

200831013A

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

ウイルス肝炎による肝がんの再発防止メカニズムの
解明に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小俣 政男

(東京大学医学部附属病院消化器内科 教授)

平成 21(2009)年 3 月

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

ウイルス肝炎による肝がんの再発防止メカニズムの
解明に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小俣 政男

平成 21 (2009) 年 3 月

「ウイルス肝炎による肝がんの再発防止メカニズムの解明に関する研究」にあたって

肝細胞癌による死亡者は現在、年間 34,000 人にのぼる。殊に新規発癌もさることながら、長期生存者の増加と共に再発の症例が著増している。肝細胞癌の原因はウイルス性、特にその 8 割が C 型肝炎ウイルスによる事例においては、既に多くの症例において発癌時に肝硬変の結節が存在し、その結節から新たな、且つとめどもない再発が起こってきている。この臨床的並びに分子病理学的研究、及びその対策は、直接的に肝癌患者さんの予後を改善しうる。

本研究班においては、この再発の基礎的及び臨床的特徴を明らかにし、再発抑制対策に取り組んでいる。その成果を、今後の医療の現場及び国民の健康福祉の増進に寄与する事ができればと考えている。

平成 21 年 3 月

肝炎等克服緊急対策研究事業
「ウイルス肝炎による肝がんの再発防止
メカニズムの解明に関する研究」

主任研究者 小俣政男

目 次

I. 総括研究報告	1
	研究代表者 小俣政男
II. 分担研究報告	
1.	4
	東京大学医学部附属病院 吉田晴彦、椎名秀一朗、建石良介 千葉大学医学部附属病院 金井文彦
2.	7
	国立病院機構長崎医療センター 石橋大海
3.	9
	国立国際医療センター戸山病院 正木尚彦
4.	15
	杏林大学医学部腫瘍内科 古瀬純司
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
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

ウイルス肝炎による肝がんの再発防止メカニズムの解明に関する研究

研究代表者 小俣政男 東京大学医学部附属病院消化器内科 教授

研究要旨：

異時性および同時性多発肝癌について、癌結節の LOH を解析することによって、クロナリティの解析が可能であることを示した。今後症例を増やし、多中心性新規発癌と肝内微小転移それぞれについてリスク要因を解明し、再発防止治療の有効性を実証していくことが課題である。また、一塩基多型と肝発癌との網羅的検討においては 12 の候補 SNP が選択され、今後、別のコホートにおける検証を予定している。

研究分担者：

石橋大海：国立病院機構長崎医療センター
臨床研究センター長
正木尚彦：国立国際医療センター戸山病院
第二消化器科医長
古瀬純司：杏林大学医学部内科学腫瘍科 教授
金井文彦：千葉大学医学部附属病院消化器内科
講師
吉田晴彦：東京大学医学部附属病院消化器内科
講師
椎名秀一朗：東京大学医学部附属病院消化器内科
講師
建石良介：東京大学医学部附属病院消化器内科
助教

の構築につながるものと考え。

B. 研究方法

1. 癌結節における遺伝子異常の解明

大腸癌や膵癌などでは特徴的な遺伝子異常が報告知られているが、肝癌に特異的な遺伝子異常の報告はほとんどない。昨年度までに田中・金井・吉田らは高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて、ヒト肝癌細胞株における遺伝子コピー数の増幅や欠失等の遺伝子異常を網羅的に解析し、ついでその成績に基づいて、ヒト肝癌腫瘍生検 70 検体について遺伝子異常を調べた。その結果、遺伝子 GRHL2 のコピー数増幅が肝癌再発と有意に関連していることを見出し、報告した。

レーザーマイクロダイセクション法により癌部と非癌部を切出し、癌部の遺伝子異常を調べることにより、異時性肝癌のクロナリティの解析を行った。当院で初発肝癌および再発肝癌が切除された 6 症例 17 結節について、肝細胞癌で LOH (Loss of Heterozygosity) の頻度が高いと報告されている 11 領域について各 2 サイト、計 22 サイトについて、Taqman SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems) をもちいてジェノタイピングを行った。背景肝でヘテロであり、癌部でホモとなっている遺伝子サイトを LOH と判断した。ここで、癌結節における LOH の不可逆性に注目し、初発癌で

A. 研究目的

診断法・治療法の発達により肝癌の予後は 5 年生存率 40%前後にまで改善された。しかし、根治的治療後においてさえも年率 15~20%に及ぶ頻繁な再発が肝癌予後の更なる改善を阻んでいる。本研究では、肝癌再発のメカニズムを解明することにより肝癌の予後改善を目指している。具体的には、発達した分子生物学的手法を用いて、先天的遺伝素因および癌結節の後天的遺伝子異常を解析して、肝癌再発についての臨床データベースと連結して、肝癌再発機序の網羅的解明を目指す。これらの解析によって得られる情報は、個々の患者について再発防止措置を最適化したテーラーメイド医療

みられた LOH が再発癌で見られない場合は、同一クローンではないと考えた。LOH プロフィールにおいて、同一クローンと考えて矛盾がない場合には、異なるクローンの結節同士が偶然にそのような LOH プロフィールを持つ確率を計算した。また、確認のため肝癌で頻度が高いとされる TP53 のエクソン 5-8 および β カテニン のエクソン 3 の変異解析も行った。

2. 一塩基多型 (SNP) 解析

Genomic な一塩基多型が肝癌の再発を含めた予後に及ぼす影響については、90 万ヶ所の SNP 座を同時に解析できるマイクロアレイを用いて、網羅的解析開始した。今回は、当院で加療した C 型肝炎細胞癌症例で、男性、飲酒量 50g/日未満の条件を満たすもののうち、発症年齢が若い順に 49 症例を解析対象とした。肝細胞癌発症年齢は、平均 60 歳 (46-67 歳) であった。遺伝子解析への同意をえられた患者血液から抽出した白血球 DNA を Affymetrix SNP6.0 により解析し、共同研究先である東京大学ヒト SNP タイピングセンターにある健康者コントロール 184 例と比較した。

C. 研究結果

1. 癌結節の遺伝子異常の検討

非癌部では、各症例で、22 サイト中 8 から 11 サイトがヘテロであった。癌部 17 結節において、0 から 5 サイトに LOH を認めた。初発および再発がそれぞれ単発であった 4 症例に関しては、初発と再発でほぼ同様な LOH パターンであり、肝内転移と判断された。このうち、2 症例では、それぞれ TP53L257R、 β カテニン H36P という同じ変異を、初発癌結節、再発癌結節ともに認め、LOH 解析の結果を裏付ける結果であった。また、初発、再発のいずれかが多発であった 2 症例に関しては、LOH プロフィールが異なり、多中心性発癌と考えられた。

2. 肝癌再発に関与する SNP の検討

解析した SNP サイトのうち、call rate がコントロール群で 100%、症例群で 95% 以上、Hardy-Weinberg 平衡検定がコントロール群で 0.1% 以上、マイナーアレル頻度がコントロール群および症例群で 1% 以上という条件を満たす SNP サイトは、415,320 サイトあった。そのうち、アレル頻度解析で、p 値が 10^{-4} 以下となるサイトが 55 個、 10^{-5} 以下が 9 個、 10^{-6} 以下が 1 個という結果

であった。アレル頻度解析で、p 値が 10^{-4} 以下となるサイトのうち、優劣性解析のいずれかが 10^{-4} 以下となり、ジェノタイプ解析でも 10^{-4} 以下となるサイトが 12 個あり、これらの SNP サイトが肝発癌に関与する可能性が示唆された。

有意な 12 サイトのうち、Taqman SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems) で解析が可能な 7 個のプロンプを入手し、異なるコホートである C 型肝炎発癌あり 83 症例、発癌なし 114 症例でタイピングを行い、validation を行っている。

D. 考察

肝癌再発の機序としては、多中心性の新規発癌と微小肝内転移の二つがあると考えられている。従来、再発癌が初発癌よりも低分化である場合に微小肝内転移が疑われてきたが、今回の LOH による解析では、このような病理所見による分類は必ずしも正確でないことが判明した。単発肝癌切除後 6.5 年を経て再発した肝癌が初発癌と同一クローンと判定された症例がある一方で、同時多発肝癌の癌結節がそれぞれ異なるクローンと考えられた症例もみられた。新規発癌と微小残存癌では、有効な対策が異なり、前者に対しては抗ウイルス療法による発癌抑止が有効と考えられるが、微小残存癌に対してはアジュバントとしての抗腫瘍療法が必要であろう。現状においては、両者が区別されず、正確な治療効果判定もできない。今後、症例を増やすことにより、それぞれの再発様式についてリスク解析を行い、可能性の高い再発機序に応じた抑止療法を構築することが重要であると考えられた。

遺伝子多型の解析では、アレル頻度解析で p 値が 10^{-4} 以下となり、かつ優劣性解析のいずれかで p 値が 10^{-4} 以下となり、ジェノタイプ解析でも p 値が 10^{-4} 以下となるサイトが 12 個あり、肝発癌に関連する可能性の高い SNP サイトと考えられた。これらについては今後異なるコホートにおける検証が必要であり、Taqman SNP Genotyping Assays 用のプロンプを入手して準備を整えている。

E. 結論

本年度の研究では、異時性および同時性多発肝癌について、癌結節の LOH を解析することによって、クロナリティの解析が可能であることを示した。今後症例を増やし、多中心性新規発癌と肝内微小転移それぞれについてリスク要因を解明し、再発防止治療の有効性を実証していくことが課題である。また、一塩基多型と肝癌との網羅的検討においては 12 の候補 SNP が選択され、今後別のコホートにおける検証を予定している。

F. 健康危険情報
分担研究報告書参照

G. 研究発表
論文発表：巻末に掲載

学会発表：

1. 田中康雄, 金井文彦, 多田素久, 建石良介, 椎名秀一朗, 吉田晴彦, 川邊隆夫, 横須賀收, 小俣政男. GRHL2 の増幅は肝細胞癌の早期再発に関連する. JDDW 2008 平成 20 年 10 月 2 日 (東京)
2. 浅岡良成, 林連捷, 多田素久, 田中康雄, 毛利大, 瀬戸元子, 大田幹, 伊地知秀明, 金井文彦, 川邊隆夫, 小俣政男. 高密度 SNP アレイを用いた膀胱癌における遺伝子異常の網羅的解析. JDDW2008 平成 20 年 10 月 3 日 (東京)
3. 多田素久, 金井文彦, 田中康雄, 立石敬介, 大田幹, 浅岡良成, 瀬戸元子, 室山良介, 今関文夫, 川邊隆夫, 横須賀收, 小俣政男. 肝発癌、進展における Hedgehog シグナルの関与. 第 44 回日本肝臓学会総会 平成 20 年 6 月 6 日 (愛媛)
4. 田中康雄, 金井文彦, 多田素久, 建石良介, 椎名秀一朗, 吉田晴彦, 横須賀收, 小俣政男. 高密度オリゴヌクレオチドアレイによる肝細胞癌の生物学的特性・再発に関連するゲノム異常解析. 第 44 回日本肝臓学会総会 平成 20 年 6 月 5 日 (愛媛)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得：分担研究報告書参照
実用新案登録：分担研究報告書参照
その他：分担研究報告書参照

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

ウイルス肝炎による肝がんの再発防止メカニズムの解明に関する研究

肝細胞癌ラジオ波焼灼療法後の再発位置に関する研究

研究分担者	吉田晴彦	東京大学医学部附属病院消化器内科	講師
	椎名秀一朗	東京大学医学部附属病院消化器内科	講師
	建石良介	東京大学医学部附属病院消化器内科	助教
	金井文彦	千葉大学医学部附属病院消化器内科	講師

研究要旨：肝癌ラジオ波焼灼療法後の肝内再発部位について検討した。観察期間中に 201 人に再発が認められた。再発部位の内訳は、現病変と同じ亜区域内のみが 42 人、亜区域外のみが 114 人、亜区域内外同時が 45 人であった。1、2、3、5 年累積全再発率及び亜区域内再発率は、それぞれ 19.5%、47.2%、61.5%、78.2%と 3.7%、10.0%、13.4%、16.0%であった。多変量解析の結果、亜区域内および亜区域外再発に寄与する因子として、共に腫瘍径、AFP 高値、血小板低値、HCV 抗体陽性が有意な因子であった。

A. 研究目的

再発性肝癌については異時性多中心性の新規発癌と、肝内微小転移巣の増大にともなう同一クローンの再発があると考えられる。肝癌の肝内転移にあっては経門脈的な同一の肝亜区域への転移が多いといわれており、肝切除においては亜区域単位の切除、すなわち系統的切除が推奨されている。しかし、系統的切除を行っても高率に再発をきたすことも事実であり、そもそも肝癌再発において肝内転移がどれだけの重要性を占めているのか、また、肝内転移の中で同一亜区域内再発がどれだけの割合を占めているのかは明らかでない。今日小型肝癌に対する根治的治療として普及しているラジオ波焼灼療法では、肝癌結節をマージンを含めて焼灼するが、亜区域の大部分は残存する。もし亜区域内微小転移が頻繁に生じているのであれば、ラジオ波焼灼療法後の再発は原発巣と同じ亜区域に多く生じるはずである。今回、分担研究者らは単発の肝細胞癌に対する根治的ラジオ波焼灼療法（後の亜区域・亜区域外再発率とその危険因子を検討した。

B. 研究方法

1999 年より 2004 年までに東京大学医学部附属病院消化器内科に入院、ラジオ波焼灼療法にて加療された初発の肝細胞癌患者 569 人のうち、単発の

303 人（平均年齢 67.6 歳、男/女=191/112）を対象とした。亜区域の定義は、Couinaud の区域分類に準拠した。再発を同亜区域内、亜区域外に分け、累積発生率を競合イベントモデルを用いて推定した。局所再発・穿刺経路の播種は亜区域内再発に含め、肝外転移は亜区域外再発とした。再発部位の同定は、2 人の放射線科医が独立して行った。亜区域内・外の再発危険因子を単変量・多変量 Cox 比例ハザードモデルを用いて個別に解析した。危険因子として年齢、性、腫瘍径、アルブミン、総ビリルビン、血小板、HBs 抗原、HCV 抗体、腫瘍マーカー値を検討した。

C. 研究結果

観察期間中に 201 人に再発が認められた。再発部位の内訳は、同亜区域内のみが 42 人、亜区域外のみが 114 人、亜区域内外同時が 45 人であった。1、2、3、5 年累積全再発率及び亜区域内再発率は、それぞれ 19.5%、47.2%、61.5%、78.2%と 3.7%、10.0%、13.4%、16.0%であった。多変量解析の結果、亜区域内および亜区域外再発に寄与する因子として、共に腫瘍径、AFP 高値、血小板低値、HCV 抗体陽性が有意な因子であった。

D. 考察

系統的亜区域切除によって約 20%の肝癌再発

リスク低減が可能であることが示唆された。この一部は肝臓の総体積の減少に伴うものであり、亜区域内微小転移の切除による効果は20%よりもさらに小さいと考えられた。一方で、一般的に再発リスクが高いとされる症例では、亜区域内再発と同様亜区域外再発も高率であることが示された。

E. 結論

肝癌に対する系統的亜区域切除術は肝癌再発リスクをある程度軽減しているが、予後に対する効果は船体的な肝癌再発リスクおよび残肝の肝機能などを考慮して個々の患者で考える必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Tanaka Y, Kanai F, Tada M, Tateishi R, Sanada M, Nannya Y, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Yokosuka O, Ogawa S, Omata M. Gain of GRLH2 is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;49:746-57.
2. Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Yoshida H, Sato S, Kato N, Kanai F, Sugioka Y, Ikeda H, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Risk assessment of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients by transient elastography. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:839-43.
3. Yoshida H, Yoshida H, Goto E, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Tateishi R, Goto T, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Safety and efficacy of lamivudine after radiofrequency ablation in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 2008;2:89-94.
4. Tateishi R, Yoshida H, Matsuyama Y, Mine N, Kondo Y, Omata M. Diagnostic accuracy of tumor markers for hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Hepatol Int* 2008;2:17-30.
5. Ohki T, Tateishi R, Sato T, Masuzaki R, Imamura J, Goto T, Yamashiki N, Yoshida H, Kanai F, Kato N, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Obesity is an independent risk factor for hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis patients. *Clin Gastroenterol H* 2008;6:459-64.
6. Kondo Y, Yoshida H, Tateishi R, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Percutaneous radiofrequency ablation of liver cancer in the hepatic dome with intrapleural fluid infusion technique. *Br J Surg* 2008;95:996-1004.

7. Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sato T, Ohki T, Goto T, Yoshida H, Kanai F, Sugioka Y, Ikeda H, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Comparison of liver biopsy and transient elastography based on clinical relevance. *Can J Gastroenterol* 2008;22:753-7.
8. Imamura J, Tateishi R, Shiina S, Goto E, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Goto T, Yoshida H, Kanai F, Hamamura K, Obi S, Yoshida H, Omata M. Neoplastic seeding after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2008;103:3057-62.
9. Kanda M, Tateishi R, Yoshida H, Sato T, Masuzaki R, Ohki T, Imamura J, Goto T, Yoshida H, Hamamura K, Obi S, Kanai F, Shiina S, Omata M. Extrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma -incidence and risk factors-. *Liver Int* 2008;28:1256-63.
10. Masuzaki R, Omata M. Treatment of HCC. *Ind J Gastroenterol* 2008;27:113-22.
11. Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Kokudo N, Omata M, Makuuchi M. Double-dose-phase use of second generation hepatitis B virus vaccine in patients after living donor liver transplantation: not an effective measure in transplant recipient. *Hepatol Res* 2009;39:7-13.
12. Masuzaki R, Yoshida H, Tateishi R, Shiina S, Omata M. Hepatocellular carcinoma in viral hepatitis: Improving standard therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterology* 2009; in press
13. Ohki T, Tateishi R, Shiina S, Goto E, Sato T, Nakagawa H, Masuzaki R, Goto T, Hamamura K, Kanai F, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Visceral fat accumulation is an independent risk factor of hepatocellular carcinoma recurrence after curative treatment in NASH-suspected patients. *Gut* 2009; in press

学会発表

1. Shiina S, Tateishi R, Goto E, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Goto T, Yoshida H, Kanai F, Hamamura K, Imamura J, Obi S, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Radiofrequency ablation (RFA) in the treatment of hepatocellular carcinoma (HCC). *Digestive Disease Week 2008* 平成20年5月19日 (サンディエゴ)
2. Tateishi R, Shiina S, Yoshida H, Goto T, Goto E, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Kanai F, Hamamura K, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Treatment response evaluated by tumor markers can predict prognosis of hepatocellular carcinoma independently of radiological evaluation. *Digestive Disease Week 2008* 平成20年5月20日 (サンディエゴ)
3. 大木隆正, 建石良介, 小俣政男. NASH起因発癌のエビデンス 内臓脂肪量から見た飲酒量

- の少ない非B非C肝癌患者の予後. JDDW 2008 平成20年10月1日(東京)
4. 小池幸宏, 吉田晴彦, 松田梨恵, 濱田敦, 岡本朋子, 内田康仁, 木暮宏史, 椎名秀一朗, 川瀬建夫, 小俣政男. インターフェロン治療はC型肝炎の予後を改善する. JDDW2008 平成20年10月2日(東京)
 5. 建石良介, 椎名秀一朗, 小俣政男. 肝癌の病態別推奨治療 コンセンサス形成を目指す異分野間衆議 単発肝細胞癌に対するラジオ波焼灼療法後の亜区域内再発率とその危険因子. JDDW2008 平成20年10月2日(東京)
 6. 佐藤隆久, 建石良介, 小俣政男. 肝癌診療ガイドラインと臨床最前線 肝癌サーベイランスにおける腫瘍マーカーの再評価. JDDW2008 平成20年10月2日(東京)
 7. 五藤忠, 吉田晴彦, 小俣政男. 肝細胞癌治療後の抗ウイルス療法は予後を改善するか 肝細胞癌局所療法後のC型肝炎に対する当科のIFN治療成績と予後. JDDW2008 平成20年10月3日(東京)
 8. Goto T, Yoshida H, Tateishi R, Enooku K, Goto E, Yoshida H, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Imamura J, Yamashiki N, Kanai F, Hamamura K, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Interferon therapy for hepatitis C patients curatively treated for hepatocellular carcinoma with percutaneous therapies. The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 平成20年11月3日(サンフランシスコ)
 9. Ohki T, Tateishi R, Shiina S, Goto E, Sato T, Masuzaki R, Goto T, Hamamura K, Kanai F, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Visceral fat accumulation is an independent risk factor of hepatocellular carcinoma recurrence after curative treatment in NASH suspected patients. The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 平成20年11月3日(サンフランシスコ)
 10. Sato T, Tateishi R, Yoshida H, Goto T, Enooku K, Ohki T, Nakagawa H, Masuzaki R, Imamura J, Yamashiki N, Goto T, Yoshida H, Kanai F, Hamamura K, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Reevaluation of tumor markers in surveillance for hepatocellular carcinoma. The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 平成20年11月3日(サンフランシスコ)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし
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

ウイルス肝炎による肝がんの再発防止メカニズムの解明に関する研究

HCV 関連肝癌治療後再発リスクと血清 AFP 値

研究分担者：石橋大海 長崎医療センター 臨床研究センター長

研究要旨：【目的】血清 AFP および PIVKA-II レベルが、HCV 関連肝癌における治療後の再発リスクとなり得るかどうかが、治療後の血清 AFP 値及び PIVKA-II 値と初回再発率の関連について検討を行った。【対象・方法】当院にて 1999 年より 2006 年までの 8 年間に肝癌と診断した 546 症例のうち、HBsAg 陽性、HCV 抗体陰性、TNM stage III 以上および画像検査上治療後残存がみられた症例を除外した 201 例を対象とした。肝癌治療後初回再発に寄与する因子を Cox 比例ハザード分析による多変量解析を行った。【結果】背景肝、治療 1-2 ヶ月後の AFP 値、治療 1-2 ヶ月後の PIVKA-II 値、TNM stage と発癌後のインターフェロン治療が肝癌治療後初回再発における有意な因子であった。累積初回再発率は、AFP 6-19ng/ml 群および 20ng/ml 以上群よりも、AFP 6ng/ml 未満群が有意に低かった。一方、治療 1-2 ヶ月後 PIVKA-II 40mAU/ml 未満群と 40mAU/ml 以上群に分けた解析では、40mAU/ml 未満群の再発率が有意に低かった。【結論】肝癌治療前のみでなく、肝癌治療後の血清 AFP 及び PIVKA-II レベルは肝癌再発のリスクである。

共同研究者

田浦直太 長崎医療センター臨床研究センター
立山雅邦 長崎医療センター臨床研究センター
矢野公士 長崎医療センター臨床研究センター
小森敦正 長崎医療センター臨床研究センター
阿比留正剛 長崎医療センター臨床研究センター
右田清志 長崎医療センター臨床研究センター
八橋 弘 長崎医療センター臨床研究センター

A. 研究目的

肝癌診断時の血清 α -フェトプロテイン (AFP) 値および PIVKA-II 値と肝発癌の関係については多くの報告がみられる。しかし、肝癌治療後の腫瘍マーカー値による初回肝癌再発率についての報告は少ない。また、AFP の基準値は、通常 20ng/ml が使用されているが、近年 C 型慢性肝炎における AFP 値の基準値について様々な議論がなされている。我々は、C 型慢性肝炎において、血清 AFP 値及び PIVKA-II 値と肝発癌の関係を検討した結果、肝癌診断時の血清 AFP および PIVKA-II 値は肝発癌と相関し、これらが高値の症例では予後および再発率

が不良であることを明らかにした。今回、C 型慢性肝炎における肝癌治療後の AFP 値および PIVKA-II 値と初回再発率の関連について検討を行った。

B. 研究方法

当院にて 1999 年より 2006 年までの 8 年間に肝癌と診断した 546 症例のうち、HBsAg 陽性、HCV 抗体陰性、TNM stage III 以上および画像検査上治療後残存がみられた症例を除外した 201 例を対象とした。肝癌初回再発に寄与する因子を Cox 比例ハザード分析による多変量解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は retrospective study のため、研究への利用を書面にて包括同意を得た患者に対して診療上の必要性のため行った臨床検査の結果をもとに検討を行った。解析の際は、氏名・ID を暗号化し、個人を特定できないように配慮した。

C. 研究結果

肝癌治療後初回再発に関与する因子として、背景肝(肝硬変: $p=0.039$ RR 1.55)、治療1-2ヵ月後のAFP値(6-19 ng/ml: $p=0.115$ RR 1.54, ≥ 20 ng/ml $p=0.009$ RR 2.12)、治療1-2ヵ月後のPIVKA-II値(≥ 40 mAU/ml: $p=0.045$ RR 1.43)、TNM stage (stage II: $p=0.005$ RR 1.63)と発癌後のインターフェロン治療の有無($p=0.013$ RR 0.37)が有意な因子であった。

次に、治療1-2ヵ月後AFP 6 ng/ml未満群、AFP 6-19 ng/ml群とAFP 20 ng/ml以上群に分け累積初回再発率を解析した。AFP 6 ng/ml未満群では4年累積初回再発率が61%であったのに対しAFP 6-19 ng/ml群では82%、AFP 20 ng/ml以上群では88%と、AFP値6 ng/ml未満群の累積初回再発率が有意に低かった(AFP < 6 ng/ml vs. AFP 6-19 ng/ml $p=0.035$; AFP < 6 ng/ml vs. \geq AFP 20 ng/ml $p=0.003$)。さらに、治療1-2ヵ月後PIVKA-II 40 mAU/ml未満群と40以上群に分けた解析では、40 mAU/ml未満群の4年累積初回再発率は78%であったのに対し、40 mAU/ml以上群では94%と、40 mAU/ml未満群の再発率が有意に低かった($p=0.001$)。

D. 考察

HCV関連肝癌において、治療1-2ヵ月後のAFP値6 ng/ml未満、PIVKA-II 40 mAU/ml未満の症例で初回再発率が低値であり、高値例では、肝癌治療後の再発率が高かった。AFP、PIVKA-IIいずれも肝細胞癌の腫瘍マーカーであり、治療後高値を示していることは、治療後の肝臓内にミクロのレベルで腫瘍細胞ないしはポテンシャルのある細胞の残存が考えられる。しかし、AFP値はALT値や肝線維化とも相関があることから、背景肝の発癌ポテンシャルを表しているものと考えられ、このことが、AFP値が肝癌再発予測のための指標となり得るひとつの要因であると考えられる。

E. 結論

肝癌治療後であっても、血清AFPおよび

PIVKA-IIレベルは肝癌治療後再発リスクになり、肝癌治療後のAFP値およびPIVKA-II値は肝癌再発予測のための指標となり得ると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1) Long-term trends of the incidence of hepatocellular carcinoma in the Nagasaki prefecture, Japan. Taura N, Yatsushashi H, Nakao K, Ichikawa T, Ishibashi H. *Oncol Rep.* 2009;21(1):223-7.

2) Interleukin-18 promoter polymorphisms and the disease progression of Hepatitis B virus-related liver disease. Migita K, Sawakami-Kobayashi K, Maeda Y, Nakao K, Kondoh S, Sugiura M, Kawasumi R, Segawa O, Tajima H, Machida M, Nakamura M, Yano K, Abiru S, Kawasaki E, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. *Transl Res.* 2009;153(2):91-96.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特許取得: なし

実用新案登録: なし

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

ウイルス肝炎による肝がんの再発防止メカニズムの解明に関する研究

進行肝臓における薬剤耐性機序の臨床的解析

研究分担者：正木 尚彦 国立国際医療センター戸山病院 第二消化器科医長

研究要旨：原発性肝臓の肝内再発病変に対しては、肝切除、ラジオ波凝固療法、TAE など局所療法による治療効果が高く、生命予後の改善を認めている。しかしながらリンパ節転移、骨転移を含む遠隔転移病変に対する治療方法は、確立されていないのが現状である。肝細胞癌に対する 5-FU 製剤投与による全身化学療法のエビデンスはないが、症例を選択することで 5-FU の抗腫瘍効果が期待できる可能性がある。今回我々は癌細胞中の核酸合成酵素である thymidylate synthase (TS) と、5-FU の分解酵素である DPD (dihydropyrimidine dehydrogenase) のタンパク発現量を測定し、患者個人に適した治療の確立を試みた。また肝細胞癌の TS/DPD タンパク発現量を胆道癌、大腸癌肝転移症例と比較検討した。臨床所見のうち、腫瘍部の DPD タンパク発現量は肝障害度 A、Child A 症例において有意に高い結果であった。腫瘍の病理学的検討では多発例、低分化型、充実型において DPD 発現が有意に高い結果であった。他癌腫との比較検討では、肝細胞癌は TS：低発現、DPD：高発現、胆道癌では TS：高発現、DPD：高発現、大腸癌肝転移では TS：低発現、DPD：低発現であった。胆道癌に対する TS-1 の奏効率は 32% と報告されていることから、胆道癌と比べ TS 低発現の肝細胞癌ではさらに奏効率が上昇する可能性が示唆された。

研究協力者

国立国際医療センター戸山病院

外科 枝元良広

A. 研究目的

原発性肝臓の肝内再発病変に対しては、肝切除、ラジオ波凝固療法、TAE など局所療法による治療効果が高く、生命予後の改善を認めている。しかしながらリンパ節再発、骨転移を含む遠隔転移病変に対する治療方法は、確立されていない。第 17 回全国原発性肝臓追跡調査報告（2002 年～2003 年）では、肝細胞癌登録の約 5% に化学療法が選択されているが、その 90% は経肝動脈投与の肝内病変に対してであり、経静脈および経口での抗癌剤投与がなされているのは 9% に過ぎず、肝外病変に対する治療方法の選択肢は少ないのが現状である。肝細胞癌に対する 5-FU 製剤投与による全身化学療法

にエビデンスはなく、現在 TS-1 投与による臨床試験が進行中である。これまでに経口抗癌剤である TS-1 を使用した報告では、IFN α との併用で奏効率 17% (5/29 例)、25% (3/12 例)、CCDP との併用で奏効率 42.8% (3/7 例)、また TS-1 単独投与で奏効率 25% (2/8 例) といった成績が報告されているが、いまだ検討症例数も少なく、奏効例も限られているのが現状である。しかし適切な症例を選択することで 5-FU の抗腫瘍効果を十分期待しうることが示唆される。今回我々は 5-FU の代謝経路のうち、癌細胞中の核酸合成酵素である thymidylate synthase (TS) と、5-FU の分解酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) のタンパク発現量の測定を行った。TS/DPD の測

定を行うことで患者個人に適した治療、つまりはテーラーメイド治療を確立していく上で大きな意義があるものと考えられる。本研究の目的は、1) 肝臓癌における DPD 阻害薬を含む 5-FU 内服抗癌剤の効果予測として、腫瘍部位ならびに非腫瘍部におけるピリミジン代謝酵素である TS、DPD のタンパク発現量を測定し、臨床病理学データとの関連性を検討すること、2) 肝細胞癌の TS/DPD タンパク発現量を胆道癌、大腸癌肝転移症例と比較検討することである。

B. 研究方法

本研究に際しては、ヘルシンキ条約を厳守し、十分なインフォームドコンセントのもと患者のプライバシーに十分配慮した。対象は 2005 年 1 月 1 日から 2007 年 12 月 31 日までの 3 年間に手術が行われた原発性肝癌切除症例 35 例（平均 67.5 歳、男性 25 例、女性 10 例）と、同時期に手術が施行された胆道癌切除症例 10 例（平均 62 歳、男性 8 例、女性 2 例）、大腸癌肝転移切除症例 54 例（平均 64.2 歳、男性 36 例、女性 18 例）。TS/DPD タンパク発現量の測定は術後検体を即座に凍結保存したものを用いた。測定方法はこれまでの酵素活性、定量 RT-PCR による mRNA 発現、免疫組織化学染色法と比べ、少量の検体で定量的に測定可能であり、従来の測定方法と有意な相関を示す ELISA 法を用いた。統計解析は Fisher の正確確率検定、t 検定、または Mann-Whitney の U 検定を行い、 p 値 0.05 未満を有意とした。

C. 研究結果

- 1) 肝細胞癌における腫瘍部、非腫瘍部の TS/DPD タンパク発現量を臨床病理学的因子別に単変量解析を行った。背景肝をウイルス肝炎症例と NASH 例の 2 群に分けて検討を行ったところ TS/DPD タンパク発現量に有意差は認められなかったが、腫瘍部の TS タンパク発現量において肝炎症例は NASH 症例と比較し高値を示した(図 1)。
- 2) 臨床所見のうち、性別、糖尿病、タバコ、ア

ルコール多飲歴、腫瘍マーカー(AFP, PIVKA-II)に有意差を認めず、また再発、予後においても TS/DPD 発現量に差を認めなかった。非腫瘍部の TS タンパク発現量が肝障害度 A 症例、BMI23 以下例において有意に低値であった。また腫瘍部の DPD タンパク発現量は肝障害度 A、Child A 症例において有意に高値であった(図 2, 3)。

- 3) 病理学的因子では腫瘍径、局在、線維化の程度、CH 有無では TS、DPD 発現量に有意差を認めなかった。腫瘍部の病理所見のうち、被膜浸潤を有する症例においてのみ有意に TS 発現量が高かった。また多発例、低分化型、充実型症例において DPD 発現量が有意に高値であった(図 4)。

TS/DPD 値と臨床病理学的因子の重回帰分析を行ったところ、TS 値は年齢が高いほど低くなり、B 型肝炎症例で高値になること、一方、DPD 値は Stage I で高値になり、単発であれば低くなる事が判明した。無再発生存期間は、腫瘍径が大きいこと、アルコール性肝炎であることで短縮し、Child A であること、慢性肝炎であること(つまりは肝硬変がないこと)で延長することが明らかとなった。

- 4) 肝細胞癌、胆道癌、大腸癌肝転移の TS・DPD タンパク発現量の比較: いずれの癌腫においても腫瘍部は非腫瘍部と比較して TS 発現量が高値であった。尚、胃癌、大腸癌、乳癌、肺癌等を含む全癌腫腫瘍部の cut off 値(24 ng/mg protein)と比較すると、肝細胞癌: TS 低発現、胆道癌: TS 高発現、大腸癌肝転移: TS 低発現であった。肝細胞癌症例における腫瘍部の TS 発現量は大腸癌肝転移症例と比較すると有意に低値であった(図 5)。

- 5) DPD タンパク発現量は同様に全癌腫腫瘍部の cut off 値(77 ng/mg protein)と比較すると、肝細胞癌: DPD 高発現、胆道癌: DPD 高発現、大腸癌肝転移: DPD 高発現であった。大腸癌肝転移症例では腫瘍部の方が非腫瘍部より有意に DPD 低発現であった。また腫瘍部において大腸癌肝転移を肝細胞癌と比較すると有意に DPD 発現量が低値を示した(図 6)。

D. 考察

本研究結果から、以下のような知見が得られた。

- 1) 腫瘍部の DPD タンパク発現量は肝障害度 A、Child A 症例において有意に高発現であり、また多発例、低分化型、充実型症例においてより高発現であったことから、肝機能が保たれ、悪性度の高い病変を有する症例では 5-FU に対して治療抵抗性であることが推定される。
- 2) 肝細胞癌と大腸癌肝転移の比較：肝細胞癌の腫瘍部の TS 発現量は、大腸癌肝転移よりも有意に低く、DPD 発現量は有意に高い結果であった。TS-1 投与による再発進行結腸直腸癌の臨床効果は 37%と期待できるものである。大腸癌肝転移と比較し肝細胞癌は 5-FU の標的部位である TS が低いことや、5-FU 分解酵素である DPD が高いことが肝細胞癌における抗腫瘍効果を減弱させている一因とも考えられる。尚、大腸癌肝転移の DPD 値が腫瘍部<非腫瘍部であったことにも、治療上の意義の存在を裏付けるものと考えている。肝細胞癌と胆道癌の比較では、胆道癌が TS 高発現/DPD 高発現であったのに対し、肝細胞癌は TS 低発現/DPD 高発現という結果であった。DPD 阻害薬を含む 5-FU 内服抗癌剤 (TS-1) が新たに胆道癌に適応となり、その臨床効果は 32%と期待できるものである。肝細胞癌は胆道癌と比較し TS 低発現であることから、DPD 阻害薬による効果がさらに期待できるものと考えられた。

E. 結論

今回我々は、外科的切除例を対象に術後再発予防効果の予測因子として TS・DPD タンパク発現量の測定を行った。今後の基礎データの解析ならびに、5-FU 系内服抗癌剤を使用した臨床治験成績の公表が待たれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

枝元良広、熊澤慶吾ほか、原発性肝癌におけるピリミジン代謝酵素発現の検討と応用. 第 12 回日本肝臓学会大会、東京、2008 年 10 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特許取得：なし

実用新案登録：なし

その他：なし

図1 肝炎症例とNASH症例のTS・DPDタンパク発現量

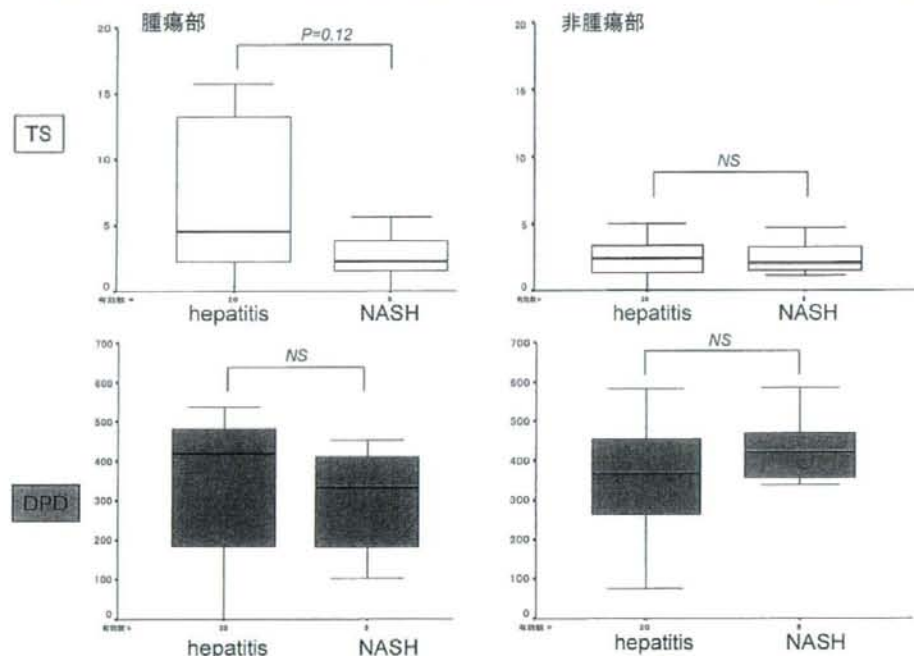


図2 肝障害度とTS・DPDタンパク発現量

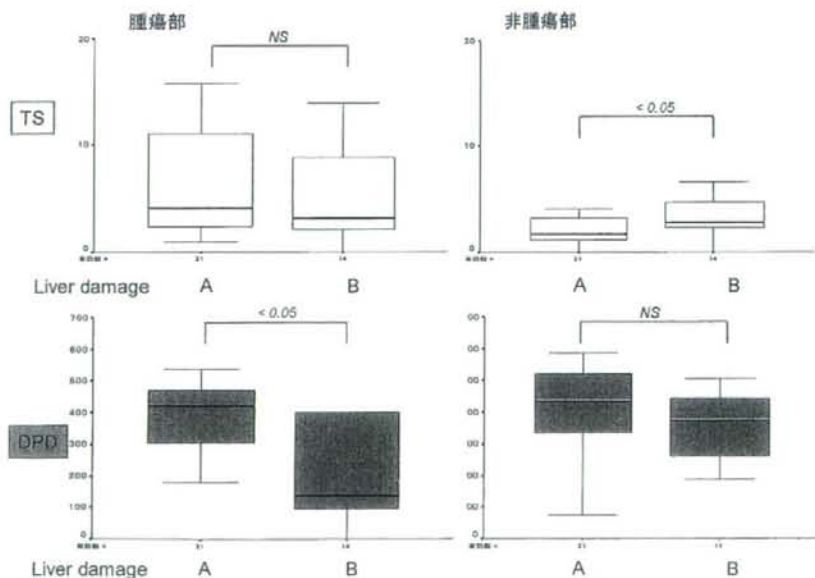


図3 Child-Pugh分類とTS・DPDタンパク発現量

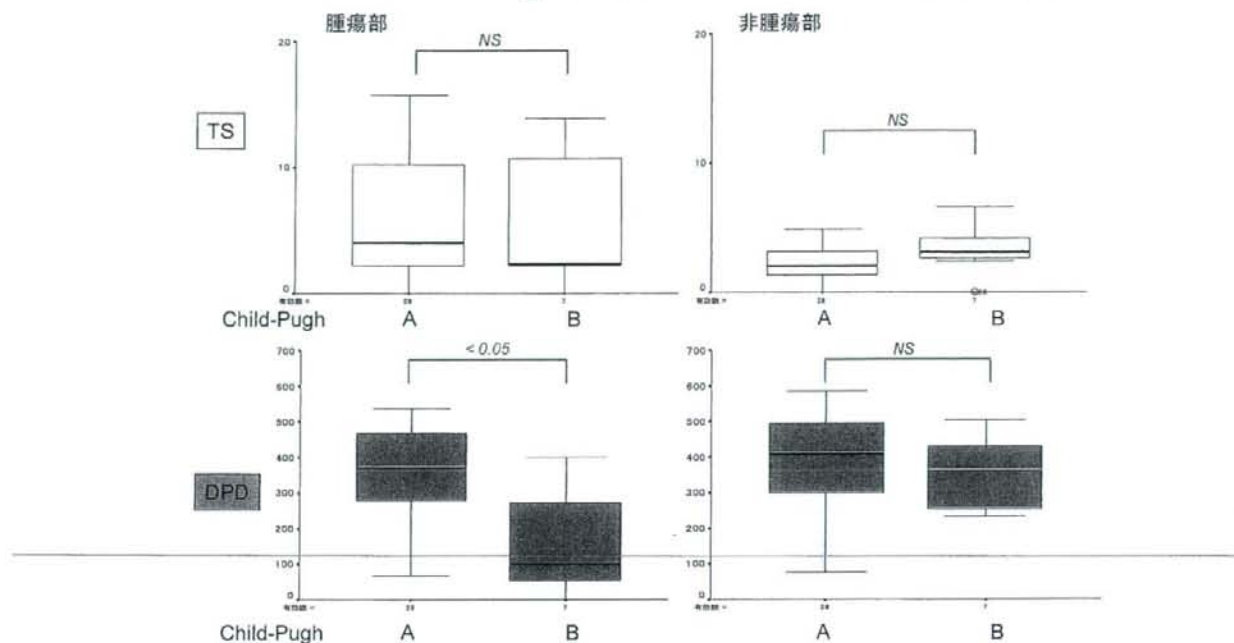


図4 腫瘍部の病理所見とDPDタンパク発現量

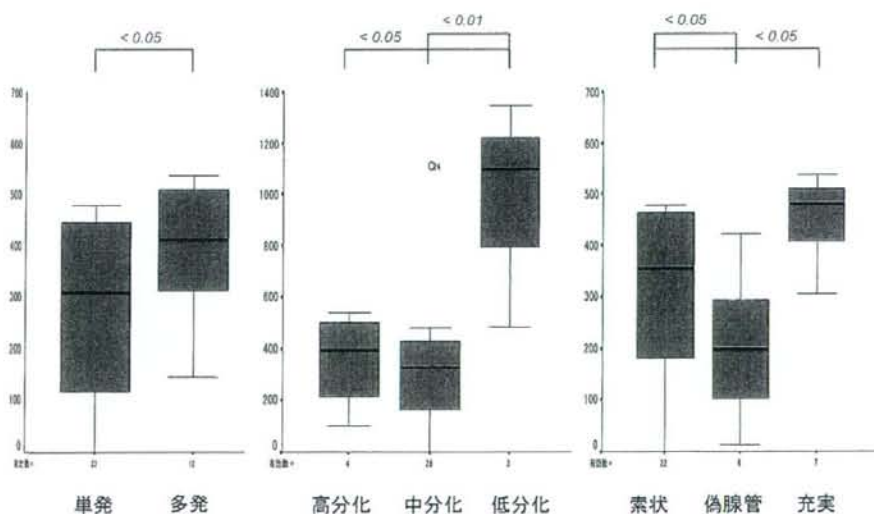


図5 各癌腫とTSタンパク発現量の比較

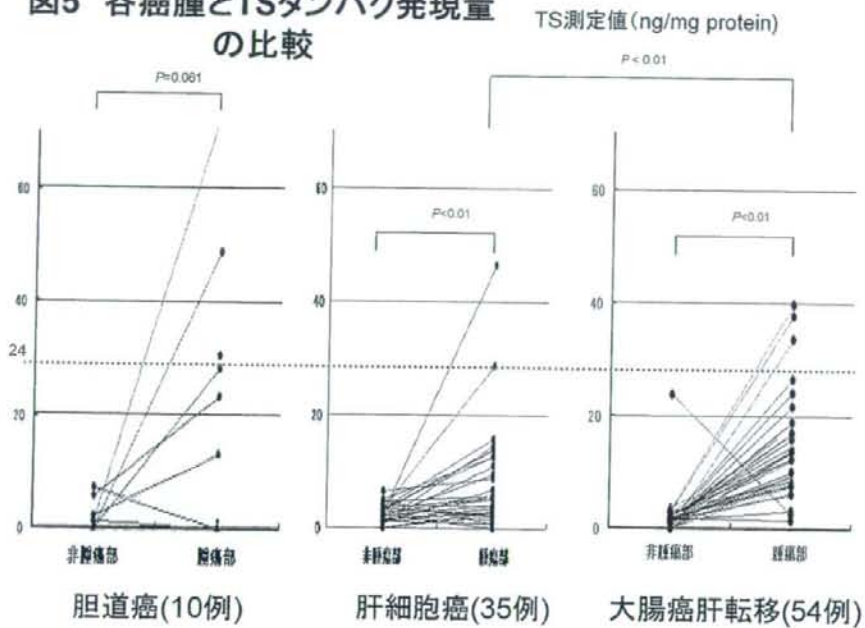
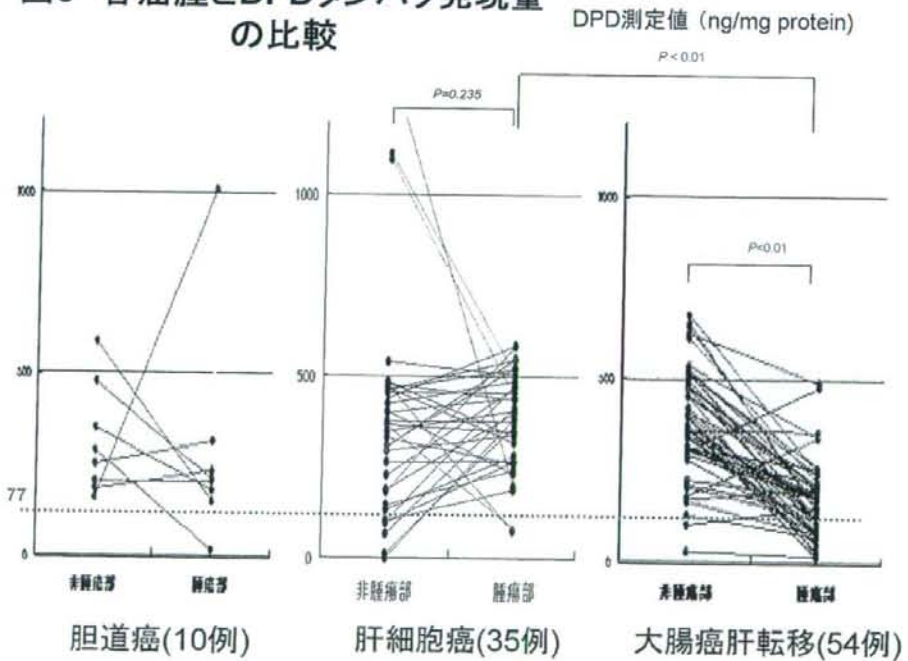


図6 各癌腫とDPDタンパク発現量の比較



ウイルス肝炎による肝がんの再発防止メカニズムの解明に関する研究

肝外転移を有する肝細胞がん患者の予後の検討

研究分担者：古瀬純司¹⁾、仲地耕平²⁾、池田公史²⁾

杏林大学医学部内科学腫瘍科¹⁾、国立がんセンター東病院肝胆膵内科²⁾

研究要旨：肝細胞がんにおける肝外転移の頻度、生存期間および予後規定因子について検討した。初診時肝外転移を認めた例は1255例中71例（5.7%）、治療後の経過観察中転移出現例は1186例中122例（10.3%）であった。切除、局所壊死療法、肝動脈化学塞栓療法（初回治療法別の肝外転移の頻度は9.8-14.5%であり、差は認めなかった。原発巣および転移巣に対する局所治療、全身化学療法、緩和治療による治療を行ったところ、転移出現時を起点として全193例の生存期間中央値は4.3ヵ月、1年生存率29.0%と予後不良であった。多変量解析の結果、予後不良因子は全身状態が不良（PS1-3）、肝機能低下（Child-Pugh BまたはC）、多臓器への転移あり、転移病変数が挙げられた。今後、肝外転移を有する肝細胞がん患者の予後改善のためにはsorafenibなど新しい分子標的薬を用いた化学療法の確立が必要である。

A. 研究目的

一般に肝細胞がんにおける肝外転移の頻度はそれ程高くないが、肝外転移例に対する治療法は十分確立されておらず、予後不良の病態である。Sorafenibなどの分子標的薬の開発により、肝細胞がんに対する全身化学療法も確立しつつあり、今後肝外転移を有する症例がよい適応となるものと考えられる。全身化学療法を実施する上で、肝外転移を有する患者の予後や予後規定因子を明らかにすることは十分意義のあることと考えられる。以上から、肝細胞がんにおける肝外転移の頻度、肝外転移発現からの生存期間および予後因子を後ろ向き解析により明らかにした。

B. 研究方法

対象は1992年7月から2003年3月までに国立がんセンター東病院にて治療された肝細胞がん1255例である。観察期間は0.1-78.9ヵ月（中央値4.0ヵ月）であった。初診時および経過観察時における肝外転移の有無、転移部位を検討した。また肝外転移出現後の治療法と治療法別の生存期

間、および予後規定因子を単変量解析と多変量解析を用いて検討した。

（倫理面への配慮）

本研究における治療に際しては、患者には文書を用いて十分な説明を行い、患者自身による同意を本人より文書で取得した。データの取り扱いに関して、直接個人を識別できる情報を用いず、データベースのセキュリティを確保し、個人情報の保護を遵守した。

C. 研究結果

1) 肝外転移の頻度

初診1255例中71例（5.7%）に肝外転移を認めた。一方、初回治療後の経過観察中に肝外転移が出現したのは1186例中122例（10.3%）であった。初回治療は主に切除術422例、局所壊死療法（エタノール注入、マイクロ波凝固療法、ラジオ波焼灼療法）192例、肝動脈化学塞栓療法（TACE）357例、放射線療法55例が行われており、治療後の経過観察中肝外転移を認めた例は、切除61例（14.5%）、局所壊死療法（13.0%）、TACE35例

(9.8%)、放射線療法3例(5.5%)と、治療法による明らかな差は認められなかった。

転移部位は、肺80例(41.5%)、骨68例(35.2%)、腹部リンパ節43例(22.3%)、副腎23例(11.9%)、腹腔外リンパ節11例(5.7%)、腹膜10例(5.2%)、軟部組織9例(4.7%)、脳3例(1.6%)、胸膜2例(1.0%)であった。

2)治療選択

肝機能、全身状態を主な治療選択の基準として積極的抗がん治療と緩和治療を選択したところ、58例(30%)で緩和治療のみが行われた。積極的治療としては、14例(7%)に全身化学療法が行われ、5-FU、ミトキサントロン、シスプラチンなどによる臨床試験による治療が主なものであった。転移巣への局所治療は、放射線療法36例、切除術20例、切除+放射線療法1例であり、計57例(30%)に行われた。また原発巣のみへの治療は46例(24%)に行われ、動脈化学塞栓療法あるいは塞栓療法(TACE/TAE)28例、動注化学療法9例、放射線療法6例、切除術3例であった。原発巣と転移巣療法に局所療法が行われたのは18例(9%)であり、転移巣は放射線療法7例、切除7例、TACE/TAE4例、原発巣はTACE/TAE10例、切除7例、エタノール注入療法1例であった。

3)生存期間と死因

肝外転移例全193例において、転移を確認した日を起点とした生存期間中央値は4.3ヶ月、1年生存率29.0%、3年生存率8.4%、5年生存率3.5%であった。前治療あり124例となし69例では生存期間に差は認めなかった。治療法別の生存期間中央値は、局所療法が行われた121例6.8ヶ月、全身化学療法14例3.5ヶ月、緩和治療58例1.5ヶ月であった。死因についてみると、がんの進行と考えられたのは118例(69%)であったが、その内肝内の原発巣の進行による肝不全が91例(54%)、転移巣を含むがんの進行によるもの27例(16%)、肝硬変による肝不全17例(10%)、治療関連死亡2例(1%)、不明33例(19%)であった。

4)予後規定因子

全身状態(Performance Status)、肝機能の因子、腫瘍因子などについて単変量解析を用いて予後

規定因子を検討した結果、PS、Child-Pugh分類、TNMによるT因子、転移病変数、転移臓器数、AFP値、HBs抗原、脳転移の有無が予後因子として有意差を認めた。これらの8因子により多変量解析を行ったところ、PS、Child-Pugh分類、転移臓器数、転移病変数が有意な予後因子であり、そのハザード比はPS(0対1-3)2.93($p<0.0001$)、Child-Pugh分類(A対B/C)2.24($p<0.0001$)、転移臓器(1臓器対複数臓器)1.77($p=0.0022$)、転移病変数(1個対複数個)1.72($p=0.037$)であった。

D. 考察

肝細胞がんの肝外転移の頻度は、今回の検討でも初診時5.7%、肝内病変への治療後経過観察中10.3%、合計16%程度であった。しかしその予後は生存期間中央値で4.3ヶ月と極めて不良であり、有効な治療法の開発が必要である。

一般的に転移を伴うがんでは全身化学療法が適応となるが、これまで肝細胞がんには有効な化学療法は確立しておらず、今回も14例(7%)と少数であった。一方、原発巣あるいは転移巣を対象とした局所療法は121例(63%)に実施されていた。転移を有する肝細胞がん患者の死因を検討すると肝内病変の進行による肝不全が54%と半数以上を占め、肝外転移があっても肝内病変をコントロールする意義があると考えられる。また、疼痛緩和など緩和治療のみが58例(30%)と肝機能低下等で積極的ながんへの治療ができない症例も多く認めた。

今回の検討において、局所治療、全身化学療法、緩和治療の生存期間中央値はそれぞれ6.8ヶ月、3.5ヶ月、1.5ヶ月といずれも不良であった。局所治療の組み合わせによる治療戦略も満足できるものではなく、新たな治療法の開発が必要と考えられる。予後不良因子としてPS1-3、Child-Pugh分類B-C、複数の転移臓器、複数の転移病変が挙げられる。これらの因子は治療適応の考慮、臨床試験での層別因子、予後の推定などに有用と考えられる。

近年、分子標的薬の開発が盛んに行われ、肝細胞がんでも多くの臨床試験が行われるようにな