期間に評価が可能と推測される無再発生存に着目して登録を開始し、4 施設における肝癌患者 190 例、249 回の治療データを集積し解析した。各症例の治療前後 AFP、PIVKA-II、AFP-L3 分画を測定し、各マーカーの多寡により肝癌患

者を層別化し、無再発生存の差異をKaplan-Meier法で計算し、Logrank検定で群間比較を行った。また、各種治療法におけるL3分画の多寡による患者の層別化と、AFP低値症例におけるL3分画の多寡による患者の層別化も試み、同様の手法で無再発生存の群間比較を行った。さらにCox比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行い、再発規定因子を検討した。

2) 血流中肝癌細胞のhTERT活性については、3施設における肝癌患者94例の治療前後hTERT定性の結果を集積し解析を行った。各症例は治療前後に採血を行い、抗体付き磁気beadsで細胞を分離した後、RNA抽出、cDNA合成を行い、 $\beta$ actin、IL-2r、hTERTの発現をPCRで確認した。hTERTおよびIL-2r発現の有無により末梢血中癌細胞陽性群、非陽性群の2群に分け、tumor stage(肝癌取扱い規約5版)との相関およびAFP、PIVKA-II、AFP-L3分画の各種マーカーとの関連性を検討し、無再発生存をKaplan-Meier法で計算し、Logrank検定で群間比較した。

(倫理面への配慮)

対象症例のデータは連結可能匿名化を行った上で解析を行っており、本研究に関する倫理面への配慮については、本学の遺伝子倫理委員会の審議を経てその指針を受けている。

### C. 研究結果

1) 18年度は前向き試験として比較的短期間に評価が可能と推察される無再発生存に着目して登録を開始し、肝癌患者190例、249回の治療データを解析し、以下の点を確認した。

①治療前後のAFP濃度、AFP-L3分画、PIVKA-IIはともに治療後の無再発生存期間を有意に層別化し、治療前よりも治療後測定値での有意性が強いこと(治療前/治療後:AFP,  $p=0.0006/p<$

$0.0001$ ;AFP-L3,  $p<0.0001/p<0.0001$ ;PIVKA-II,  $p=0.0012/p<0.0001$ )を確認した。

②HCC再発の規定因子として、腫瘍ステージ、および各種腫瘍マーカーを用いた多変量解析を行ったところ、治療後のAFP-L3は他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子( $p<0.0001$ )であることを確認した。

③治療前AFP-L3の多寡と無再発生存の関連では、手術(0p)、ラジオ波焼灼(RFA)では差が認められなかったが、動脈塞栓療法(TACE)、動注療法(HAIC)では短期間の無再発生存においても有意差を認めた。

2) 血流中肝癌細胞のhTERT活性定性については3施設における肝癌患者94例の治療前後hTERT定性の結果を前向きに集積し解析を行い、以下の点を確認した。

①治療前肝癌患者94例中9例(9.5%)に、定性hTERTmRNAが検出された。

②hTERT定性陽性群と陰性群における、Tumor stageとの関連性およびAFP、PIVKA-II、AFP-L3分画の各種マーカー値との関連性の検討では有意な群間差は認めなかった。

③計73例のhTERT定性陽性群と陰性群における無再発生存に関しては、有意差を認められなかったが( $p=0.33$ )、治療前hTERT定性陰性者に比較して陽性者では無再発生存の短縮傾向を認めた。

### D. 考察

平成17年度に行ったHCC症例の生命予後に関する後向き研究において、従来のスコアリングシステムでは「癌の解剖学的進展度」が同等と評価される症例の中に、予後良好な症例と予後不良な症例が混在していることを明らかとなり、AFP-L3分画を指標とすることで、その弁別が可能であることを確認した。加えて、外科切除以

外の治療法が AFP-L3 分画の多寡により術後の生命予後を規定されるのに対し、治療法として外科切除を選択した症例に関しては、AFP-L3 分画の多寡によらず良好な治療成績を残していることを報告した。換言すれば、「癌の生物学的悪性度」の高い HCC 症例に対しては、外科切除を中心とした、より radical な治療法を選択することが予後改善につながることを示したことになり、従来のスコアリングシステムに AFP-L3 分画を評価項目として加えることによって、治療法選択と予後予測を一元的に行うことのできる理想的なシステム開発が可能であることが示唆された。

一般的に後ろ向き研究では、対象症例の選択や除外の基準、検査方法、収集されるべき情報、治療方法、フォローアップ方法（期間や無再発確認の間隔や方法）等が施設間や年代で不均一であり、それにより、生存率の推定や、その有意差検定を行う際にバイアスが生じることがある。

平成 18 年度は、先に得られた後ろ向き研究の知見に対し確証的な結果を得るため、一定の基準の下で計測・データ収集できる前向き研究を行い、比較的短期間に評価可能な、無再発生存期間をアウトカムとして、腫瘍マーカーの多寡が患者の予後に及ぼす影響を評価した。

その結果、治療前後の AFP 濃度、AFP-L3 分画、PIVKA-II はともに治療後の無再発生存期間を有意に層別化し、治療前よりも治療後測定値での有意性が強いこと、L3 については PIVKA-II、AFP 低値例においても無再発生存期間を良好に層別化し、治療 2 ヶ月後の測定によって、優れた予後予測能力を発揮することを確認した。さらに、多変量解析では、HCC 再発の規定因子として、治療後の AFP-L3 が他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子であ

ることが明らかとなった。これら、前年度の知見と矛盾しない結果が得られた一方、治療法別に検討した結果では、外科切除とラジオ波焼灼術は、無再発生存の観点からは、AFP-L3 分画の高い群、低い群で治療成績が同等であると評価された。これは、生命予後をアウトカムとした前年度の後ろ向き研究により得られた、術前の AFP-L3 分画に影響を受けない治療法は手術療法のみである、という結果と乖離した結論であった。これは、経過観察期間が短いこと、登録症例数が少ないことが影響している可能性が十分に考えられる。このような、外科切除もラジオ波焼灼術も選択可能な症例において、いずれの治療がより適切であるかの結論とその選択基準を明確にすることは、本研究の最も重要な課題であると考えられる。次年度以降はこの問題に重点を置き、更なる症例の蓄積と追跡調査を行う予定である。

一方、もう一つの生物学的悪性度の指標として着目した hTERT を指標とした末梢血中癌細胞の検出に関しては、生命予後をアウトカムとした前年度の後ろ向き研究で、その治療前測定の意義が示唆されており、平成 18 年度は AFP-L3 と同様に比較的短期間に評価可能な無再発生存期間をアウトカムとして、患者の予後に及ぼす影響を前向きに評価した。その結果、hTERT 陽性症例数は治療前肝癌患者 94 例中では 9 例 (9.5%)、であり、既報の陽性症例率である約 55% (Clin. Cancer Res., 9: 3004-11, 2003) から期待される陽性率よりも低値であった。無再発期間に関する検討では治療前 hTERT 定性陰性者に比較して陽性者では無再発生存の短縮傾向 ( $p=0.33$ ) を認めたが、有意な差は確認できず、この点も生命予後をアウトカムとした前年度の後ろ向き検討で確認されたものとは異なる結果であった。これは、登録症例数と観察期間、PCR



手技上の問題(偽陰性、偽陽性)に加え、抗体結合磁気Beadsを用いた定性法において用いているBer-EP4の肝癌細胞表出の頻度が当初予想していたよりも低いことが大きな要因であると考えられる。血中癌細胞由来hTERTの検出については、これまで登録された症例の追跡調査を引き続き行う予定であるが、同時に、hTERT測定手技の改良を検討していく必要があると考えられた。

#### E. 結論

肝癌患者190例、249回の治療データを前向きに解析した結果、治療後のAFP-L3は他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子( $p < 0.0001$ )であることを確認した。血中肝癌細胞hTERT検出では、無再発生存における有意差は確認できなかったが( $p = 0.33$ )、治療前の血液中癌細胞陽性症例の無再発生存率が低い傾向が認められた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yagi S, Mori K, Tanaka E, Matsumoto A, Sunaga F, Kiyosawa K, Yamaguchi K. Identification of novel HCV subgenome replicating persistently in chronic active hepatitis C patients. *J Med Virol* 77:399-413, 2005
- 2) Amal Gad, Eiji Tanaka, Akihiro Matsumoto, Moushira Abd-el Wahab, Abd el-Hamid Serwah, Fawzy Attia, Khalil Ali, Howayda Hassouba, Abd el-Raouf el-Deeb, Tetsuya Ichijyo, Takeji Umemura, Hidetomo Muto, Kaname

Yoshizawa, Kendo Kiyosawa. Assessment of KL-6 as a tumor marker in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 11(42): 6607-6612, 2005

- 3) Amal Gad, Eiji Tanaka, Akihiro Matsumoto, Abd el-Hamid Serwah, Fawzy Attia, Adel Hassan, Ahmed Sanny, Khalil Ali, Amro Abbas, Abd El-Raouf El-Deeb, Xiao Hong Sun, Takeji Umemura, Tetsuya Ichijo, Takashi Ehara, Kaname Yoshizawa, Kendo Kiyosawa. Ethnicity affects the diagnostic validity of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* 1: 64-70, 2005

- 4) Naoki Tanaka, Tetsuya Ichijo, Wataru Okiyama, Hidetomo Mutou, Noriko Misawa, Akihiro Matsumoto, Kaname Yoshizawa, Eiji Tanaka and Kendo Kiyosawa. Laparoscopic findings in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2:32-38, 2006

- 5) Misawa N, Matsumoto A, Tanaka E, Rokuhara A, Yoshizawa K, Umemura T, Maki N, Kimura T, Kiyosawa K. Patients with and without loss of hepatitis B virus DNA after hepatitis B e antigen seroconversion have different virological characteristics. *J Med Virol* 78:68-73, 2006

- 6) Ogata K, Ide T, Kumashiro R, Kumada H, Yotsuyanagi H, Okita K, Akahane Y, Kaneko S, Tsubouchi H, Tanaka E, Moriwaki H, Nishiguchi S, Kakumu S, Mizokami M, Iino S, Sata M. Timing of interferon therapy and sources of infection in patients with acute hepatitis C. *Hepatology Research* 34:35-40, 2006

- 7) Tanaka N, Tanaka E, Sheena Y, Komatsu M,

Okuyama W, Misawa N, Muto H, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Horiuchi A, Kiyosawa K. Useful parameters for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis with mild steatosis from cryptogenic chronic hepatitis in the Japanese population. *Liver Int* 26:956-963, 2006

8) Rokuhara A, Matsumoto A, Tanaka E, Umemura T, Yoshizawa K, Kimura T, Maki N, Kiyosawa K. Hepatitis B virus RNA is measurable in serum and can be a new marker for monitoring lamivudine therapy. *J Gastroenterol* 41: 785-790, 2006

9) Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Kang JH, Hige S, Kuramitsu T, Suzuki K, Tanaka E, Okada S, Tokita H, Asahina Y, Inoue K, Kakumu S, Okanoue T, Murawaki Y, Hino K, Onji M, Yatsushashi H, Sakugawa H, Miyakawa Y, Ueda R, Mizokami M. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 44: 326-334, 2006

10) Tanaka E, Matsumoto A, Suzuki F, Kobayashi M, Mizokami M, Tanaka Y, Okanoue T, Minami M, Chayama K, Imamura M, Yatsushashi H, Nagaoka S, Yotsuyanagi H, Kawata S, Kimura T, Maki N, Iino S, Kiyosawa K; HBV Core-Related Antigen Study Group. Measurement of hepatitis B virus core-related antigen is valuable for identifying patients who are at low risk of lamivudine resistance. *Liver Int.* 2006 Feb;26(1):90-6.

## 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 7. 特許取得

なし

### 8. 実用新案登録

なし

### 9. その他

なし

AFP-L3 分画および血流中癌細胞テロメラーゼを指標とした  
肝細胞癌のサーベイランスの有用性に関する研究

分担研究者 高木 均 国立大学法人群馬大学 病態制御内科学分野 助教授

研究要旨

本研究は、本邦における年間死亡 34000 人余りの肝癌患者に対して治療前後の AFP-L3 分画ならびに血流中肝癌細胞のテロメラーゼ (hTERT) 活性の動きに基づき治療法を選択し、肝癌患者の予後改善を図ることを目的とする。本方式による肝癌治療のアルゴリズムの確立は、肝癌の予後改善に寄与するとともに、これらを基盤とした適切な治療程度の確保と治療回数の減少は、結果として在院日数の短縮や医療費削減に寄与すると考えられる。平成 18 年度は前向き試験として無再発生存に着目して登録を開始し、肝癌患者 190 例、249 回の治療データを解析した。その結果、治療前後の AFP 濃度、AFP-L3 分画、PIVKA-II は無再発生存期間を有意に層別化し、治療前よりも治療後測定値での有意性が強いこと (治療前/治療後: AFP,  $p=0.0006/p<0.0001$ ; AFP-L3,  $p<0.0001/p<0.0001$ ; PIVKA-II,  $p=0.0012/p<0.0001$ ) を確認した。更に、HCC 再発の規定因子として、腫瘍ステージ、および各種腫瘍マーカーを用い多変量解析を行ったところ、治療後の AFP-L3 は他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子 ( $p<0.0001$ ) であることを確認した。一方、血流中肝癌細胞の hTERT 活性についても 3 施設において 94 例の治療前後 hTERT 定性を行い、無再発生存の解析を行った。結果、hTERT 定性陽性・陰性の 2 群間における無再発生存の比較においては、有意な差は確認できなかったが ( $p=0.33$ )、治療前の血液中癌細胞陽性症例の無再発生存率が低い傾向が認められた。

A. 研究目的

肝細胞癌の生物学的悪性度の指標である血清 AFP-L3 分画、血流中肝癌細胞のテロメラーゼ活性の推移による肝癌患者の予後推定を確立する。これら 2 種の生物学的悪性度の指標を加えた新しい治療アルゴリズムの構築により、適切な治療程度の確保と治療回数の減少を指向し、肝癌患者の治療入院期間の短縮、結果としての在院

日数の短縮や医療費削減への寄与を計る。

B. 研究方法

1) 平成 18 年度は前向き試験として、比較的短期間に評価が可能と推測される無再発生存に着目して登録を開始し、4 施設における肝癌患者 190 例、249 回の治療データを集積し解析した。各症例の治療前後 AFP、PIVKA-II、AFP-L3 分画を測定し、各マーカーの多寡により肝癌患

者を層別化し、無再発生存の差異をKaplan-Meier法で計算し、Logrank検定で群間比較を行った。また、各種治療法におけるL3分画の多寡による患者の層別化と、AFP低値症例におけるL3分画の多寡による患者の層別化も試み、同様の手法で無再発生存の群間比較を行った。さらにCox比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行い、再発規定因子を検討した。

2) 血流中肝癌細胞のhTERT活性については、3施設における肝癌患者94例の治療前後hTERT定性の結果を集積し解析を行った。各症例は治療前後に採血を行い、抗体付き磁気beadsで細胞を分離した後、RNA抽出、cDNA合成を行い、 $\beta$ actin、IL-2r、hTERTの発現をPCRで確認した。hTERTおよびIL-2r発現の有無により末梢血中癌細胞陽性群、非陽性群の2群に分け、tumor stage(肝癌取扱い規約5版)との相関およびAFP、PIVKA-II、AFP-L3分画の各種マーカーとの関連性を検討し、無再発生存をKaplan-Meier法で計算し、Logrank検定で群間比較した。

(倫理面への配慮)

対象症例のデータは連結可能匿名化を行った上で解析を行っており、本研究に関する倫理面への配慮については、本学の遺伝子倫理委員会の審議を経てその指針を受けている。

### C. 研究結果

1) 18年度は前向き試験として比較的短期間に評価が可能と推察される無再発生存に着目して登録を開始し、肝癌患者190例、249回の治療データを解析し、以下の点を確認した。

①治療前後のAFP濃度、AFP-L3分画、PIVKA-IIはともに治療後の無再発生存期間を有意に層別化し、治療前よりも治療後測定値での有意性が強いこと(治療前/治療後:AFP,  $p=0.0006/p<$

$0.0001$ ;AFP-L3,  $p<0.0001/p<0.0001$ ;PIVKA-II,  $p=0.0012/p<0.0001$ )を確認した。

②HCC再発の規定因子として、腫瘍ステージ、および各種腫瘍マーカーを用いた多変量解析を行ったところ、治療後のAFP-L3は他のマーカーや腫瘍ステージと独立した最も有意な再発規定因子( $p<0.0001$ )であることを確認した。

③治療前AFP-L3の多寡と無再発生存の関連では、手術(0p)、ラジオ波焼灼(RFA)では差が認められなかったが、動脈塞栓療法(TACE)、動注療法(HAIC)では短期間の無再発生存においても有意差を認めた。

2) 血流中肝癌細胞のhTERT活性定性については3施設における肝癌患者94例の治療前後hTERT定性の結果を前向きに集積し解析を行い、以下の点を確認した。

①治療前肝癌患者94例中9例(9.5%)に、定性hTERTmRNAが検出された。

②hTERT定性陽性群と陰性群における、Tumor stageとの関連性およびAFP、PIVKA-II、AFP-L3分画の各種マーカー値との関連性の検討では有意な群間差は認めなかった。

③計73例のhTERT定性陽性群と陰性群における無再発生存に関しては、有意差を認められなかったが( $p=0.33$ )、治療前hTERT定性陰性者に比較して陽性者では無再発生存の短縮傾向を認めた。

### D. 考察

平成17年度に行ったHCC症例の生命予後に関する後向き研究において、従来のスコアリングシステムでは「癌の解剖学的進展度」が同等と評価される症例の中に、予後良好な症例と予後不良な症例が混在していることを明らかとなり、AFP-L3分画を指標とすることで、その弁別が可能であることを確認した。加えて、外科切除以