

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Yamazaki S, Takayama T, Makuuchi M. The technical advance and impact of caudate lobe venous reconstruction in left liver: additional safety for living-related donor liver transplantation. **Transpl Int**. 2010 Apr 1;23(4):345-9.
2. Moriguchi M, Takayama T, Nakamura M, Aramaki O, Higaki T, Nakayama H, Ohkubo T, Fujii M. Phase I/II study of a fine-powder formulation of cisplatin for transcatheter arterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma. **Hepatol Res**. 2010 Apr;40(4):369-75.
3. Arii S, Sata M, Sakamoto M, Shimada M, Kumada T, Shiina S, Yamashita T, Kokudo N, Tanaka M, Takayama T, Kudo M. Management of hepatocellular carcinoma: Report of Consensus Meeting in the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009). **Hepatol Res**. 2010 Jul;40(7):667-85.
4. Mamiya T, Yamazaki K, Masugi Y, Mori T, Effendi K, Du W, Hibi T, Tanabe M, Ueda M, Takayama T, Sakamoto M. Reduced transforming growth factor-beta receptor II expression in hepatocellular carcinoma correlates with intrahepatic metastasis. **Lab Invest**. 2010 Sep;90(9):1339-45.
5. Takayama T, Makuuchi M, Hasegawa K. Single HCC smaller than 2 cm: surgery or

ablation?: surgeon's perspective. **J**

Hepatobiliary Pancreat Sci. 2010 Jul;17(4):422-4.

6. Ye SL, Takayama T, Geschwind J, Marrero JA, Bronowicki JP. Current approaches to the treatment of early hepatocellular carcinoma. **Oncologist**. 2010;15 Suppl 4:34-41.
7. Hayashi Y, Takayama T, Yamazaki S, Moriguchi M, Ohkubo T, Nakayama H, Higaki T. Validation of perioperative steroids administration in liver resection: a randomized controlled trial. **Ann Surg**. 2011 Jan;253(1):50-5.

2.学会発表

1. 長谷川 潔, 菅原寧彦, 青木 琢, 金子順一, 田村純人, 竹村信行, 石沢武彰, 三瀬祥弘, 有田淳一, 脊山泰治, 別宮好文, 高山忠利, 幕内雅敏, 國土典宏: 【シンポジウム(2) : 肝細胞癌の治療方針の変遷と展望】肝細胞癌に対する外科治療の発展と今後について—東京大学の取り組み, 第110回日本外科学会定期学術集会, 名古屋, 2010年4月.
2. 檜垣時夫, 高山忠利, 中山壽之, 中村正彦, 森口正倫, 大久保貴生, 荒牧 修, 山崎慎太郎, 渡辺慶史, 間宮孝夫, 梶原崇弘, 青木 優: 【ビデオワークショップ(1) : 解剖からみた合理的な肝切除】尾状葉肝癌術式の標準化, 第110回日本外科学会定期学術集会, 名古屋, 2010年4月.
3. 山崎 慎太郎, 高山忠利, 林 友紀, 森口正倫, 大久保貴雄, 荒牧 修, 中山壽之, 檜垣時夫: 【ワークショップ(3) : 肝胆膵領域における RCT の結果と今後の展望】肝切除におけるステロイド投与の功

罪:Randomized Control Study, 第 110 回日本外科学会定期学術集会, 名古屋, 2010 年 4 月.

4. 高山忠利:【特別ビデオセッション 9 : 肝胆膵-3】肝尾状葉単独全切除術、第 110 回日本外科学会定期学術集会, 名古屋, 2010 年 4 月.
5. 森口正倫, 高山忠利, 檜垣時夫, 中山壽之, 大久保貴生, 荒牧 修, 山崎慎太郎, 渡邊慶史, 間宮孝夫:【シンポジウム 3 : 肝細胞癌術後再発への治療戦略 - 長期予後を目指して -】肝細胞癌切除後再発の治療戦略 再切除と肝動脈塞栓術の比較適応について, 第 65 回日本消化器外科学会総会、下関, 2010 年 7 月.
6. 檜垣時夫, 高山忠利, 中山壽之, 森口正倫, 大久保貴生, 荒牧 修, 山崎慎太郎, 渡邊慶史, 間宮孝夫, 梶原崇弘:【ビデオシンポジウム 4 : 安全な肝切除への工夫】鉗子

圧挫法による拡大右肝切除術, 第 65 回日本消化器外科学会総会, 下関, 2010 年 7 月.

7. 荒牧 修, 高山忠利, 檜垣時夫, 大久保貴生, 中山壽之, 渡邊慶史, 窪田信行, 中田泰彦, 神野大乘:【ビデオシンポジウム 2・最善の肝切除を目指した基本技術と新しい工夫】下大静脈・門脈腫瘍栓合併肝癌に対する肝授動先行右肝切除, 第 72 回臨床外科学会総会, 横浜, 2010 年 11 月.

H. 知的財産の出願・登録状況

- 1.特許取得
特になし
- 2.実用新案登録
特になし
- 3.その他
特になし

肝細胞癌切除患者における非典型結節の Gd-EOB-DTPA-MRI 肝細胞相と
ソナゾイド術中造影超音波クッパー相の対比

研究分担者 國土典宏（東京大学医学部附属病院肝胆脾・移植外科教授）

研究要旨：【目的】非典型結節における Gd-EOB-DTPA-MRI 肝細胞相（EOB-MRI-HCP）とソナゾイド術中造影超音波クッパー相（CE-IOUS-Kup）の有する診断的意義を検討する。【方法】両検査を施行した連続 79 人の肝細胞癌切除患者が対象。術前～術中に指摘された良悪性含めて全ての結節のうち、ダイナミック CT/MRI で古典的パターンをとらなかったものが対象とされた。最終診断は、切除結節は病理結果をもとに、非切除結節は術後 12 ヶ月間のダイナミック CT/MRI 所見をもとにして行った。【結果】対象結節は全 111 結節。CE-IOUS-Kup で低エコーであった 21 結節は全て肝細胞癌と最終診断された。それ以外の 90 結節のうち、EOB-MRI-HCP で等信号であったのは 45 結節あり、それらの中で肝細胞癌と最終診断されたものはなかった。CE-IOUS-Kup で等エコー、EOB-MRI-HCP で低信号であった残り 45 個のうち 12 個が肝細胞癌と最終診断された。【結論】非典型結節のうち、CE-IOUS-Kup で低エコーであれば切除すべきである。CE-IOUS-Kup で等エコーであれば必ずしも切除しなくてよいが、EOB-MRI-HCP で低信号であれば可及的に切除することがのぞましい。

A. 研究目的

肝細胞癌切除患者における非典型結節の Gd-EOB-DTPA-MRI 肝細胞相とソナゾイド術中造影超音波クッパー相、ならびに最終診断結果を比較し、各所見の有する意義を検討する。

B. 研究方法

肝細胞癌に対して肝切除を行う患者のうち、Gd-EOB-DTPA-MRI とソナゾイド術中造影超音波を行った連続 79 人の各結節に対する画像所見を前向きに調べた。Gd-EOB-DTPA-MRI 肝細胞相は造影剤静注 15-20 分後の T1 強調画像を、ソナゾイド術中造影超音波クッパー相は造影剤静注 15 分後の MI=0.2 でのハーモニック画像を on-site

で検討した。結節の最終診断については、切除された結節は組織学的診断を、非切除の結節は術後 12 ヶ月間のダイナミック CTあるいはダイナミック CT で古典的パターンを呈するか、明らかな増大傾向を示す結節を HCC と診断することとした。

（倫理面への配慮）

東京大学自主臨床試験審査委員会で承認された臨床試験をもとに行われた。ソナゾイド投与にともなう危険性としてアレルギー反応がありうるが、これまでの 4 年間で重篤なアレルギー反応の頻度はきわめてまれであることが分かっている。全患者より文書による同意を得ている。

C. 研究結果

全患者においていずれかの画像検査で指摘された結節は全部で 204 個あった。このうちダイナミック CT あるいは MRI で古典的パターンを呈した結節は 93 個であり、全て切除され組織学的に HCC と診断された。残りの 111 個の非典型結節のうち、21 個はソナゾイド術中造影超音波クッパー相で低エコーであり同じく 90 個は等エコーであった。前者の術中造影超音波クッパー相低エコー結節のうち 20 個は Gd-EOB-DTPA-MRI 所見にかかわらず最終診断が HCC であった。90 個の術中造影超音波クッパー相等エコー結節のうち、Gd-EOB-DTPA-MRI 肝細胞相では 45 個が低信号、45 個が等信号であった。低信号であった 45 個のうち 6 個が切除され、うち 4 個が組織学的に HCC と診断された。低信号結節で非切除であった 39 個のうち 8 個のみが術後画像観察で HCC と診断された。術中造影超音波クッパー相等信号、Gd-EOB-DTPA-MRI 肝細胞相で等信号であった 45 個は全て最終診断が HCC でなかった。

D. 考察

ソナゾイド術中造影超音波クッパー相で低エコーであった結節はほぼ全てが肝細胞癌であった。また、ソナゾイド術中造影超音波クッパー相で等エコーかつ Gd-EOB-DTPA-MRI 肝細胞相で等信号であった結節は全て良性腫瘍であった。ソナゾイド術中造影超音波クッパー相で等エコーであるが Gd-EOB-DTPA-MRI 肝細胞相で低信号であった結節のうち最終診断が HCC であった結節は 27% であった。

E. 結論

非典型結節のうち、ソナゾイド術中造影超音波クッパー相で低エコーであれば切除すべきであり、同じく等エコーであれば必ずしも切除しなくてよいが、Gd-EOB-DTPA-MRI で低信号であれば HCC の可能性が 20% が HCC と最終診断されるために切除が容易であれば切除してもよい。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamashiki, N., Y. Sugawara, S. Tamura, R. Tateishi, H. Yoshida, J. Kaneko, Y. Matsui, J. Togashi, M. Akahane, M. Makuuchi, M. Omata, and N. Kokudo, Postoperative surveillance with monthly serum tumor markers after living-donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepato Res*, 2010. 40(3): p. 278-86.
2. Yamamoto, K., H. Imamura, Y. Matsuyama, Y. Kume, H. Ikeda, G.L. Norman, Z. Shums, T. Aoki, K. Hasegawa, Y. Beck, Y. Sugawara, and N. Kokudo, AFP, AFP-L3, DCP, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC. *J Gastroenterol*, 2010.
3. Togashi, J., Y. Sugawara, S. Tamura, N. Yamashiki, J. Kaneko, T. Aoki, K. Hasegawa, Y. Beck, M. Makuuchi, and N. Kokudo, Donor quality of life after living donor liver transplantation: a prospective study. *J*

- Hepatobiliary Pancreat Sci, 2010.
4. Tamura, S., Y. Sugawara, N. Yamashiki, J. Kaneko, N. Kokudo, and M. Makuuchi, Pre-emptive antiviral therapy in living donor liver transplantation for hepatitis C: observation based on a single-center experience. *Transpl Int*, 2010. 23(6): p. 580-8.
 5. Takemura, N., K. Hasegawa, Y. Sugawara, K. Zhang, T. Aoki, Y. Beck, M. Makuuchi, and N. Kokudo, Morphometric analysis of caudate veins for advanced liver surgery. *HPB (Oxford)*, 2010. 12(9): p. 619-24.
 6. Tajima, T., H. Takao, H. Akai, S. Kiryu, H. Imamura, Y. Watanabe, J. Shibahara, N. Kokudo, M. Akahane, and K. Ohtomo, Relationship between liver function and liver signal intensity in hepatobiliary phase of gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging. *J Comput Assist Tomogr*, 2010. 34(3): p. 362-6.
 7. Shindoh, J., Y. Mise, S. Satou, Y. Sugawara, and N. Kokudo, The intersegmental plane of the liver is not always flat--tricks for anatomical liver resection. *Ann Surg*, 2010. 251(5): p. 917-22.
 8. Shindoh, J., H. Imamura, and N. Kokudo, Isolated sling suspension during resection of the Spiegel lobe of the liver: a safe alternative technique for difficult cases. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2010. 17(3): p. 359-64.
 9. Sakata, H., S. Tamura, Y. Sugawara, and N. Kokudo, Cost analysis of adult-adult living donor liver transplantation in Tokyo University Hospital. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2010.
 10. Orii, R., Y. Sugawara, M. Makuuchi, N. Kokudo, and Y. Yamada, Anisocoria in liver recipients during the perioperative period: Two case reports. *Biosci Trends*, 2010. 4(3): p. 148-50.
 11. Ohtomo, N., T. Tomiya, Y. Tanoue, Y. Inoue, T. Nishikawa, H. Ikeda, Y. Seyama, N. Kokudo, J. Shibahara, M. Fukayama, K. Koike, H. Shirataki, and K. Fujiwara, Expression of alpha-taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor. *Int J Oncol*, 2010. 37(6): p. 1417-23.
 12. Mise, Y., H. Imamura, T. Hashimoto, Y. Seyama, T. Aoki, K. Hasegawa, Y. Beck, Y. Sugawara, M. Makuuchi, J. Nakajima, and N. Kokudo, Cohort study of the survival benefit of resection for recurrent hepatic and/or pulmonary metastases after primary hepatectomy for colorectal metastases. *Ann Surg*, 2010. 251(5): p. 902-9.
 13. Kudo, M., K.H. Han, N. Kokudo, A.L. Cheng, B.I. Choi, J. Furuse, N. Izumi, J.W. Park, R.T. Poon, and M. Sakamoto, Liver Cancer Working Group report. *Jpn J Clin Oncol*, 2010. 40 Suppl 1: p. i19-27.
 14. Kishi, Y., H. Imamura, Y. Sugawara, K. Sano, J. Kaneko, N. Kokudo, and M. Makuuchi, Evaluation of donor vasculobiliary anatomic variations in liver graft procurements. *Surgery*, 2010. 147(1): p. 30-9.
 15. Kataoka, K., S. Seo, Y. Sugawara, S. Ota, Y.

- Imai, T. Takahashi, M. Fukayama, N. Kokudo, and M. Kurokawa, Post-transplant lymphoproliferative disorder after adult-to-adult living donor liver transplant: case series and review of literature. *Leuk Lymphoma*, 2010. 51(8): p. 1494-501.
16. Kaneko, J., Y. Sugawara, J. Togashi, S. Tamura, R. Motoi, M. Fukayama, and N. Kokudo, Sarcomatous change of hepatocellular carcinoma in a patient undergoing living donor liver transplantation. *Biosci Trends*, 2010. 4(5): p. 279-82.
17. Ishizawa, T., Y. Mise, T. Aoki, K. Hasegawa, Y. Beck, Y. Sugawara, and N. Kokudo, Surgical technique: new advances for expanding indications and increasing safety in liver resection for HCC: the Eastern perspective. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2010. 17(4): p. 389-93.
18. Inoue, Y., M. Takahashi, J. Arita, T. Aoki, K. Hasegawa, Y. Beck, M. Makuuchi, and N. Kokudo, Intra-operative freehand real-time elastography for small focal liver lesions: "visual palpation" for non-palpable tumors. *Surgery*, 2010. 148(5): p. 1000-11.
19. Inagaki, Y., W. Tang, L. Zhang, G. Du, W. Xu, and N. Kokudo, Novel aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitor 24F can suppress invasion of hepatocellular carcinoma cells as well as angiogenesis. *Biosci Trends*, 2010. 4(2): p. 56-60.
20. Inagaki, Y., W. Tang, M. Makuuchi, K. Hasegawa, Y. Sugawara, and N. Kokudo, Clinical and molecular insights into the hepatocellular carcinoma tumour marker des-gamma-carboxyprothrombin. *Liver Int*, 2010.
21. Hasegawa, K., N. Kokudo, S. Shiina, R. Tateishi, and M. Makuuchi, Surgery versus radiofrequency ablation for small hepatocellular carcinoma: Start of a randomized controlled trial (SURF trial). *Hepatol Res*, 2010. 40(8): p. 851-2.
22. Hasegawa, K., N. Kokudo, K. Sano, and M. Makuuchi, Single HCC between 2 and 5 cm: the grey zone: surgeon's perspective. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2010. 17(4): p. 430-3.
23. Deng, Y.B., G. Nagae, Y. Midorikawa, K. Yagi, S. Tsutsumi, S. Yamamoto, K. Hasegawa, N. Kokudo, H. Aburatani, and A. Kaneda, Identification of genes preferentially methylated in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 2010. 101(6): p. 1501-10.
- 2.学会発表
1. Norihiko Kokudo, Shojiro Hata, Kiyoshi Hasegawa, Taku Aoki, Yoshifumi Beck, Yasuhiko Sugawara, IS-1-3 Aggressive hepatic resection is the first-line therapeutic choice 第 110 回日本外科学会定期学術集会 2010 4月8日-10日 名古屋
2. 國土典宏, 長谷川 潔. CR-2-3 初発肝細胞癌に対する肝切除とラジオ波焼灼療法の有効性に関する多施設共同研究 (SURF Trial) 第 110 回日本外科学会定期学術集会 2010 4月8日-10日 名古屋
3. 國土典宏, 長谷川 潔, 幕内雅敏. EL1-2 肝癌診療ガイドライン 2009年版について

第 22 回日本肝胆膵外科学会学術集会
2010、5月26-28日 仙台

Surgery 2010 香港

4. Norihiro Kokudo, Takeaki Isshizawa,
Kiyoshi Hasegawa, Hiroyuki Nitta, Go
Wakabayashi and Hironori Kaneko
Laparoscopic Liver Resection in the View of
Liver Surgeon 5th Postgraduate Course of
Laparoscopic Surgery 2010 香港
5. Norihiro Kokudo, Sumihito Tamura,
Yasuhiko Sugawara Right lobe or Left lobe
5th Postgraduate Course of Laparoscopic

H. 知的財産の出願・登録状況
(予定を含む。)

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし。

肝癌早期発見を目的とした分子マーカーの探索研究

研究分担者 稲澤 謙治（東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝 教授）

研究要旨 肝癌細胞株・臨床検体を対象に、ゲノムワイドな CpG island の過剰メチル化探索、発現解析、ならびに強制発現系による機能スクリーニングを行い、それらの結果を統合的に解析することで、診断マーカー・治療標的になり得る複数の新規肝癌抑制性 miRNA を同定し、臨床的有用性の検討のための基盤を構築した。

A. 研究目的

年間約 4 万人が死亡している肝疾患は我が国の国民病であり、その多くがウイルス性慢性肝障害を基盤とする肝細胞癌（肝癌）である。肝癌の高危険群を分子病理学的に予測する試みがなされ一定の成果をあげてきているが、個性診断に耐えるマーカー群の同定には至らず適切な治療時期を失した患者も多いことから、より精緻で効率のよい早期診断法の開発が喫緊の課題である。本研究では、課題のうち、肝癌の細胞株ならびに臨床検体の包括的な分子病理学的解析に基づき、新規早期発見マーカーの開発を含む肝癌関連遺伝子マーカー、特にマイクロ RNA (miRNA) を中心にしたマーカー遺伝子候補の同定とその検出法の開発を目的とする。

B. 研究方法

3 種類の細胞株 (Hep3B、HepG2、Huh7) を用いて、Pre 型 miRNA ライブラリー (470 種類) を肝癌細胞株へ遺伝子導入した場合の細胞増殖への効果を、導入後の MTT アッセイによりハイスループットにスクリーニングし、肝癌細胞増殖抑制作用を示す miRNA 候

補を絞込んだ。同じ細胞株と正常肝組織を用いて、ゲノム上で miRNA 周囲の CpG アイランドのメチル化状態を Methylated DNA immunoprecipitation で得られた DNA を CpG island array でゲノムワイドに解析する MeDIP-chip 解析 (225 種類)、ならびに発現アレイを用いた miRNA のゲノムワイド発現解析 (866 種類) も行った。これらの結果を統合して、癌抑制活性を持つ、新規肝癌抑制 miRNA の同定を行った。

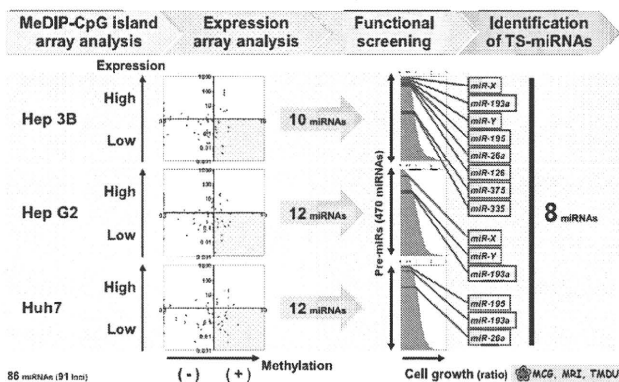
(倫理面への配慮)

本研究においては、事前に患者に対して十分なインフォームドコンセントを交わし、標本データの匿名化と孤立化によりプライバシーの完全な保護を図っている。「ヘルシンキ宣言」、「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する指針」その他を遵守し、遺伝子研究に際しては科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守するとともに「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 16 年文部科学省・厚生労働・経済産業省告示第 1 号)」に沿い、倫理委員会の審査を経て実施している。動物実験に関しても、研究機関等におけ

る動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年文部科学省告示第71号）に沿い、実験動物委員会の審査を経て実施している。

C. 研究概要

3種類の肝癌細胞株あるいは正常肝臓を対象にした、MeDIP-chip、発現、および癌細胞増殖抑制効果の網羅的解析の結果、癌特異的メチル化標的候補、癌特異的発現抑制候補、および細胞増殖抑制効果を持つ候補を得た。これらの統合により86個のmiRNAが候補に上がりそこからさらに、新規のmiRNAを含む8種のmiRNAを抽出した(図1)。これらのmiRNAは、スクリーニングの過程ならびにその後の多数の細胞株を用いた詳細な解析で癌抑制活性を確認しており、肝癌抑制miRNAと考えられた。



D. 考察

21年度までに2つの新規肝癌抑制miRNA(miR-124, miR-203)を同定した第一のスクリーニング、すなわちmiRNA周囲にあるCpGアイランドのメチル化のスクリーニングを指標にした体系的解析をさらに発展させ、本年度は、miRNAライブラリーによる癌細胞増殖抑制機能解析と、オリゴアレイを用いた発現、DNAメチル化のゲノムワイドな解析を行い、

これらを統合的に解析する第二のスクリーニングアルゴリズムを用いた。miRNA情報の充実やアレイ技術導入もあり、より多くのmiRNAが解析対象になったこと、およびスクリーニングの方向性が多面的になったことで、効果的に癌抑制活性を持つ肝癌抑制性miRNA候補を同定できたと考えられる。今後、予後を含めた肝癌の臨床病理学的因子との関連を明らかにすることでメチル化や発現を指標とした診断マーカーとしての有用性を検証するとともに、遺伝子導入により肝癌細胞株の増殖を負に制御しうることから治療に用いることができる可能性がある(図2)。また、miRNA発現ならびにそのDNAメチル化異常は、血中での検出が可能であり、臨床応用が期待される。

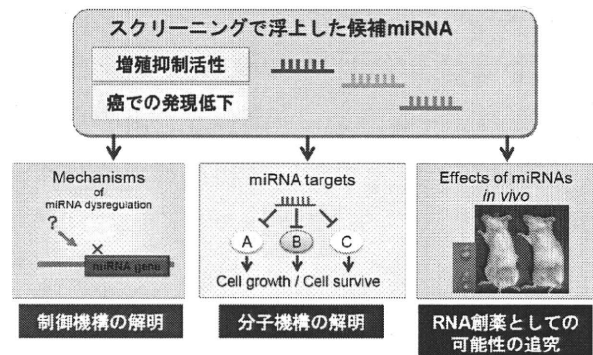


図2. 今後の展望

E. 結論

肝癌細胞株ならびに臨床検体のゲノム・エピゲノム解析と機能的スクリーニングを統合的に行うことで、効果的に新規の肝癌抑制miRNAを同定できた。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 2010;31(5):766-776.

2.学会発表

1. Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. 101th annual meeting of American Association for Cancer Research, Washington, DC, USA, 2010.4.19
2. 松村 聡, 井本逸勢, 小崎健一, 田中真二, 有井滋樹, 稲澤譲治. 肝細胞癌における CpG アイランドの過剰メチル化により発現抑制される新規がん抑制遺伝子の同定. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.9.24.
3. 古田繭子, 小崎健一, 田中真二, 有井滋樹, 井本逸勢, 稲澤譲治. Functional スクリーニングを用いた肝細胞癌抑制性 microRNA の同定. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.9.24.
4. 田中真二, 茂櫛薫, 藍原有弘, 松村聡, ヤセンマハムット, 稲澤譲治, 田中博, 有井滋樹. 肝細胞癌の肉眼形態が示す特異的遺伝子発現パターンと分子標的 EpCAM の意義第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.9.24.(ワークショップ)

5. Mayuko Furuta, Ken-ichi Kozaki, Shinji Tanaka, Shigeki Arii, Issei Imoto, Johji Inazawa. Functional genomics-assisted approach identifies candidates for tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 8 日、神戸

H. 知的財産の出願・登録状況

【特許出願】

1. 2010.3.3、「癌の検出方法および抑制方法」、稲澤譲治・小崎健一・井本逸勢・古田繭子有井滋樹、富士フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学、特願 2010-046564(P09-034)

[海外特許]

1. [米国]「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010.5.26、12/787,953 特願 2009-128162
2. [EP]「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010.5.27、10164051.4 特願 2009-128162
3. [CN]「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010.5.27、201010193364.8 特願 2009-128162

【特許取得】

月日：平成 22 年 3 月 12 日。

4. 発明の名称:新規キメラ蛋白質およびそれをコードする遺伝子、並びに、これらの遺伝子と蛋白質を用いた白血病の判別手段、
稲澤譲治、井本逸勢、他、特許第 4473870、
出願年月日：平成 16 年 2 月 26 日、取得年

2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

高分化型肝細胞癌における Glypican-3 の役割

研究分担者 山本雅一（東京女子医科大学大学 消化器外科 教授）

研究要旨 目的：高分化型肝細胞癌における Glypican-3 の役割を検討した。方法：高分化型肝細胞癌は肉眼的に小結節境界不明瞭で内部に既存の門脈域を有する早期肝細胞癌型（n=53），早期肝細胞癌の内部に脱分化した中低分化の領域を認める結節内結節型（n=35），腫瘍径 3 cm 以上の大型（n=14）とした。結果：Glypican-3 は早期肝細胞癌型 17 結節 32%，結節内結節型 27 結節 78%，大型 3 結節 22%で発現した。結語：Glypican-3 は，早期肝細胞癌からの多段階発癌に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

早期肝細胞癌をはじめとする高分化型肝細胞癌における Glypican-3 の役割を検討した。

B. 研究方法

1995 年以降の高分化型肝細胞癌 97 例 102 結節の切除標本を用い Glypican-3 の免疫染色を行った。高分化型肝細胞癌は，小結節境界不明瞭で内部に既存の門脈域を有する早期肝細胞癌型（n=53），早期肝細胞癌の内部に脱分化した中低分化の領域を認める結節内結節型（n=35），腫瘍径 3cm 以上の大型（n=14）とした。

（倫理面への配慮）

本研究においては，事前に患者に対して十分なインフォームドコンセントを交わし，「ヘルシンキ宣言」，「易学研究に関する倫理指針」，「臨床研究に関する指針」を遵守した。

C. 研究概要

Glypican-3 は早期肝細胞癌型 17 結節 32%，結節内結節型 27 結節 78%，大型 3 結節 22%で発現した。結節内結節型の Glypican-3 陽

性内訳は，12 結節（34%）が高分化型陰性で中分化型陽性、11 結節（31%）が高分化型および中分化型陽性、4 結節（13%）が高分化型陽性で中分化型陰性であった。

D. 考察

Glypican-3 は進行癌である中低分化型肝細胞癌での発現率が高いことが報告されている。肝細胞癌は早期肝細胞癌から腫瘍内の一部が中低分化に脱分化し（結節内結節），腫瘍のほぼ全体が中低分化型からなる進行癌に多段階に発育進行する。しかし早期肝細胞癌における Glypican-3 の役割は不明であった。早期肝細胞癌 32%と結節内結節の高分化型 44%で Glypican-3 が陽性であり，早期肝細胞癌から多段階に進行癌に至る過程に Glypican-3 の関与が考えられた。一方腫瘍径 3cm 以上の大型高分化型肝細胞癌では，Glypican-3 発現が少なく悪性度が低いとともに Glypican-3 発現とは異なる発癌過程が考えられた。

E. 結論

早期肝細胞癌から進行癌にいたる過程に Glypican-3 の関与が考えられた。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ariizumi S, Kotera Y, Katagiri S, Yamamoto M. Favorable Long-Term Surgical Outcomes of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Hepatitis B Envelope Antibody. J Surg Oncol.2010;101:471-475
2. Suguki T, Yamamoto M, Takasaki K. Specific Characteristics of Scirrhus Hepatocellular Carcinoma. Hepato- Gastroenterology. 2010; 93: 1086-1089.

2.学会発表

1. Chen IP, Ariizumi S, Yamamoto M. The primary investigation of Glypican 3 expression in well differentiated hepatocellular carcinoma 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society. Gifu. 2010.
2. 山本雅一. 小型肝癌の画像形態・肉眼分類による治療選択. 外科治療の立場から「小型肝癌に対する肝領域切除」. 第4回大塚リバーシンポジウム静岡, 静岡, 2010
3. Yamamoto M. Liver resection combined with IVC graft replacement. 9th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (IHPBA2010). Argentina. 2010.
4. Yamamoto M. Surgical anatomy of the liver

in the Glissonean pedicle approach-What we need to know-. The liver Cancer:diagnosis and treatments. Mongolia. 2010

5. Yamamoto M. The Value of anatomical sectionectomy for patients with a hepatocellular carcinoma 2 to 5 cm in diameter. 内科及外科新地国際研討會. Taiwan. 2010.
6. Yamamoto M. Glissonean pedicle approach for hepatic resection. German-Japanese Cancer Symposium. Cologne. 2010.
7. Yamamoto M. Symposium 2. The present status of HCC treatment in Asian countries. Systemic resection for HCC. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society. Gifu. 2010.
8. 山本雅一, 有泉俊一. パネルディスカッション 10. 肝臓学会・消化器病学会合同. 進行性慢性肝疾患からの胆管癌、混合型肝癌の発生とその病態)進行性肝性肝疾患から発生した肝内胆管癌の臨床病理像の特徴. 第14回日本肝臓学会大会, 第52回日本消化器病学会大会. 横浜. 2010.

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特に無し

肝癌高リスク群の絞り込みと早期肝癌の治療時期の判定法

研究分担者 飯島 尋子（兵庫医科大学 内科肝胆膵科 教授・超音波センター センター長）

研究要旨

肝癌の高リスク群である肝硬変を非侵襲的に判定する方法はこれまで確立していなかったが、ARFIを用いた肝硬度判定により高精度に判別できることを報告した。更にこれに影響する因子についても明らかとした。また造影超音波検査を用いた肝腫瘍微細血管構築パターンと Kupffer 相を組み合わせた悪性度分類が、境界病変と肝細胞癌の判別および肝癌組織学的分化度の推測に有用であり、治療時期の決定においても Kupffer 相が hypo となる Grade3 以上を捉えることが重要であることを示した。

A. 研究目的

- (1) 肝癌の早期発見を行うためには、高リスク群を明らかにする必要がある。肝癌の高リスク群は肝硬変であるが、この非侵襲的診断には確立された方法がないため、ARFI による線維化診断に影響する因子を明らかとし、さらにその影響の程度についても検討する
- (2) 肝内に新たな結節を認めた際、境界病変と肝細胞癌判別および組織学的分化度を造影超音波により推定する方法を検討する。さらに最適な治療時期についても検討する。

B. 研究方法

- (1) 非侵襲的な硬度測定を可能とする新たな技術である Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) を用いて、線維化グレード別の測定値(Vs 値)を明らかとし、さらに、種々の臨床パラメータと対比することで、線維化ステージの推測値に影響する要因を明らかとする。またその影響の程度についても検討する。

- (2) 造影超音波による肝腫瘍微細血管構築パターンと Kupffer 相を組み合わせた悪性度分類を、手術標本や腫瘍生検で得られた組織学的分化度と対比検討し、どの様な所見を呈した時に組織学悪性度が増悪するかを明らかとし、最適な治療開始時期を検討する。

（倫理面への配慮）

本研究はいずれも非侵襲的な検討であり、実際の臨床に沿って行われるものであるが、倫理面については当院の倫理委員会においても了承済みである。

C. 研究概要

- (1) 急性肝炎症例の経過観察から、炎症による Vs 値の上昇が確認された。その他の臨床パラメータと Vs 値の関連について検討したところ関連のある因子は F ステージ (P<0.001)、血小板 (P=0.029)、ヒアルロン酸 (P=0.003) のみであった。これにより、炎症が著しい場合は測定値に影響するものの、その影響は小さいと考えられた。

(2) 造影超音波による悪性分類と組織学的悪性度の検討では、Kupffer 相が iso となる Grade2 までには門脈侵襲陽性症例は認めなかった。また悪性度別の中分化肝癌の割合は Grade1 から 5 でそれぞれ 0%、33%、50%、87%、100%と Grade3 以降で急速に増加しており、Kupffer 相評価が重要であった。

D. 考察

ARFI を用いた肝線維化診断は、非侵襲的検査にもかかわらず、高精度に肝癌高リスク群である肝硬変患者の拾い上げに期待できる。これまで炎症や脂肪化などの背景に影響する可能性が示唆されていたため、今回 Vs 値に関連する因子について検討したところ、炎症や脂肪化では有意差を認めなかった。単変量にて解析すると炎症高度群と軽度群では高度群で高値となる傾向を認めたが、これは肝線維化グレードの交絡因子であるためと考えられ、実際の臨床現場で Vs 値は線維化診断の有用なツールとなり得る。

また我々の提唱している造影超音波検査による悪性度分類が、良好に肝細胞癌の組織学的分化度層別化可能であることはこれまでも示した。今回はさらに症例を重ねて精度を上げることで、Kupffer 相が低輝度となる Grade3 以上より特に悪性度を増すことが判明し、肝癌サーベイランスなどで発見した小結節の治療時期を決定するのに有用な指標となると考えられた。

E. 結論

ARFI は炎症等の影響の可能性はあっても、大きな補正はすることなし肝硬変を非侵襲的に判定可能な検査法であった。また造影超音

波検査による我々の肝癌悪性度分類は組織学的分化度を良好に反映し、臨床病期の判定のみならず、小肝癌の治療開始時期の判断に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

1.論文発表

1. 飯島尋子, 田中弘教, 吉田昌弘, 池田直人, 山本晃久, 岩田恵典, 榎本平之, 齋藤正紀, 今西宏安, 下村壯治, 中正恵二, 廣田誠一, 辻村亨, 西口修平. Acoustic Radiation Force Impulse による非侵襲的肝線維化診断法の有用性. 肝臓 2010 ; 51 : 54-5.
2. 田中弘教, 飯島尋子. 肝腫瘍診断および治療支援における造影超音波の基礎～投与方法, 装置法, 時相～. 肝胆膵 2010 ; 60 : 355-62.
3. 飯島尋子, 田中弘教, 吉田昌弘, 西口修平. 【マルチモダリティによる Abdominal Imaging 2010 臨床編 日常臨床における戦略と選択】 その他(最新動向) 超音波による非侵襲的肝線維化診断 剪断弾性波の特性と臨床における有用性の検討. INNERVISION 2010 ; 25 : 71-3.
4. 田中弘教, 飯島尋子, 吉田昌弘, 西口修平. Acoustic Radiation Force Impulse による肝疾患診断. 消化器内科 2010 ; 50 : 476-81.
5. 田中弘教, 飯島尋子. 早期肝細胞癌における造影超音波検査の位置づけ. 消化器内科 2010 ; 51 : 558-63.

2.学会発表

1. Iijima H, Tanaka H, Ikeda N, Enomoto H, Iwata Y, Imanishi H, Shimomura S, Fujimoto J, Hirota S, Tsujimura T, Mogushi K, Tanaka H, Nishiguchi S. Usefulness of VTTQ (Virtual Touch Tissue Quantification) to diagnose fibrosis and inflammation in chronic hepatitis. The 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2010) 2010.10 Boston
2. Iijima H, Tanaka H, Aizawa N, Ikeda N, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Iimuro Y, Fujimoto J, Nishiguchi S. Malignant grading system using the contrast enhanced agent "Sonazoid" could predict portal venous invasion by Hepatocellular carcinoma? The 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2010) 2010.10 Boston
3. Tanaka H, Iijima H, Higashiura A, Aizawa N, Ikeda N, Enomoto H, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Hirota S, Nishigami T, Tujimura T, Fujimoto J, Nishiguchi S. Prediction of portal venous invasion by malignant grading system for Hepatocellular carcinoma using Sonazoid contrast enhanced ultrasonography. 12th International symposium on ultrasound contrast imaging/2th Asian conference on ultrasound contrast imaging 2010.12 Tokyo
4. 田中弘教, 飯島尋子, 東浦晶子, 楊和典, 岩井孝史, 石井昭生, 高嶋智之, 坂井良行, 會澤信弘, 山本晃久, 池田直人, 岩田恵典, 榎本平之, 齋藤正紀, 今西宏安, 下村壯治, 西口修平. Sonazoid 造影超音波の Kupffer 相における高音圧画像評価の有用性. 第 96 回日本消化器病学会総会 日本消化器病学会雑誌,2010: 107: A303 新潟
5. 田中弘教, 飯島尋子, 岩井孝史, 楊和典, 石井昭生, 高嶋智之, 坂井良行, 會澤信弘, 山本晃久, 池田直人, 岩田恵典, 榎本平之, 齋藤正紀, 今西宏安, 下村壯治, 西口修平. 肝癌診断における EOB MRI と造影超音波検査の位置づけ. 第 46 回日本肝臓学会総会 肝臓,2010:51 Suppl.1:A40 山形
6. 田中弘教, 飯島尋子, 東浦晶子, 會澤信弘, 西上隆之, 辻村亨, 廣田誠一, 山中潤一, 藤元治朗, 西口修平. 造影超音波検査を用いた肝細胞癌の悪性度評価および分子標的薬治療効果判定. (シンポジウム) 日本超音波医学会第 83 回学術集会 超音波医学,2010: 37 Suppl.: S153 京都
7. 吉田昌弘, 田中弘教, 山平正浩, 東浦晶子, 柴田陽子, 橋本眞里子, 辻村亨, 廣田誠一, 西口修平, 飯島尋子. 肝線維化診断における Virtual Touch Tissue Quantification (VTTQ)法の有用性. (ワークショップ) 日本超音波医学会第 83 回学術集会 超音波医学,2010: 37 Suppl.: S277 京都
8. 飯島尋子, 神山直久, 吉田哲也. びまん性肝疾患のための肝表面凹凸のリアルタイム解析. (ワークショップ) 日本超音波医学会第 83 回学術集会 超音波医学,2010: 37 Suppl.: S281 京都
9. 飯島尋子, 脇英彦, 佐々木俊一, 田中弘教, 工藤篤, 有井滋樹, 市野瀬志津子, 西口修平, 和氣健二郎. 肝腫瘍の超音波診断基準の検証 ペルフルオロブタンマイクロバブルによる肝臓造影時相の定義. (特別企画)

- 日本超音波医学会第 83 回学術集会 超音波医学, 2010: 37 Suppl.: S295 京都
10. 田中弘教, 飯島尋子, 東浦晶子, 會澤信弘, 西上隆之, 辻村亨, 廣田誠一, 山中潤一, 藤元治朗, 西口修平. 造影超音波検査による肝癌悪性グレード分類を用いた門脈侵襲予測. 日本超音波医学会第 83 回学術集会超音波医学, 2010: 37 Suppl.: S313 京都
11. 吉田昌弘, 田中弘教, 吉本直喜, 會澤信弘, 齋藤正紀, 西上隆之, 辻村亨, 廣田誠一, 西口修平, 飯島尋子. 肝腫慢性肝疾患の線維化診断における肝生検組織所見と VTTQ 法の乖離例の検討. 日本超音波医学会第 83 回学術集会超音波医学, 2010: 37 Suppl.: S385 京都
12. 吉田昌弘, 田中弘教, 西村純子, 松永桃子, 奥平久美子, 平山秀男, 山中潤一, 藤本治朗, 西口修平, 飯島尋子. 肝腫瘍性病変における Virtual Touch Tissue Quantification (VTTQ)法の検討. 日本超音波医学会第 83 回学術集会 超音波医学, 2010: 37 Suppl.: S391 京都
13. 東浦晶子, 田中弘教, 山平正浩, 吉田昌弘, 柴田陽子, 橋本眞里子, 藤元治朗, 廣田誠一, 西口修平, 飯島尋子. Sonazoid 造影超音波での HCC および DN 診断における高音圧モード併用の有用性. 日本超音波医学会第 83 回学術集会 超音波医学, 2010: 37 Suppl.: S396 京都
14. 田中弘教, 飯島尋子, 西口修平. 肝細胞癌診断の超音波検査の最適化の方向性を探る. (ワークショップ) 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDDW2010) 肝臓, 2010: 51 Suppl.2: A492 横浜
15. 田中弘教, 飯島尋子, 西口修平. 費用効果からみた C 型慢性肝炎の効率的な肝癌早期診断システムを考える. (ワークショップ) 第 14 回日本肝臓学会大会 (JDDW2010) 肝臓, 2010: 51 Suppl.2: A497 横浜
- H. 知的財産の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他

肝がん早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発
(分担研究テーマ：EGFR・新生血管を標的とする肝細胞がんイメージングの基礎研究)

研究分担者 佐賀 恒夫 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター
分子病態イメージング研究グループ・グループリーダー

研究要旨：肝がん細胞膜に発現する上皮成長因子受容体(EGFR)を標的とするイメージング法、および血管新生を標的とした肝がんイメージング法の開発に向けた基礎検討を継続して行った。ヒト肝がん細胞株のうちEGFRを高発現しかつヌードマウスで造腫瘍性のあるHuH-7細胞をモデルとして、前年度までの検討で優れた成績を収めてきたヒト抗EGFR抗体048-006のIgGを低分子化した048-006 scFvCLについて比較検討を進め、インビトロにおいて放射性標識したscFvCLがHuH-7細胞にIgGと同様に高い結合性を示すこと、より早期に高い腫瘍/血液比が得られるが腫瘍への集積量が減少するなど、必ずしも腫瘍イメージングに好ましい体内挙動が実現できないことを明らかにした。また、血管新生を標的とした肝がんイメージング法については、新生血管内皮細胞に高発現する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに特異的に結合する環状RGDペプチド4量体のCu-64標識体についての検討を進め、この標識体が細胞自体には $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現が認められなかったHuH-7移植腫瘍に低-中程度の集積を示すこと、および、腫瘍内で標識体の分布が高かった部位と血管が多くみとめられた部位には重なる部分が多いことを観察した。

A. 研究目的

上皮成長因子受容体(EGFR)の過剰発現や変異は、種々のがん細胞で認められ、抗体や関連するキナーゼ阻害剤など、EGFRを標的とする分子標的治療も試みられている。本研究では、肝細胞がんの早期診断に向けて、肝がん細胞膜に発現するEGFRを標的とする抗体イメージング法の開発に向けた基礎検討を行う。

一方、血管新生はがんの増殖のみならず、浸潤・転移形成に深く関わっており、治療の重要な標的であり、肝がんに対する抗血管新生療法も行われている。癌組織内の血管新生の情報は、がんの診断のみならず、抗血管新生治療の奏功する患者の選択や治療モニタリングにも重要な意義を有する。そこで、がんの血管新生を標的

とするイメージング法の基礎研究もあわせて行うこととした。

B. 研究方法

I : EGFR イメージング研究

1. ヒト肝がん細胞株と低分子量放射性標識抗体(048-006 scFvLC)とのインビトロでの結合性と内在化

ヒト抗EGFR抗体048-006を低分子量化したscFvLC(藤田保健衛生大学黒澤教授より供与)をクロラミンT法でI-125標識、または、CHX-A"-DTPAを用いてIn-111標識して、種々の濃度のHuH-7細胞と4℃で1時間反応、その後細胞を洗浄し、細胞に結合した放射能を測定した。また、一定数の細胞と標識抗体を用いての

結合実験の際に、種々の濃度の非標識抗体を加える競合阻害実験も行った。

次いで、標識抗体が細胞に結合した後に細胞を洗浄、標識抗体を含まないメディウムに変え、37°Cでインキュベート、経時的に放射能の局在(細胞内に存在、膜に結合した状態で存在、メディウム中で蛋白結合した状態で存在、メディウム中で蛋白から遊離した状態で存在)の変化を調べ、内在化の有無を検討した。

2. 担がんマウスでの低分子量標識抗体(048-006 scFvLC)の体内分布評価

HuH-7 ヒト肝がん細胞 2×10^6 個をマトリゲルと共にヌードマウスに皮下投与して作製した担がんマウスに、In-111 標識した 048-006 の scFvLC (37kBq/5 μ g) を静脈内投与し、投与 2、6、12 時間後にマウスを屠殺し、血液を採取、腫瘍、各臓器を摘出し、それぞれ放射能を計測し、抗体の体内分布・腫瘍集積性を評価した。

II : 血管新生イメージング研究

1. 肝がん細胞移植腫瘍における $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現と血管新生についての検討

SK-Hep および HuH-7 ヒト肝がん細胞 2×10^6 個をマトリゲルと共にヌードマウスに皮下投与し移植腫瘍を作製した。4-8 週間後、腫瘍を摘出、固定して腫瘍組織の切片を作製し、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンおよび新生血管の内皮に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、腫瘍組織の $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現および血管形成の状態を観察した。

2. ^{64}Cu 標識環状 RGD ペプチド 4 量体の肝がん細胞移植腫瘍への集積および腫瘍内分布についての検討

環状 RGD ペプチド 4 量体にサイクロムを結合した化合物(グルノーブル大学 Dumy 教授らによ

り合成)の 1 mM 水溶液と $^{64}\text{CuCl}_2$ のクエン酸アンモニウム溶液(約 740MBq/ml)を 1:1 で混和、37°Cで 1 時間インキュベートし、ほぼ 100%の放射化学的純度で ^{64}Cu 標識環状 RGD ペプチド 4 量体を得た。ヌードマウス皮下に HuH-7 細胞 2×10^6 個をマトリゲルとともに投与、4-6 週間後、腫瘍塊の径が 5-10mm に成長した段階で、 ^{64}Cu 標識環状 RGD ペプチド 4 量体約 11MBq を尾静脈より投与、1 および 3 時間後に小動物 PET により撮像し、腫瘍および他の臓器への ^{64}Cu 標識環状 RGD ペプチド 4 量体の集積を検討した。また、PET 撮像後に腫瘍を摘出、速やかに凍結し、凍結切片を作製、オートラジオグラフィにより ^{64}Cu 標識環状 RGD ペプチド 4 量体の腫瘍内分布を調べるとともに、近隣切片について CD31 に対する抗体を用いる免疫組織染色を行って血管の分布を調べ、両者を比較した。

3. ^{125}I 標識 VEGF の肝がん細胞への結合および担がんマウスでの体内分布についての検討

マウス VEGF₁₂₀、ヒト VEGF₁₂₁ および VEGF₁₆₅ 溶液(マウス VEGF₁₂₀、ヒト VEGF₁₂₁ については 0.2mg/ml、ヒト VEGF₁₂₁ については 0.4mg/ml の 30mM リン酸緩衝液、pH7.5) 20 μ l に 3.7MBq の ^{125}I -NaI 溶液を加え、さらに 1 μ g のクロラミン T 溶液を付加、5 分間室温にて反応させた。反応後、Sephadex G25 spin カラムにより、標識 VEGF と遊離 ^{125}I を分離、標識率と VEGF 1 分子あたりに結合した ^{125}I の数を検討し、VEGF 1 分子あたり 0.8-1.6 分子の ^{125}I が結合していることを確認した。標識した各 VEGF 約 1KBq を肝がん細胞 (HuH7 および SK-HEP) および内皮由来細胞 (2H-11)、それぞれ $1-10 \times 10^5$ 個と 4°C で 1 時間反応、その後細胞を洗浄し、細胞に結合した放射能を測定した。

ヌードマウス皮下に HuH-7 細胞 2×10^6 個をマ

トリゲルとともに投与、約4週間後、約40kBqの ^{125}I 標識 VEGF $_{121}$ を静脈内投与し、投与2時間後にマウスを屠殺し、血液を採取、腫瘍、各臓器を摘出し、それぞれ放射能を計測し、抗体の体内分布・腫瘍集積性を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験の内容は、所内の動物実験委員会の承認を得て、動物実験等に関する規程に沿って行った。

C. 研究結果

I : EGFR イメージング研究

1. ヒト肝がん細胞株と低分子量標識抗体(048-006 scFvLC)とのインビトロでの結合性と内在化

I-125標識およびIn-111標識したヒト抗EGFR抗体048-006のscFv-CLは、HuH-7細胞に対して、IgGと同等の高い結合性を示した(図1)。競合阻害実験から求めた結合親和性は、 $2.3 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ (I-125標識)、 $4.2 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ (In-111標識)となりIgGよりも若干低下した(図2)。

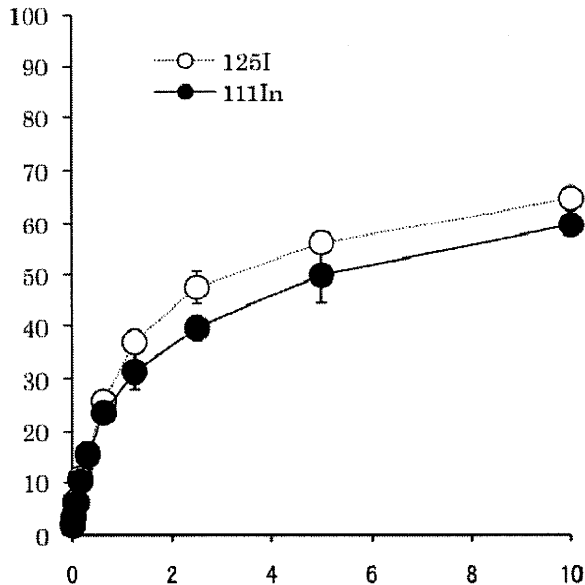


図1. 放射標識抗体(scFvLC)の結合率

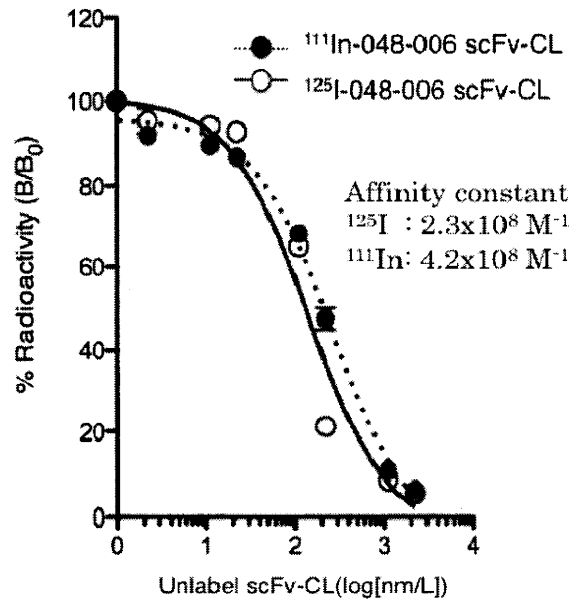


図2. 放射標識抗体(scFvLC)の親和性

標識 scFv-CL の細胞結合後の挙動については、I-125 標識抗体では、時間とともに膜に結合した標識抗体が細胞内に内在化し、そこで代謝を受けて生じた遊離 I-125 が細胞外に排出されること、In-111 標識抗体では、内在化して代謝を受けた後も、放射能は細胞内に留まることが示された(図3, 4)。

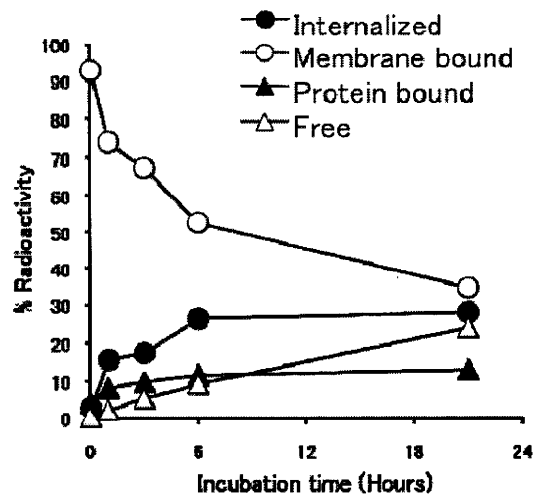


図3. ^{125}I 標識抗体(scFvLC)の局在の経時変化