

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 青 柳 豊

平成20(2008)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 _____ 12
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 _____ 18
分担研究者 田中 榮司 国立大学法人信州大学消化器内科 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 _____ 24
分担研究者 高木 均 国立大学法人群馬大学病態制御内科 准教授

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 30

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、肝細胞癌 (HCC) 患者に対して治療前後の AFP-L3 分画ならびに血中 HCC 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、患者の予後改善を図ることを目的とする。平成 18 年度からは前向きに HCC 症例 355 例を登録・追跡調査を行ない、比較的短期間に評価が可能である無再発生存に対する各種腫瘍マーカーの意義について解析を行った。その結果、1) 治療前後における AFP, AFP-L3 分画, PIVKA II は無再発生存期間を有意に層別化した。2) 手術療法では治療前 AFP-L3 分画の多寡が無再発生存予後に与える影響は確認できなかった。一方、穿刺治療では治療前 AFP-L3 分画の多寡が無再発生存に影響を及ぼしており、外科切除もラジオ波焼灼術も選択可能な 3cm・3 個以内の HCC 症例においても同様の傾向が認められた。3) 血中癌細胞 hTERT 活性を RT-PCR 法と TaqMan リアルタイム定量法で検出したところ、陽性症例は陰性者に比較して無再発生存期間の短縮傾向を認めたが、いずれの測定法においても検出感度が低いことが明らかとなった。

以上より、外科切除、穿刺治療のいずれも選択可能な HCC の治療において、AFP-L3 分画陽性症例では残肝予備能の範囲内で出来る限り腫瘍制御能の高い外科手術を選択することを推奨し、治療後においては、AFP-L3 分画持続陽性症例では腫瘍制御が不完全であることを前提に追加治療を考慮する必要があると考えられた。血中 hTERT 活性測定は感度が低く、予後予測マーカーとしての臨床応用には更なる改良が必要であると考えられた。

分担研究者

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
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	教授
高木 均	：国立大学法人群馬大学	病態制御内科	准教授

A. 研究目的

肝細胞癌(HCC)の生物学的悪性度の指標である血清AFP-L3分画, 血流中HCC細胞のテロメラーゼ(hTERT)活性の推移によるHCC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, HCC患者の予後改善を図る一方, HCC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図る.

B. 研究方法

前向き検討は2005年4月から2007年10月まで4施設(新潟大学, 愛媛大学, 群馬大学, 信州大学)において治療を行ったHCC症例355例を対象とし, 治療後予後追跡調査を行った.

各症例は画像所見(CT, AngioCT, US, MRI)により腫瘍進展度(原発性肝癌取扱い規約第4版)を評価し, 治療前肝予備力は血清Alb, T.Bil, PTおよび腹水の有無, 肝生脳症の程度によりChild-Pugh分類に従い評価した. 腫瘍マーカーとして治療前および治療2ヶ月後にAFP濃度, AFP-L3分画(Liquid Binding Assay法), PIVKA II値, 血中hTERT活性を測定した.

血中HCC細胞のhTERT活性検出は, 既報(Clin. Cancer Res., 9: 3004-11, 2003)に従い抗体付き磁気beadsで細胞を分離した後, RNA抽出, cDNA合成を行い, hTERTおよびIL-2R発現の有無より血中癌細胞の評価を行なった. また, これまでの定性PCR法での解析と同時に, TaqManリアルタイムPCR定量でのhTERT検出を行った(hTERT primer and probe; assay identification

number Hs00162669m1). PCRはLightCycler(Roche)を用い, PCR条件は(95°C 10min)×1cycle, (95°C 10sec - 60°C 30sec - 72°C 1sec)×45cycle, (40°C 30sec)×1cycleとした. 上皮細胞分画もしくは非リンパ球分画でのhTERTの指数関数的なsignal増強を認めるもの例を発現陽性とし, 定量値はGAPDHを内部標準としてHepG2細胞の発現比を基準に算出した.

HCCの治療は第7回日本肝臓学会大会コンセンサスメETINGで設定された「肝細胞癌治療のアルゴリズム」に従い選択し, 治療後再発の有無は画像所見で確認した. 登録症例を治療前後のAFP濃度(<20/>=20ng/ml, <200/>=200ng/ml), AFP-L3分画(<15/>=15%), PIVKA II値(<40/>=40mAU/ml), 血中hTERT活性(+/-)の多寡によりそれぞれ2群に層別化し, 累積無再発生存をKaplan-Meier法で計算し, Logrank検定で群間比較を行った.

再発は①局所再発; 治療部に接して動脈相で濃染する古典的HCCの所見を呈する病変を認めるもの②肝内転移再発③多中心性発生再発(②, ③ともに肝癌取扱い規約第4版による定義に従うもの)④遠隔転移再発の4再発形態に分類し, これらいずれかの再発形態を認めたものをアウトカム発生とした. 各種治療法別症例群(手術症例, ラジオ波焼灼症例, 化学塞栓療法)においてもAFP-L3分画の多寡による患者の層別化を行い, 累積無再発生存について群間比較を行った. 特に, 外科切除もラジオ波焼灼術も選択可能な3cm・3個以内のHCC症例においても同様の解析を行った. また, 肝予備力(Child-Pugh分類), 腫瘍進展度, 腫瘍マーカー等の各因子について, Cox比例ハザ

ードモデルを用いて単変量および多変量解析を行い、治療後再発の予後規定因子を検討した。これら統計学的解析にはSPSS15.0を用いて解析を行った。

(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

2005年4月から2007年10月まで、4施設より前向きにHCC症例355例を登録した(表1)。選択した治療は手術療法109例、穿刺治療118例、穿刺治療+化学塞栓療法23例、化学塞栓療法61例、肝動注化学療法34例

であった。追跡期間は389±240日(Mean±SD)、再発評価可能症例327例中、再発症例は155例、無再発症例は172例であった。

再発例155例の内訳は局所再発32例、肝内転移再発45例、局所再発+肝内転移再発30例、多中心性再発35例、遠隔転移再発4例であった。これら前向きに集積した症例において、比較的短期間に評価が可能である無再発生存をアウトカムとする解析から以下の点を明らかにした。①治療前後AFP濃度、AFP-L3分画、PIVKA-IIとともに治療後の無再発生存期間を有意に層別化した(治療前/治療後:AFP, $p=0.0003/p<0.0001$; AFP-L3, $p<0.0001/p<0.0001$; PIVKA II, $p=0.0007/p<0.0001$) (図1)。

②肝予備能(Child-Pugh分類)、腫瘍進展度、各種腫瘍マーカー等の各因子について、Cox

表 1

登録症例数	: 355
年齢	: 67.6±9.4(35-85)
性別(男性/女性)	: 248/107
背景肝因子(HBsAg+)/anti-HCV(+)	: 51/202
Child分類(A/B/C)	: 275/70/10
腫瘍進展度(I/II/III/IV) (肝癌取扱い規約第4版)	: 103/139/84/29
AFP(<20ng/ml/>=20ng/ml)	: 186/168
L3(<15%/>=15%)	: 247/75
PIVKA II (<40mAU/ml/>=40mAU/ml)	: 177/168
血流中プロテリン活性定性(-/+)	: 99/15
血流中プロテリン活性定量(-/+)	: 97/5
手術	: 109
穿刺治療	: 118
穿刺治療+カテーテル治療	: 23
化学塞栓療法	: 61
肝動注療法	: 34
その他(全身化学療法等)	: 10
追跡期間(日)	: 389±240(2-939)
再発(-/+)	: 172/155(局所32, 肝内転移45, 局所+肝内転移30, 多中心性発生35, 遠隔転移4)
生命予後(生存/死亡)	: 265/64 (肝臓死52, 他病死12, 追跡不能25)

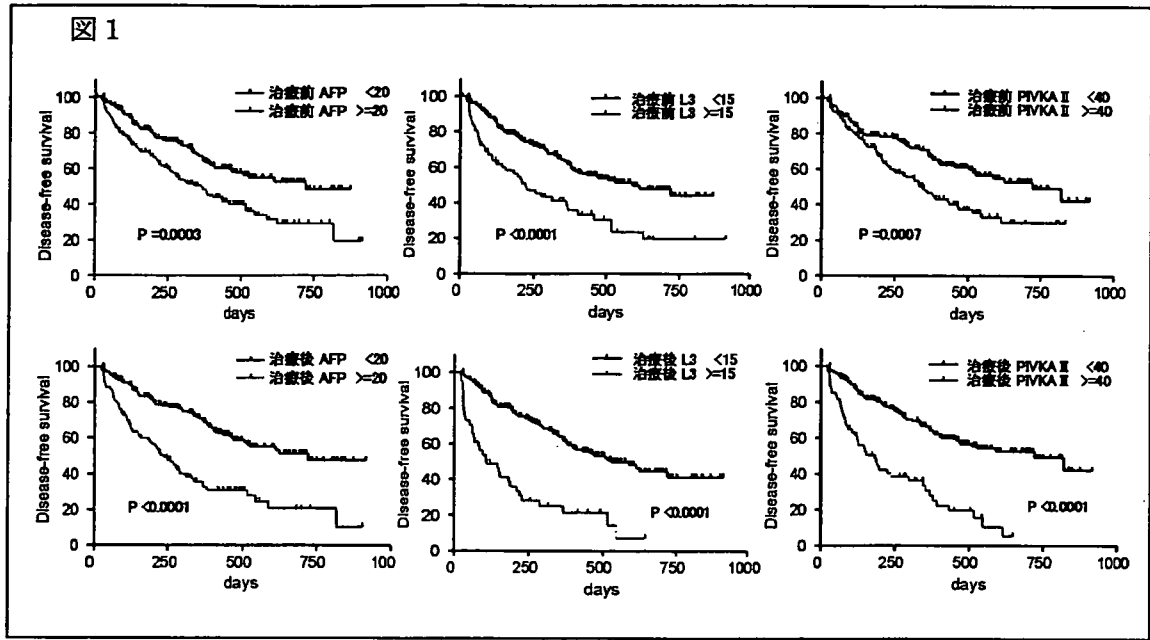


表 2

単変量解析

Variable	Relative risk	p-value
年齢	1.006	0.563
性別 (女性/男性)	1.456	0.058
HBs抗原 (-/+)	0.968	0.888
HCV抗体 (-/+)	0.997	0.490
Child分類 (A,B,C)	1.666-3.744	0.001
腫瘍進展度 (I, II, III, IV)	1.309-5.205	<0.001
治療前AFP (<20/>=20 ng/ml)	1.864	<0.001
治療前AFP-L3 (<15/>=15%)	2.253	<0.001
治療前PIVKA II (<40/>=40mAU/ml)	1.809	0.001

多変量解析

Variable	Relative risk (95%CI)	p-value
Child分類 (A,B,C)	1.887-2.963(1.234-7.460)	0.002
腫瘍進展度 (I, II, III, IV)	1.605-5.639(0.951-11.537)	<0.001
治療前AFP (<20/>=20 ng/ml)	1.098(0.697-1.729)	0.687
治療前AFP-L3 (<15/>=15%)	1.798(1.102-2.933)	0.019
治療前PIVKA II (<40/>=40mAU/ml)	0.959(0.697-1.729)	0.842

比例ハザードモデルを用いて治療後再発の予後規定因子を検討した結果、AFP-L3分画は有意に独立した予後規定因子 (p=0.019) であることを確認した(表2)。③各種治療法別におけるAFP-L3分画の多寡による患者の層別化を行い無再発生存の群間比較を

行った結果、手術療法においては治療前AFP-L3分画の多寡は治療後再発予後に与える影響は確認できなかった(p=0.143)。一方、穿刺治療においては治療前AFP-L3分画の多寡は無再発生存に影響を及ぼすという結果であった(p=0.042)。外科切除もラジオ波

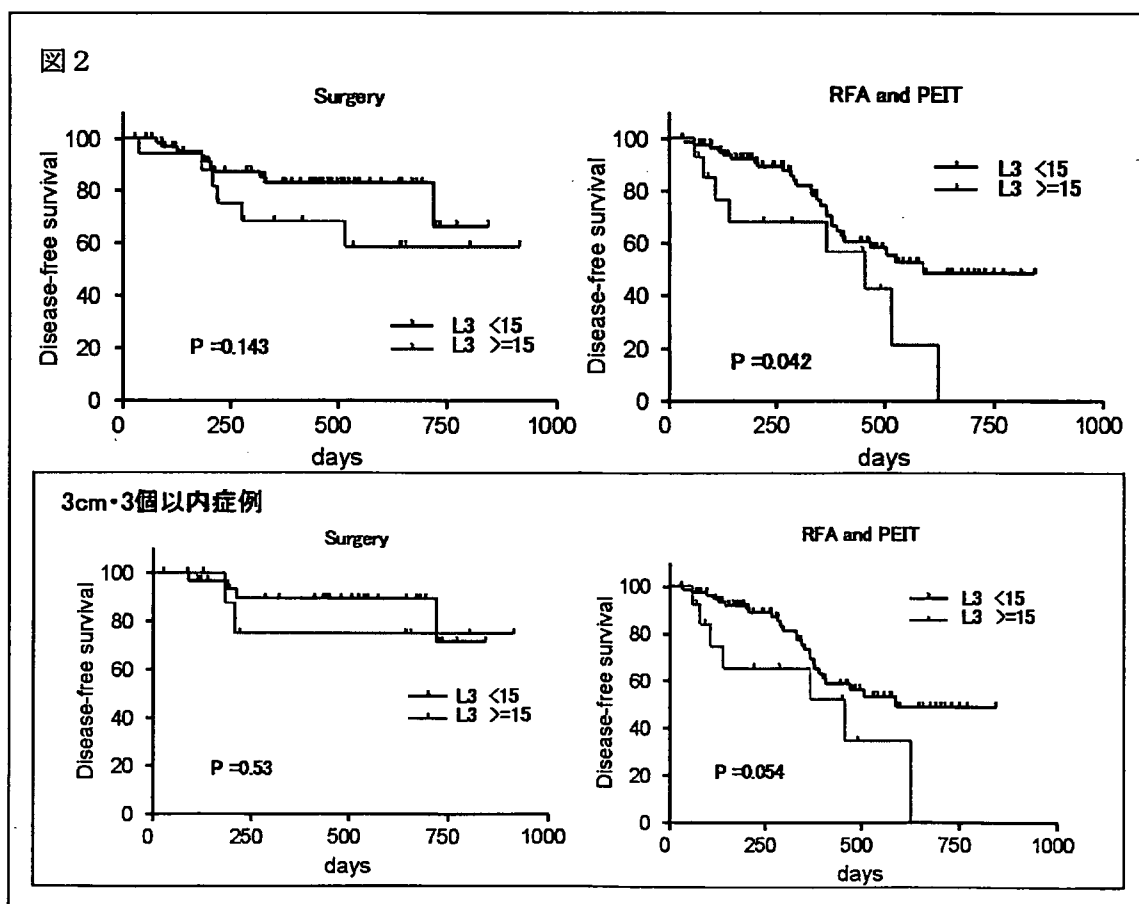
焼灼術も選択可能な3cm・3個以内のHCC症例においても同様の傾向が認められた(図2)。

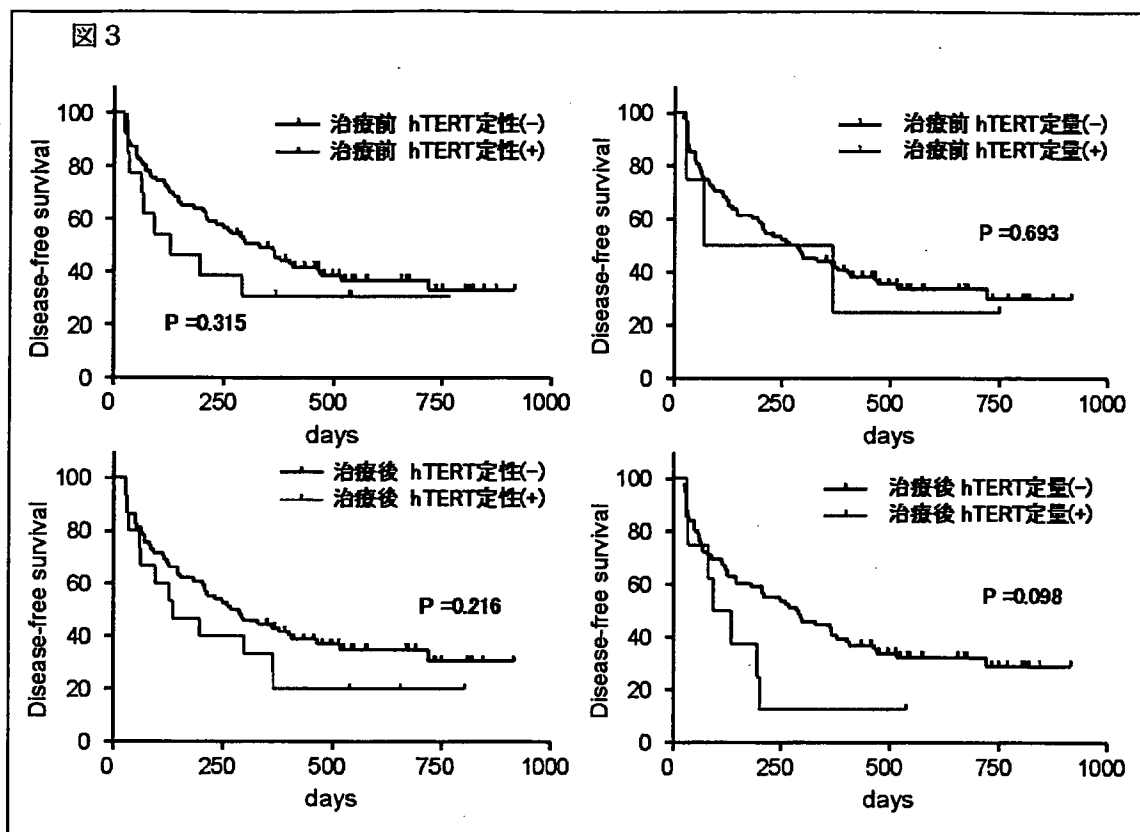
④血中hTERT活性は、定性PCR法では治療前肝癌患者114例中15例に、治療後では93例中16例に陽性症例を認めた。TaqManリアルタイム定量法では治療前肝癌患者102例中5例に、治療後では86例中9例に陽性症例を認めた。陽性症例はいずれの測定法でも少数群であったが、陰性者に比較して無再発生存期間の短縮傾向を認めた(治療前/治療後:hTERT定性PCR法, $p=0.315/p=0.216$; hTERTリアルタイム定量法, $p=0.693/p=0.098$) (図3)。

D. 考察

我々は、平成17年度に行ったHCC症例の生命予後に関する後向き検討において、従来のスコアリングシステムでは予後が同等

と評価される症例の中に、予後良好な症例と不良な症例が混在していることを明らかにし、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。ここでAFP-L3分画は「癌の生物学的悪性度」の指標として働いていると考えられる。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では、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確認した。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根治的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、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。

一般的に後向き検討では、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。そこで平成18年度は、先に得られた後ろ向き検討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検討を行い、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、後ろ向き検討と同様に、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、優れた予後予測能力を発揮することが確認できた。また、Coxモデルを用いた治療後再発の予後規定因子の解析においてもAFP-L3分画は有意に独立した予後規定因子であることが確認された。一方、各治療法別の検討では、手術療法においては治療前AFP-L3分画の多寡は治療後再発予後に与える影響は確認できなかったが、穿刺治療群では（外科切除もラジオ波焼灼術も選択可能な3cm・3個以内のHCC症例においても）、治療前AFP-L3分画の多寡は無再発生存に影響を及ぼすという結果が得られた。

生命予後をアウトカムとする後ろ向き検討と、無再発生存をアウトカムとする前向き検討によって、手術療法においては治療前AFP-L3分画の多寡は予後に影響を与えず、一方、穿刺治療では治療前AFP-L3分画の多

寡が無再発生存，生命予後に影響を及ぼしていることが明らかとなった。これらの知見により，外科切除，穿刺治療のいずれも選択可能なHCCの治療において，AFP-L3分画陽性症例では残肝予備能の範囲内で出来る限り腫瘍制御能の高い外科手術を選択することを推奨し，治療後においては，L3持続陽性症例では腫瘍制御が不完全であることを前提に追加治療を考慮する必要があると考えられた。

非ランダム化ではあるが多施設共同のProspectiveな検討である本研究において，生命予後および治療後再発の観点から，治療法選択のアルゴリズムに生物学的悪性度の指標として腫瘍マーカー，ことにAFP-L3分画を加えることを推奨した。このように，腫瘍マーカーにより治療法を選択するHCC治療アルゴリズムは，現在までその報告例はなく，従来の肝予備力と解剖学的腫瘍進展度のみによるHCC治療アルゴリズムに対する新しい試みである。

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を指標とした血中癌細胞の検出に関しては，hTERT陽性症例数は治療前HCC患者114例中では15例(13.2%)であり，既報(Clin. Cancer Res., 9: 3004-11, 2003)の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($p=0.315$)を認めたが有意差は確認できなかった。血中癌細胞由来hTERTのより正確な検出・評価を目的にTaqManリアルタイムPCR定量での検出を行なったが，同手法でのhTERT陽性感度は，治療前HCC患者102例中5例(4.7%)，治療後HCC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。これらの結果は，抗体結合磁気Beadsを用いた血中癌細胞検出法において，標的となるBer-EP4抗原のHCC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推測される。HCCの生物学的悪性度の指標となるAFP-L3分画と同様，治療アルゴリズムに組み入れることを推定したhTERTを指標とする血中癌細胞の検出は予後予測マーカーとしての臨床応用には更なる改良が必要であると考えられた。

E. 結論

手術療法においては治療前AFP-L3分画の多寡は予後に影響を与えない一方，穿刺治療では治療前AFP-L3分画の多寡が無再発生存，生命予後に影響を及ぼしていることが明らかとなった。これらの知見により，外科切除，穿刺治療のいずれも選択可能なHCCの治療において，AFP-L3分画陽性症例では残肝予備能の範囲内で出来る限り腫瘍制御能の高い外科手術を選択することを推奨し，治療後においては，L3持続陽性症例では腫瘍制御が不完全であることを前提に追加治療を考慮する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oya H, Sato Y, Yamamoto S, Nakatsuka H, Kobayashi T, Hara Y, Waguri N, Suda T, Aoyagi Y, Hatakeyama K. Comparison between human-telomerase reverse

- transcriptase mRNA and alpha-fetoprotein mRNA as a predictive value for recurrence of hepatocellular carcinoma in living donor liver transplantation. *Transplant Proc.* 2006 Dec;38(10):3636-9.
2. Tsuchiya A, Heike T, Baba S, Fujino H, Umeda K, Matsuda Y, Nomoto M, Ichida T, Aoyagi Y, Nakahata T. Long-term culture of postnatal mouse hepatic stem/progenitor cells and their relative developmental hierarchy. *Stem Cells.* 2007;25:895-902.
 3. Maruyama M, Yamamoto T, Kohara Y, Katsuragi Y, Mishima Y, Aoyagi Y, Kominami R. Mtf-1 lymphoma-susceptibility locus affects retention of large thymocytes with high ROS levels in mice after gamma-irradiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 2;354(1):209-15.
 4. Kamimura K, Kobayashi M, Narisawa R, Watanabe H, Sato Y, Honma T, Sekine A, Aoyagi Y. Collagenous gastritis: A case report and endoscopic and pathologic evaluation of the nodularity of Gastric Mucosa. *Dig. Dis. Sci.*, 2007; 52(4):995-1000.
 5. Kamimura K, Mishima Y, Obata M, Endo T, Aoyagi Y, Kominami R. Lack of Bcl11b tumor suppressor results in vulnerability to DNA replication stress and damages. *Oncogene* 2007 30;26(40):5840-50.
 6. Takamura M, Matsuda Y, Yamagiwa S, Tamura Y, Honda Y, Suzuki K, Ichida T, Aoyagi Y. An inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase, SP600125, protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatic failure by modulating BH3-only proteins. *Life Sci.* 2007 Mar 13;80(14):1335-44.
 7. Takamura M, Ichida T, Ohkoshi S, Tsubata S, Osaki A, Aoyagi T, Nomoto M, Uehara K, Terada H, Aoyagi Y. Decompensated lamivudine-resistant Hepatitis B virus related cirrhosis treated successfully with adefovir dipivoxil allowin surgery for hepatocellular carcinoma. *Intern Med.* 2007; 46(7): 367-371.
 8. Honda Y, Yamagiwa S, Matsuda Y, Takamura M, Ichida T, Aoyagi Y. Altered expression of TLR homolog RP105 on monocytes hypersensitive to LPS in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 2007;47(3):404-11.
 9. Yano M, Ikeda M, Abe KI, Dansako H, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Comprehensive Analysis of the Effects of Ordinary Nutrients on Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 ;51(6):2016-27.
 10. Kobayashi M, Kuroiwa T, Suda T, Tamura Y, Kawai H, Igarashi M, Fukuhara Y, Aoyagi Y. The fucosylated fraction of alpha-fetoprotein, L3, as

- a useful prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma with special reference to the low concentration of serum alpha-fetoprotein. *Hepatol Res.* 2007;37(11):914-22.
11. Kamimura K, Ohi H, Kubota T, Okazuka K, Yoshikai Y, Wakabayashi Y, Aoyagi Y, Mishima Y, Kominami R. Haploinsufficiency of Bcl11b for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355(2):538-42.
 12. Aiba T, Takahashi T, Suzuki K, Okoshi S, Nomoto M, Uno K, Aoyagi Y. Liver injury induced by a Japanese herbal medicine, sairei-to (TJ-114, Bupleurum and Hoelen Combination, Chai-Ling-Tang) R1. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22(5):762-3.
 13. Suzuki K, Kawauchi Y, Palaniyandi SS, Veeraveedu PT, Fujii M, Yamagiwa S, Yoneyama H, Han GD, Kawachi H, Okada Y, Ajioka Y, Watanabe K, Hosono M, Asakura H, Aoyagi Y, Narumi S. Blockade of interferon-gamma-inducible protein-10 attenuates chronic experimental colitis by blocking cellular trafficking and protecting intestinal epithelial cells. *Pathol Int.* 2007 Jul;57(7):413-20.
 14. Tsuboi K, Takamura M, Sato Y, Yokoyama H, Takeuchi M, Igarashi M, Kondo D, Omori K, Ogawa A, Takeyama A, Koyama Y, Ajioka Y, Aoyagi Y. Severe acute pancreatitis as an initial manifestation of primary hyperparathyroid adenoma in a pediatric patient. *Pancreas.* 2007 Jul;35(1):100-1.
 15. Yamazaki K, Ohkoshi S, Maruyama M, Aoki YH, Yano M, Kurita S, Suzuki K, Matsuda Y, Sugimura K, Aoyagi Y. Early upsurge in anti-HBs titer possibly caused by the immunomodulative, not by the mutagenetic effect of interferon and ribavirin. *Hepatol Res.* 2007;37(6):477-81.
 16. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saitoh K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Cheng-Hsin C, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 in press.
 17. Hokari M, Matsuda Y, Wakai T, Shirai Y, Sato M, Tsuchiya A, Takamura M, Yamagiwa S, Suzuki K, Ohkoshi S, Ichida T, Kawachi H, Aoyagi Y. Tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 potentiates the anchorage-independent growth of human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci.* 2007, 81:336-345.

18. Nakamura J, Kobayashi K, Toyabe S, Aoyagi Y, Akazawa K. The cost-effectiveness of the new protocol reflecting rapid virologic response to peginterferon alpha-2b and ribavirin for chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Sep;19(9):733-9.
19. Yamazaki K, Suzuki K, Ohkoshi S, Yano M, Kurita S, Aoki Y, Toba K, Takamura M, Yamagiwa S, Matsuda Y, Aoyagi Y. Temporal treatment with interferon- β prevents hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-X gene transgenic mice. *J Hepatol*. 2007, (48)255-265.
20. Oshima T, Kawasaki T, Ohashi R, Hasegawa G, Jiang S, Umezumi H, Aoyagi Y, Iwanari H, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Naito M. Downregulated P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α expression in human colorectal carcinoma is a new prognostic factor against liver metastasis. *Pathology International* 2007, (57):82-90
21. Tsuchiya A, Heike T, Baba S, Fujino H, Umeda K, Matsuda Y, Nomoto M, Ichida T, Aoyagi Y, Nakahata T. Sca-1⁺ endothelial cells (SPECs) reside in the portal area of the liver and contribute to rapid recovery from acute liver disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008, (365)595-601.
22. Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, Honda Y, Takamura M, Sugahara S, Ishikawa T, Ohkoshi S, Sato Y, Aoyagi Y. Sustained response to interferon-alpha plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is closely associated with increased dynamism of intrahepatic natural killer and natural killer T cells. *Hepatol Res*. 2008 Mar 4; [Epub ahead of print]
23. Nakamura J, Toyabe SI, Aoyagi Y, Akazawa K. Economic impact of extended treatment with peginterferon alpha-2a and ribavirin for slow hepatitis C virologic responders. *J Viral Hepat*. 2008 Apr;15(4):293-9.
2. 学会発表
1. 田村 康, 和栗暢夫, 須田剛士, 福原康夫, 小林 真, 五十嵐正人, 川合弘一, 野本 実, 青柳 豊: 肝細胞患者の予後予測におけるテロメラーゼ発現を指標とした末梢血中癌細胞検出の有用性についての検討, 第 42 回日本肝臓学会総会, 2006. 5. 25
2. 田村 康, 和栗暢夫, 須田剛士, 福原康夫, 小林 真, 五十嵐正人, 川合弘一, 野本 実, 青柳 豊: 末梢血中肝細胞癌由来 hTERT の前向き定量測定とその生物学的悪性度指標としての臨床的意義, 第 93 回日本消化器病学会総会, 2007. 4. 19.
3. 田村 康, 栗田 聡, 和栗暢夫, 石川 達, 杉山幹也, 山際 訓, 杉谷想一, 五十嵐健太郎, 大越章吾, 野本 実, 上村朝輝, 青柳 豊: C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療による AFP 値の変動と肝発癌についての検討, 2008. 6. 5 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、肝細胞癌 (HCC) 患者に対して治療前後の AFP-L3 分画ならびに血中 HCC 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、患者の予後改善を図ることを目的とする。平成 18 年度からは前向きに HCC 症例 355 例を登録・追跡調査を行ない、比較的短期間に評価が可能である無再発生存に対する各種腫瘍マーカーの意義について解析を行った。その結果、1) 治療前後における AFP, AFP-L3 分画, PIVKA II は無再発生存期間を有意に層別化した。2) 手術療法では治療前 AFP-L3 分画の多寡が無再発生存予後に与える影響は確認できなかった。一方、穿刺治療では治療前 AFP-L3 分画の多寡が無再発生存に影響を及ぼしており、外科切除もラジオ波焼灼術も選択可能な 3cm・3 個以内の HCC 症例においても同様の傾向が認められた。3) 血中癌細胞 hTERT 活性を RT-PCR 法と TaqMan リアルタイム定量法で検出したところ、陽性症例は陰性者に比較して無再発生存期間の短縮傾向を認めたが、いずれの測定法においても検出感度が低いことが明らかとなった。

以上より、外科切除、穿刺治療のいずれも選択可能な HCC の治療において、AFP-L3 分画陽性症例では残肝予備能の範囲内で出来る限り腫瘍制御能の高い外科手術を選択することを推奨し、治療後においては、AFP-L3 分画持続陽性症例では腫瘍制御が不完全であることを前提に追加治療を考慮する必要があると考えられた。血中 hTERT 活性測定は感度が低く、予後予測マーカーとしての臨床応用には更なる改良が必要であると考えられた。

A. 研究目的

肝細胞癌 (HCC) の生物学的悪性度の指標である血清 AFP-L3 分画、血流中 HCC 細胞のテロメラーゼ (hTERT) 活性の推移による HCC 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、HCC 患者の予後改善を図る一方、HCC 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図る。

B. 研究方法

前向き検討は 2005 年 4 月から 2007 年 10 月

まで4施設(新潟大学, 愛媛大学, 群馬大学, 信州大学)において治療を行った HCC 症例 355 例を対象とし, 治療後予後追跡調査を行った.

各症例は画像所見(CT, AngioCT, US, MRI)により腫瘍進展度(原発性肝癌取扱い規約第4版)を評価し, 治療前肝予備力は血清 Alb, T.Bil, PT および腹水の有無, 肝生脳症の程度により Child-Pugh 分類に従い評価した. 腫瘍マーカーとして治療前および治療2ヶ月後に AFP 濃度, AFP-L3 分画(Liquid Binding Assay 法), PIVKA II 値, 血中 hTERT 活性を測定した.

血中 HCC 細胞の hTERT 活性検出は, 既報(Clin. Cancer Res., 9: 3004-11, 2003)に従い抗体付き磁気 beads で細胞を分離した後, RNA 抽出, cDNA 合成を行い, hTERT および IL-2R 発現の有無より血中癌細胞の評価を行なった. また, これまでの定性 PCR 法での解析と同時に, TaqMan リアルタイム PCR 定量での hTERT 検出を行った (hTERT primer and probe; assay identification number Hs00162669m1). PCR は LightCycler (Roche) を用い, PCR 条件は (95°C 10min) × 1cycle, (95°C 10sec - 60°C 30sec - 72°C 1sec) × 45cycle, (40°C 30sec) × 1cycle とした. 上皮細胞分画もしくは非リンパ球分画での hTERT の指数関数的な signal 増強を認めるものを発現陽性とし, 定量値は GAPDH を内部標準として HepG2 細胞の発現比を基準に算出した.

HCC の治療は第7回 日本肝臓学会大会コンセンサスメETINGで設定された「肝細胞癌治療のアルゴリズム」に従い選択し, 治療後再発の有無は画像所見で確認した. 登録症例を治療前後の AFP 濃度 (<20 /

>=20ng/ml, <200 / >=200ng/ml), AFP-L3 分画 (<15 / >=15%), PIVKA II 値 (<40 / >=40mAU/ml), 血中 hTERT 活性 (+ / -) の多寡によりそれぞれ2群に層別化し, 累積無再発生存を Kaplan-Meier 法で計算し, Logrank 検定で群間比較を行った.

再発は①局所再発; 治療部に接して動脈相で濃染する古典的 HCC の所見を呈する病変を認めるもの②肝内転移再発③多中心性発生再発(②, ③ともに肝癌取扱い規約第4版による定義に従うもの)④遠隔転移再発の4再発形態に分類し, これらいずれかの再発形態を認めたものをアウトカム発生とした. 各種治療法別症例群(手術症例, ラジオ波焼灼症例, 化学塞栓療法)においても AFP-L3 分画の多寡による患者の層別化を行い, 累積無再発生存について群間比較を行った. 特に, 外科切除もラジオ波焼灼術も選択可能な 3cm・3個以内の HCC 症例においても同様の解析を行った. また, 肝予備力(Child-Pugh 分類), 腫瘍進展度, 腫瘍マーカー等の各因子について, Cox 比例ハザードモデルを用いて単変量および多変量解析を行い, 治療後再発の予後規定因子を検討した. これら統計学的解析には SPSS15.0 を用いて解析を行った.

(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

2005年4月から2007年10月まで, 4施設より前向きに HCC 症例 355 例を登録した.

選択した治療は手術療法 109 例，穿刺治療 118 例，穿刺治療＋化学塞栓療法 23 例，化学塞栓療法 61 例，肝動注化学療法 34 例であった。追跡期間は 389 ± 240 日 (Mean \pm SD)，再発評価可能症例 327 例中，再発症例は 155 例，無再発症例は 172 例であった。再発例 155 例の内訳は局所再発 32 例，肝内転移再発 45 例，局所再発＋肝内転移再発 30 例，多中心性再発 35 例，遠隔転移再発 4 例であった。これら前向きに集積した症例において，比較的短期間に評価が可能である無再発生存をアウトカムとする解析から以下の点を明らかにした。

①治療前後 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た (治療前/治療後：AFP， $p=0.0003/p<0.0001$ ；AFP-L3， $p<0.0001/p<0.0001$ ；PIVKA II， $p=0.0007/p<0.0001$)。

②肝予備能 (Child-Pugh 分類)，腫瘍進展度，各種腫瘍マーカー等の各因子について，Cox 比例ハザードモデルを用いて治療後再発の予後規定因子を検討した結果，AFP-L3 分画は有意に独立した予後規定因子 ($p=0.019$) であることを確認した。

③各種治療法別における AFP-L3 分画の多寡による患者の層別化を行い無再発生存の群間比較を行った結果，手術療法においては治療前 AFP-L3 分画の多寡は治療後再発予後に与える影響は確認できなかった ($p=0.143$)。一方，穿刺治療においては治療前 AFP-L3 分画の多寡は無再発生存に影響を及ぼすという結果であった ($p=0.042$)。外科切除もラジオ波焼灼術も選択可能な $3\text{cm} \cdot 3$ 個以内の HCC 症例においても同様の傾向が認められた。

④血中 hTERT 活性は，定性 PCR 法では治療

前肝癌患者 114 例中 15 例に，治療後では 93 例中 16 例に陽性症例を認めた。

TaqMan リアルタイム定量法では治療前肝癌患者 102 例中 5 例に，治療後では 86 例中 9 例に陽性症例を認めた。陽性症例はいずれの測定法でも少数群であったが，陰性者に比較して無再発生存期間の短縮傾向を認めた (治療前/治療後：hTERT 定性 PCR 法， $p=0.315/p=0.216$ ；hTERT リアルタイム定量法， $p=0.693/p=0.098$)。

D. 考察

我々は，平成 17 年度に行った HCC 症例の生命予後に関する後向き検討において，従来のスコアリングシステムでは予後が同等と評価される症例の中に，予後良好な症例と不良な症例が混在していることを明らかにし，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。ここで AFP-L3 分画は「癌の生物学的悪性度」の指標として働いていると考えられる。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では，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確認した。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根治的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，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。

一般的に後向き検討では，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。そこで平成18年度は、先に得られた後ろ向き検討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検討を行い、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、後ろ向き検討と同様に、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、優れた予後予測能力を発揮することが確認できた。また、Coxモデルを用いた治療後再発の予後規定因子の解析においてもAFP-L3分画は有意に独立した予後規定因子であることが確認された。一方、各治療法別の検討では、手術療法においては治療前AFP-L3分画の多寡は治療後再発予後に与える影響は確認できなかったが、穿刺治療群では（外科切除もラジオ波焼灼術も選択可能な3cm・3個以内のHCC症例においても）、治療前AFP-L3分画の多寡は無再発生存に影響を及ぼすという結果が得られた。

生命予後をアウトカムとする後ろ向き検討と、無再発生存をアウトカムとする前向き検討によって、手術療法においては治療前AFP-L3分画の多寡は予後に影響を与えず、一方、穿刺治療では治療前AFP-L3分画の多寡が無再発生存、生命予後に影響を及ぼしていることが明らかとなった。これらの知見により、外科切除、穿刺治療のいずれも選択可能なHCCの治療において、AFP-L3分

画陽性症例では残肝予備能の範囲内で出来る限り腫瘍制御能の高い外科手術を選択することを推奨し、治療後においては、L3持続陽性症例では腫瘍制御が不完全であることを前提に追加治療を考慮する必要があると考えられた。

非ランダム化ではあるが多施設共同のProspectiveな検討である本研究において、生命予後および治療後再発の観点から、治療法選択のアルゴリズムに生物学的悪性度の指標として腫瘍マーカー、ことにAFP-L3分画を加えることを推奨した。このように、腫瘍マーカーにより治療法を選択するHCC治療アルゴリズムは、現在までその報告例はなく、従来 of 肝予備力と解剖学的腫瘍進展度のみによるHCC治療アルゴリズムに対する新しい試みである。

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を指標とした血中癌細胞の検出に関しては、hTERT陽性症例数は治療前HCC患者114例中では15例(13.2%)であり、既報(Clin. Cancer Res., 9: 3004-11, 2003)の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($p=0.315$)を認めたが有意差は確認できなかった。血中癌細胞由来hTERTのより正確な検出・評価を目的にTaqManリアルタイムPCR定量での検出を行なったが、同手法でのhTERT陽性感度は、治療前HCC患者102例中5例(4.7%)、治療後HCC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。これらの結果は、抗体結合磁気Beadsを用いた血中癌細胞検出法において、標的となるBer-EP4抗原のHCC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推測される。HCC の生物学的悪性の指標となる AFP-L3 分画と同様、治療アルゴリズムに組み入れることを推定した hTERT を指標とする血中癌細胞の検出は予後予測マーカーとしての臨床応用には更なる改良が必要であると考えられた。

E. 結論

手術療法においては治療前 AFP-L3 分画の多寡は予後に影響を与えない一方、穿刺治療では治療前 AFP-L3 分画の多寡が無再発生存、生命予後に影響を及ぼしていることが明らかとなった。これらの知見により、外科切除、穿刺治療のいずれも選択可能な HCC の治療において、AFP-L3 分画陽性症例では残肝予備能の範囲内で出来る限り腫瘍制御能の高い外科手術を選択することを推奨し、治療後においては、L3 持続陽性症例では腫瘍制御が不完全であることを前提に追加治療を考慮する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Michitaka K, Horiike N, Duong T, 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* 50: 150-155, 2007
2. Shigematsu S, Kumagi T, Hiasa Y, Yoshida T, Hirooka M, Tokumoto Y, Matsuura B, Michitaka K, Horiike N, Tohyama T, Onji M: Development of Hepatocellular Carcinoma (HCC) in a Patient 17 Years after Recovery from Chronic Hepatitis B and Seroconversion to Anti-HBs. *Internal Medicine* 46: 29-33, 2007
3. Matsuura K, Michitaka K, Yamauchi K, Nadano S, Okada S, Matsuura B, Hiasa Y, Horiike N, Onji M: Characteristics of geographic distributions and route of infection for hepatitis B virus genotype D in Ehime area in western Japan. *Hepatology Research* 37(4): 255-262, 2007
4. Konishi I, Horiike N, Hiasa Y, Tokumoto Y, Mashiba T, Michitaka K, Miyake Y, Nonaka S, Joukou K, Matsuura B, Onji M: Diabetes mellitus reduces the therapeutic effectiveness of interferon α 2b plus ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Research* 37:331-336, 2007
5. Mashiba T, Udaka K, Hirachi Y, Hiasa Y, Miyakawa T, Satta Y, Osoda T, Kataoka S, Kohara M, Onji M: Identification of CTL epitopes in hepatitis C virus by a genome-wide computational scanning and a rational design of peptide vaccine. *Immunogenetics* 59: 197-209, 2007
6. Nakanishi S, Matsuura B, Hirooka M, Ueda T, Niiya T, Furukawa S, Abe M, Hiasa Y, Kubo Y, Onji M: Clinical usefulness of quantitative evaluation of visceral fat by ultrasonography. *Journal of Medical Ultrasonics* 34: 151-157, 2007

7. Sk. Md. Fazle Akbar, Furukawa S, Yoshida O, Hiasa Y, Horiike N, Onji M: Induction of anti-HBs in HB vaccine nonresponders in vivo by hepatitis B surface antigen-pulsed blood dendritic cells. *Journal of Hepatology* 47: 60-66, 2007
8. Uehara T, Hirooka M, Ishida K, Hiraoka A, Kumagi T, Kisaka Y, Hiasa Y, Onji M: Percutaneous ultrasound-guided radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma with artificially induced pleural effusion and ascites. *Journal of Gastroenterology* 42: 306-311, 2007
9. Tokumoto Y, Hiasa Y, Horiike N, Michitaka K, Matsuura B, Raymond T. Chung, Onji M: Hepatitis C Virus Expression and Interferon Antiviral Action is Dependent on PKR Expression. *Journal of Medical Virology* 79: 1120-1127, 2007

2. 学会発表

なし

G. 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 田中 榮司 国立大学法人信州大学 消化器内科学分野 教授

研究要旨

本研究は、肝細胞癌 (HCC) 患者に対して治療前後の AFP-L3 分画ならびに血中 HCC 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、患者の予後改善を図ることを目的とする。平成 18 年度からは前向きに HCC 症例 355 例を登録・追跡調査を行ない、比較的短期間に評価が可能である無再発生存に対する各種腫瘍マーカーの意義について解析を行った。その結果、1) 治療前後における AFP, AFP-L3 分画, PIVKA II は無再発生存期間を有意に層別化した。2) 手術療法では治療前 AFP-L3 分画の多寡が無再発生存予後に与える影響は確認できなかった。一方、穿刺治療では治療前 AFP-L3 分画の多寡が無再発生存に影響を及ぼしており、外科切除もラジオ波焼灼術も選択可能な 3cm・3 個以内の HCC 症例においても同様の傾向が認められた。3) 血中癌細胞 hTERT 活性を RT-PCR 法と TaqMan リアルタイム定量法で検出したところ、陽性症例は陰性者に比較して無再発生存期間の短縮傾向を認めたが、いずれの測定法においても検出感度が低いことが明らかとなった。

以上より、外科切除、穿刺治療のいずれも選択可能な HCC の治療において、AFP-L3 分画陽性症例では残肝予備能の範囲内で出来る限り腫瘍制御能の高い外科手術を選択することを推奨し、治療後においては、AFP-L3 分画持続陽性症例では腫瘍制御が不完全であることを前提に追加治療を考慮する必要があると考えられた。血中 hTERT 活性測定は感度が低く、予後予測マーカーとしての臨床応用には更なる改良が必要であると考えられた。

A. 研究目的

肝細胞癌 (HCC) の生物学的悪性度の指標である血清 AFP-L3 分画、血流中 HCC 細胞のテロメラーゼ (hTERT) 活性の推移による HCC 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、HCC 患者の予後改善を図る一方、HCC 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図る。

B. 研究方法

前向き検討は 2005 年 4 月から 2007 年 10 月