

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 Hs00162669ml)。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。

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($p=0.315$)を認めたと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. 研究発表

1. 論文発表

1. Umemura T, Muto H, Tanaka E, Matsumoto A, Ichijo T, Yoshizawa K, Akamatsu T, Kiyosawa K, and the Nagano Interferon Treatment Research Group. Anti-Helicobacter seropositivity: influence on severity and treatment response in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepatitis* 14: 48-54, 2007
2. Yokosawa S, Yoshizawa K, Ota M, Katsuyama Y, Kawa S, Ichijo T, Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K. A genomewide DNA microsatellite association study of Japanese patients with autoimmune hepatitis type 1. *Hepatology* 45: 384-390, 2007
3. Umemura T, Ota M, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ichijo T, Tanaka E, Kawa S, Kiyosawa K. Lack of association between FCRL3 and Fc γ RII polymorphisms in Japanese type 1 autoimmune hepatitis. *Clin Immunol* 122: 338-342, 2007
4. Tanaka N, Horiuchi A, Yamaura T, Komatsu M, Tanaka E, Kiyosawa K. Efficacy and safety of 6-month iron reduction therapy in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis: a pilot study. *J Gastroenterol* 42: 49-55, 2007
5. Fujiwara K, Yokosuka O, Imazeki F, Miki M, Suzuki K, Okita K, Tanaka E, Omata M: Genetic analysis of hepatitis A virus protein 2C in sera from patients with fulminant and self-limited hepatitis A. *Hepato-Gastroenterology* 54: 871-877, 2007
6. Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, Tokanoue T, Yatsushashi H, Nagaoka S, Suzuki F, Kobayashi M, Chayama K, Imamura M, Yotsuyanagi H, Nakaoka S, Maki N, Kawata S, Kumada H, Iino S, Kiyosawa K: Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of

lamivudine therapy. *Hepatol Res* 37:
661-666, 2007

7. Tanaka N, Sano K, Horiuchi A, Tanaka E, Kiyosawa K, Aoyama T: Highly-purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* (in press)

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 高木 均 国立大学法人群馬大学 病態制御内科学分野 准教授

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。

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. 研究発表

1. 論文発表

1. Kosone T, Takagi H, Horiguchi N, Toyoda M, Sohara N, Kakizaki S, Sato K, Nishiyama U, Kuwaki T, Mori M. Hepatocyte growth factor accelerates thrombopoiesis in transgenic mice. *Lab Invest.* 87: 284-291, 2007
2. Kakizaki S, Sohara N, Sato K, Suzuki H, Yanagisawa M, Nakajima H, Takagi H, Naganuma A, Otsuka T, Takahashi H, Hamada T, and Mori M. Preventive effects of vitamin K on recurrent

disease in patients with hepatocellular carcinoma arising from hepatitis C viral infection. *J Gastroenterol Hepatol*, 22: 518-522, 2007

3. Yamazaki Y, Kakizaki S, Sohara N, Sato K, Takagi H, Arai H, Abe T, Katakai K, Kojima A, Matsuzaki Y and Mori M. Hepatocellular carcinoma in young adults- The clinical characteristics, prognosis and the findings of a patient survival analysis. *Dig Dis Sciences*, 52: 1103-1107, 2007
4. Takizawa D, Kakizaki S, Sohara N, Sato K, Takagi H, Arai H, Katakai K, Kojima A, Matsuzaki Y, Mori M. Hepatocellular Carcinoma with Portal Vein Tumor Thrombosis: Clinical Characteristics, Prognosis, and Patient Survival Analysis. *Dig Dis Sci.* 52: 3290-3295, 2007
5. Kosone T, Takagi H, Horiguchi N, Ariyama Y, Otsuka T, Sohara N, Kakizaki S, Sato K, Mori M. HGF ameliorates a high-fat diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293: G204- 210, 2007
6. Kosone T, Takagi H, Horiguchi N, Kakizaki S, Sato K, Watanabe Y, Mori M. Transforming growth factor-alpha accelerates hepatocyte repopulation after hepatocyte transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 23: 260-266, 2008
7. Hashizume H, Sato K, Takagi H,

- Hirokawa T, Kojima A, Sohara N, Kakizaki S, Mochida Y, Shimura T, Sunose Y, Ohwada S, and Masatomo Mori M. Primary liver cancers with nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19: 827-834, 2007
8. Hagiwara S, Otsuka T, Yamazaki Y, Kosone T, Sohara N, Ichikawa T, Sato K, Kakizaki S, Takagi H, Mori M. Overexpression of NK2 promotes liver fibrosis in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. *Liver Int.* 28:126-131, 2008
9. Kakizaki S, Sohara N, Yamazaki Y, Horiguchi N, Kanda D, Kabeya K, Katakai K, Sato K, Takagi H, Mori M. Elevated plasma resistin concentration in patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 23: 73-77, 2008

2. 学会発表

なし

G. 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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	Transplan t Proc.	Dec;38 (10):3	636-9.	2006
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.	;25:	895-90 2.	2007
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.	2;354 (1):.	209-15	2007
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.	52(4) :	995-10 00.	2007;
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	30;26 (40):	5840-5 0	2007
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.	Mar 13:80 (14):	1335-4 4	2007
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.	46(7) :	367-37 1.	2007;

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.	47(3)	404-11	2007
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.	51(6)	:2016-27.	2007
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.	37(11)	914-22	2007
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.	355(2)	538-42	2007
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.	:22(5)	762-3.	2007
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.	Jul;57(7):	413-20	2007
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.	Jul;35(1)	100-1.	2007

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.	37(6)	477-81	2007
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 .Gastro enterol . Hepatol.			2007 in press.
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 potentates the anchorage-independent growth of human hepatoma HepG2 cells.	Life Sci.	81:	336-345.	2007
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.	Sep;19(9)	733-9.	2007
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.	(48);	255-265	2007
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.	(365)	595-601	2008

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.	Mar 4		2008
Oshima T, Kawasaki T, Ohashi R, Hasegawa G, Jiang S, Umezu 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	(57):	82-90	2007
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.	Apr;15(4):	293-9	2008
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
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
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
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

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
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
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
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
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
Umemura T, Muto H, Tanaka E, Matsumoto A, Ichijo T, Yoshizawa K, Akamatsu T, Kiyosawa K, and the Nagano Interferon Treatment Research Group.	Anti-Helicobacter seropositivity: influence on severity and treatment response in patients with chronic hepatitis C.	J Viral Hepatitis	14:	48-54	2007
Yokosawa S, Yoshizawa K, Ota M, Katsuyama Y, Kawa S, Ichijo T, Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K.	A genomewide DNA microsatellite association study of Japanese patients with autoimmune hepatitis type 1.	Hepatology	45:	384-390	2007

Umemura T, Ota M, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ichijo T, Tanaka E, Kawa S, Kiyosawa K.	Lack of association between FCRL3 and Fc γ RII polymorphisms in Japanese type 1 autoimmune hepatitis.	Clin Immunol	122:	338-342,	2007
Tanaka N, Horiuchi A, Yamaura T, Komatsu M, Tanaka E, Kiyosawa K.	Efficacy and safety of 6-month iron reduction therapy in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis: a pilot study.	J Gastroenterol	42:	49-55,	2007
Fujiwara K, Yokosuka O, Imazeki F, Miki M, Suzuki K, Okita K, Tanaka E, Omata M.	Genetic analysis of hepatitis A virus protein 2C in sera from patients with fulminant and self-limited hepatitis A.	Hepato-Gastroenterology	54:	871-877,	2007
Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, Tokanoue T, Yatsushashi H, Nagaoka S, Suzuki F, Kobayashi M, Chayama K, Imamura M, Yotsuyanagi H, Nakaoka S, Maki N, Kawata S, Kumada H, Iino S, Kiyosawa K.	Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy.	Hepatol Res	37	661-666	2007
Tanaka N, Sano K, Horiuchi A, Tanaka E, Kiyosawa K, Aoyama T.	Highly-purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis.	J Clin Gastroenterol			2007 (in press)
Kosone T, Takagi H, Horiguchi N, Toyoda M, Sohara N, Kakizaki S, Sato K, Nishiyama U, Kuwaki T, Mori M.	Hepatocyte growth factor accelerates thrombopoiesis in transgenic mice.	Lab Invest.	87:	284-291	2007
Kakizaki S, Sohara N, Sato K, Suzuki H, Yanagisawa M, Nakajima H, Takagi H, Naganuma A, Otsuka T, Takahashi H, Hamada T, and Mori M.	Preventive effects of vitamin K on recurrent disease in patients with hepatocellular carcinoma arising from hepatitis C viral infection.	J Gastroenterol Hepatol,	22:	518-522	2007

Yamazaki Y, Kakizaki S, Sohara N, Sato K, Takagi H, Arai H, Abe T, Katakai K, Kojima A, Matsuzaki Y and Mori M.	Hepatocellular carcinoma in young adults- The clinical characteristics, prognosis and the findings of a patient survival analysis.	Dig Dis Sciences,	52:	1103-1107,	2007
Takizawa D, Kakizaki S, Sohara N, Sato K, Takagi H, Arai H, Katakai K, Kojima A, Matsuzaki Y, Mori M.	Hepatocellular Carcinoma with Portal Vein Tumor Thrombosis: Clinical Characteristics, Prognosis, and Patient Survival Analysis.	Dig Dis Sci.	52:	3290-3295,	2007
Kosone T, Takagi H, Horiguchi N, Ariyama Y, Otsuka T, Sohara N, Kakizaki S, Sato K, Mori M.	HGF ameliorates a high-fat diet-induced fatty liver.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.	293:	G204-210	2007
Kosone T, Takagi H, Horiguchi N, Kakizaki S, Sato K, Watanabe Y, Mori M.	Transforming growth factor-alpha accelerates hepatocyte repopulation after hepatocyte transplantation.	J Gastroenterol Hepatol	23:	260-266,	2008
Hashizume H, Sato K, Takagi H, Hirokawa T, Kojima A, Sohara N, Kakizaki S, Mochida Y, Shimura T, Sunose Y, Ohwada S, and Masatomo Mori M.	Primary liver cancers with nonalcoholic steatohepatitis.	Eur J Gastroenterol Hepatol	19:	827-834,	2007
Hagiwara S, Otsuka T, Yamazaki Y, Kosone T, Sohara N, Ichikawa T, Sato K, Kakizaki S, Takagi H, Mori M.	Overexpression of NK2 promotes liver fibrosis in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury.	Liver Int.	28:	126-131,	2008
Kakizaki S, Sohara N, Yamazaki Y, Horiguchi N, Kanda D, Kabeya K, Katakai K, Sato K, Takagi H, Mori M.	Elevated plasma resistin concentration in patients with liver cirrhosis.	J Gastroenterol Hepatol.	23:	73-77,	2008

Comparison Between Human-Telomerase Reverse Transcriptase mRNA and α -Fetoprotein mRNA as a Predictive Value for Recurrence of Hepatocellular Carcinoma in Living Donor Liver Transplantation

H. Oya, Y. Sato, S. Yamamoto, H. Nakatsuka, T. Kobayashi, Y. Hara, N. Waguri, T. Suda, Y. Aoyagi, and K. Hatakeyama

ABSTRACT

Objective. In this study we compared the potential roles of preoperative human-telomerase reverse transcriptase (h-TERT) mRNA versus α -fetoprotein (AFP) mRNA expression in the peripheral blood as a tool to predict prognosis and tumor recurrence after living donor liver transplantation (LDLT) in hepatocellular carcinoma (HCC) patients.

Patients and Methods. We examined 14 patients with unresectable HCC who underwent LDLT. Six patients displayed stage IVA HCC that deviated from the Milan criteria, while the rest of the patients fell within the limitations of the Milan criteria. We analyzed the relationship between preoperative h-TERT mRNA or AFP mRNA expression in the peripheral blood and survival without recurrence.

Results. There was no significant difference between the survival curves without recurrence of those patients who did versus did not meet the Milan criteria. There was also no significant difference between the survival curves without recurrence among patients with positive versus negative AFP mRNA expression. However, there was a significant difference ($P = .005$) between the survival curves without recurrence of those patients with positive preoperative h-TERT mRNA expression versus those who either had an initially negative preoperative h-TERT mRNA or who converted from positive to negative after neoadjuvant immunochemotherapy.

Conclusions. h-TERT mRNA seemed to prove more valuable than AFP mRNA not only to assess preoperative treatment modalities and postoperative patient surveillance, but also to evaluate prospective LDLT patients with HCC. Moreover, use of h-TERT

From the Division of Digestive and General Surgery, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan.

Address reprint requests to Hiroshi Oya, MD, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 1-757 Asahimachi-Dori, Niigata 9518510, Japan.

0041-1345/06/\$—see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2006.10.172

© 2006 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

mRNA could potentially expand the indications for transplantation to patients outside the Milan criteria.

RECURRENCE OF hepatocellular carcinoma (HCC) remains the major problem in liver transplantation.^{1,2} One reason for tumor relapse is the dissemination of cancer cells from native diseased liver into the patient's systemic circulation. We have reported that the detection of α -fetoprotein (AFP) mRNA in peripheral blood using nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) could be a useful predictor of HCC recurrence.³ However, the specificity of this test was limited, since AFP mRNA is detectable in the mononuclear cell fraction of dendritic cells and since the cell source of this AFP mRNA is unclear. We have also reported that detection of human telomerase reverse transcriptase (h-TERT) mRNA after immunomagnetic separation is a specific and sensitive tool to detect HCC cells.^{4,5} We postulated that our findings might suggest the use of h-TERT mRNA to detect metastatic disease. In this study, we compared the potential use of preoperative h-TERT mRNA versus AFP mRNA expression in peripheral blood as a tool to predict prognosis and tumor recurrence after living donor liver transplantation (LDLT) among HCC patients.

PATIENTS AND METHODS

Fourteen patients with unresectable HCC underwent LDLT from July 1999 to February 2006. Six patients with stage IVA HCC deviated from the criteria set forth by Mazzaferro et al,⁶ while the remaining patients fell within those limitations. Seven patients had HCC with hepatitis type C, 6 patients with hepatitis type B, and 1 patient with primary sclerosing cholangitis. Median follow-up was 54 months (range, 5–72 months). The pre- and postoperative peripheral blood samples of 14 patients were examined for the presence of h-TERT mRNA and AFP mRNA. The methods for the quantitative h-TERT and RT-PCR assays have been described previously.⁴ In addition to LDLT, 4 patients who had positive

preoperative h-TERT mRNA expression were also offered neoadjuvant and adjuvant immunochemotherapy consisting of 5-FU, adriamycin, and interferon β , as previously described.⁷ We examined the effects of neoadjuvant and adjuvant immunochemotherapy on the outcomes of patients who underwent LDLT for HCC. We also analyzed the relationship between h-TERT mRNA and AFP mRNA expression in the peripheral blood and survival without recurrence. A value of $P < .05$ was considered significant.

RESULTS

h-TERT mRNA was detected preoperatively in 7 patients. Preoperative h-TERT mRNA disappeared in 2 of the 4 patients who did not fit the Milan criteria and received neoadjuvant immunochemotherapy. One of these patients survives tumor-free at 72 months. The other patient died after 7 months due to sepsis, but without tumor recurrence. The other 2 patients who had detectable levels of h-TERT mRNA after neoadjuvant immunochemotherapy died 7 and 8 months after LDLT because of lung metastases. There were 3 patients who fell within the Milan criteria and had h-TERT mRNA detected preoperatively. One patient developed lung and graft metastasis, and died 10 months after LDLT. The other patient died of sepsis at 4 months after LDLT. The last patient is alive but had a lung metastasis excised at 12 months after LDLT.

In contrast, h-TERT mRNA was negative preoperatively in 7 patients, 5 within the Milan criteria and the rest outside. All patients are alive without recurrence except for 1 patient who developed multiple organ failure immediately after LDLT. AFP mRNA was detected in only 2 patients preoperatively. One patient disappeared after neoadjuvant immunochemotherapy and survived without tumor recurrence. The other patient who had a positive AFP mRNA

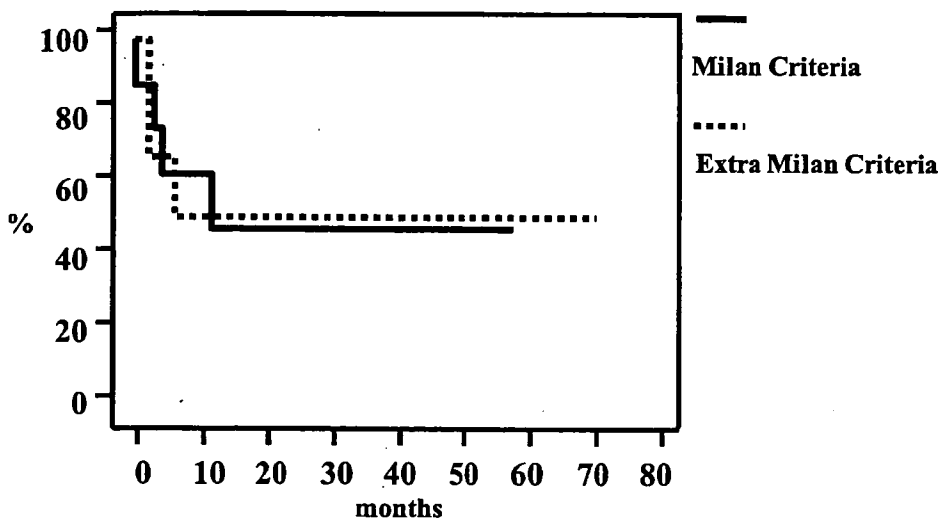


Fig 1. Comparison of recurrence-free survival between the Milan criteria group and extra Milan criteria group.