

癌幹細胞のマイクロRNA制御とエクソソームDDSによる治療応用

研究分担者 落谷孝広 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野

研究要旨

初年度は、膵臓がんのがん幹細胞の生物学的特性の解明と、癌幹細胞の代謝特性を標的とした治療法を開発する第一歩として、STEM細胞の未分化能維持のために独自に開発した YPAC 培地(PNAS, 2010)によるヒト膵臓がん細胞の培養を実施した結果、薬剤耐性かつ自己複製能を保持した分画の培養が可能となり、初年度の計画を無事に遂行した。さらに、癌幹細胞特異的なエクソソームデリバリーの開発に着手し、基礎的なデータ収集を終え、膵臓がん特異的なデリバリーの開発に着手した。また癌幹細胞を制御するマイクロRNAの全体像の把握を終え、本研究班の最大の目的である、癌幹細胞の代謝特性の異常を標的とした治療戦略が可能な microRNA の確定に至る重要な成果を上げた。

A. 研究背景、目的
(背景)

本研究の目的はマイクロRNAを主体とした核酸医薬による癌幹細胞の代謝特性の標的治療法の確立に有る。初年度は、1)膵臓がんのがん幹細胞の生物学的特性を解明する第一歩として、我々がSTEM細胞の未分化能維持のために開発したYPAC培地(PNAS, 2010)によるヒト膵臓がん細胞の培養を実施する、2)膵がん細胞特異的なDDSとして、細胞外分泌顆粒であるエクソソームに着目し、癌幹細胞特異的デリバリー方法の基盤研究を実施する、3)癌幹細胞を制御するマイクロRNAの全体像の把握する、等の項目に焦点を付いた研究を実施した。(分担者の研究背景):落谷らは乳がんの薬剤耐性に関する新しい分子RPN2を同定するとともに(Nat Med 2008)、RPN2が乳がんの中でも治療困難とされるトリプルネガティブの患者において高発現していることや、CD44+/CD24-の癌幹細胞にも強く発現している事を明らかにした。さらにはRPN2を抑制する核酸医薬を開発し、サルでの安全性やイヌの自然発生腫瘍での前臨床試験を実施中である。またmicroRNAの癌治療研究にも経験が豊富であり(Mol Ther 2010, 2011; J Cell Biol2011)、特にmicroRNAを補充する治療方法は独創的な方法であり、世界でも落谷らのDDSによる癌治療実験の報告(Proc Natl Acad Sci USA 2007)が最初の例である。これに加えて、落谷らは癌細胞が分泌する小胞顆粒であるエクソソームに注目し、その中に包埋されるmicroRNAsが細胞間でデリバリーされる事を世界で初めて報告した3つのグループのひとつであり(JBiol Chem

2010)、エクソソームを用いた新規デリバリーシステムの開発に従事している。この他に、落谷らは、膵臓癌の動物発癌モデルを遺伝子改変ラットにおいて実現し(Carcinogenesis 2006)、このTgラットは世界中で膵臓癌のモデル動物として普及しつつある。さらに、落谷らはラットES細胞の樹立に成功し(Proc Natl Acad Sci USA 2010)、Oct4-venusTgラットを作製する等、成体の幹細胞をイメージングで追跡可能なin vivo技術を有することから、膵臓癌幹細胞による発がんモデル動物の作製をも視野に入れた研究が可能である。

B. 研究方法

1)我々がSTEM細胞の未分化能維持のために開発したYPAC培地(PNAS, 2010)によるラット正常膵臓細胞、ヒト膵臓がん細胞株の培養を実施した。観察点は、膵がんの癌幹細胞とされるCD133/CD44陽性分画の培養維持である。2)膵がん細胞特異的DDSの開発に関しては、ヒト間葉系幹細胞の分泌するエクソソームにsiRNA, miRNAのパッケージングの方法を確立する事に重点を置く。3)癌幹細胞を制御するマイクロRNAの全体像の把握に関しては、ヒト乳がんでのmicroRNAs探索の結果をもとにしたcandidate解析を実施する。

(倫理面への配慮)

本研究で平成23年度に実施する内容はヒト検体を扱わないため、倫理委員会への承認事項は生じないが、がん細胞や動物実験に関しては、倫理規定に沿った計画的研究を実施する。

C. 研究結果

1) YPAC 培地による培養は、正常、および癌幹細胞の未分化能維持に重要であった。正常のラット膵臓細胞の primary culture において、膵臓の腺管構造を保持した長期間の培養維持が可能であった。さらに、ヒト膵臓がん細胞の CD133/CD44 陽性分画の未分化能維持にも効果的であった。

2) 間葉系幹細胞のエクソソーム内に siRNA, miRNA 等の治療用核酸医薬を封入する方法を検討した結果、最も効果的にこれらの核酸を封入する方法は、エレクトロポレーション法である事が判明した。具体的には、血管新生の抑制効果の判明している microRNA を封入した結果、エレクトロポレーションによる方法が最も効率よく核酸を取り込み、かつヒト血管内非細胞の管腔形成を高率に阻害した。

3) 癌幹細胞を抑制する効果の有る microRNA として miR-27b を選択した。

D. 考察

初年度は、膵臓がんのがん幹細胞の生物学的特性の解明と、癌幹細胞の代謝特性を標的とした治療法を開発する第一歩として、STEM細胞の未分化能維持のために独自に開発した YPAC 培地(PNAS, 2010)によるヒト膵臓がん細胞の培養を実施した結果、薬剤耐性かつ自己複製能を保持した分画の培養が可能となり、初年度の計画を無事に遂行した。さらに、癌幹細胞特異的なエクソソームデリバリーの開発に着手し、基礎的なデータ収集を終え、膵臓がん特異的なデリバリーの開発に着手した。また癌幹細胞を制御するマイクロ RNA の全体像の把握を終え、本研究班の最大の目的である、癌幹細胞の代謝特性の異常を標的とした治療戦略が可能なる microRNA の確定に至る重要な成果を上げた

E. 結論

癌幹細胞の代謝特性を標的とした治療戦略のめどを立てる事が出来たところは、初年度の成果としては大きな全身であり、同研究班の研究チームとの強力な連携が取れる事に繋がる。今後、癌幹細胞の代謝特性を制御する CD44v を microRNA でマネジメントする戦略の実現に向けた努力を継続する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Hagiwara K, Takeshita F, Ochiya T. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J Biol Chem*, 287: 1397-1405, 2012.
2. Yamamoto Y, Yoshioka Y, Minoura K, Takahashi RU, Takeshita F, Taya T, Horii R, Fukuoka Y, Kato T, Kosaka N, Ochiya T. An integrative genomic analysis revealed the relevance of microRNA and gene expression for drug-resistance in human breast cancer cells. *Mol Cancer*, 10: 135, 2011.
3. Ono M, Fujiwara Y, Ochiya T. Breast cancer stem cell: translating to the clinic. *Stem Cells and Cancer Stem Cells*, Vol 4, Springer, in press
4. Udagawa T, Narumi K, Goto N, Aida K, Suzuki K, Ochiya T, Makimoto A, Yoshida T, Chikaraishi T, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma. *Hum Gene Ther*, in press
5. Narumi K, Udagawa T, Kondoh A, Kobayashi A, Hara H, Ikarashi Y, Ohnami S, Takeshita F, Ochiya T, Okada T, Yamagishi M, Yoshida T, Aoki K. In vivo delivery of interferon- α gene enhances tumor immunity and suppresses immunotolerance in reconstituted lymphopenic hosts. *Gene Ther*, in press
6. Kawamata M, Ochiya T. Gene-manipulated embryonic stem cells for rat transgenesis. *Cell Mol Life Sci*. 68:1911-1915, 2011
7. Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, Kosaka N, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Kobayashi E, Yamada T, Kawai A, Inoue T, Ito H, Oshimura M, Ochiya T. MicroRNA-143 Regulates Human Osteosarcoma Metastasis by Regulating Matrix Metalloprotease-13 Expression. *Mol Ther*. 19, 1123-1130, 2011

2. 学会発表

1. Ochiya T. Ribophorin (RPN2) as a novel therapeutic target for cancer stem cells. International Conference and Exhibition on Cancer Science and Therapy 15-17, Las Vegas, USA. August 12-18
2. Ochiya T. Ribophorin (RPN2) as a novel therapeutic target for cancer stem cells. 16th European Meeting for Vascular Biology and Medicine, 2011, Krakow, Poland. September

4-10

3. Ochiya T. nSMase 2 regulates metastatic ability of breast cancer cells through the regulation of exosome secretion. Exosomes and Microvesicles 2011, Orlando, USA. October 14-19

G. 知的財産権の出願・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
特になし。

細胞初期化技術を用いた癌幹細胞の分化転換および分化誘導方法の開発と、その癌治療への応用

研究分担者 山田泰広 京都大学 iPS 細胞研究所

研究要旨

がん細胞の分化状態は、がん細胞の性質維持に深く関与していることが予想されている。本研究では、細胞初期化技術をがん細胞に応用し、がん幹細胞の分化状態の変化誘導を試み、がん治療への応用の可能性を検討することを目的とした。本年度は、がん細胞がどの程度初期化するのかについて検討を行った。まず家族性大腸腺腫症のマウスモデルを用いて大腸腫瘍細胞の初期化を目指した。大腸腫瘍細胞は部分的に初期化されたものの、完全な細胞初期化は誘導できなかった。同様に、明細胞肉腫のモデルマウスを用いて肉腫細胞株の初期化を試みた。明細胞肉腫細胞株からは Nanog 陽性の初期化された細胞株を得ることが可能であり、樹立された細胞はテラトーマ形成能を有することが分かった。以上の結果から、少なくとも一部のがん細胞は、初期化および分化転換が可能であることが示唆された。

A. 研究背景、目的 (背景)

がん細胞と組織幹細胞の性質にはしばしば類似性が認められる。がん細胞は未分化状態を保つことで、自己複製能を維持していることが予想されている。また古くから発がんの組織特異性が知られている。以上のことは、細胞の分化状態ががん細胞の発生、維持に関与していることを示唆している。

2006年に山中らによって報告された induced pluripotent stem (iPS)細胞作製技術により、体細胞を多能性幹細胞に変化させることが可能となった。iPS細胞は体内の様々な細胞から樹立可能で、一方で全ての細胞に分化する能力を有していることから、iPS細胞作製技術により、あらゆる細胞の分化状態を変化させることを可能とした。

本研究では、iPS細胞作製技術を細胞の分化状態を変化させるツールとしてとらえ、がん細胞に応用することで、がん細胞の分化状態に変化を誘導することを試みた。がん細胞の分化状態変化に伴う性質変化を明らかにすることで、革新的治療方法開発への可能性を検討した。

B. 研究方法

本年度は、まずがん細胞がどの程度初期化可能かについて検討を行った。

【実験1】

まず、家族性大腸腺腫症のモデルマウスである Apc Min マウスの大腸腫瘍の初期化を試みた。Apc Min マウス大腸腫瘍を初代培養後、レトロウイルスにより山中 4 因子 (OCT3/4,

KLF4, SOX2, CMYC)を導入し、iPS 細胞樹立を試みた。

樹立された iPS 様細胞はフィーダー細胞として MEF を使用し、LIF 存在下で未分化状態を維持した。大腸腫瘍由来 iPS 様細胞の未分化状態の評価は、アルカリフォスファターゼ染色及び未分化マーカーである Nanog、Fbxo15 の発現により検討した。得られた細胞株が腫瘍細胞由来であることを確認するために Apc 遺伝子の LOH を PCR-RFLP 法にて検討した。

得られた細胞株の in vitro での分化誘導は、MEF、LIF 非存在下での培養により行い、生体内での分化誘導は Nude マウス皮下での腫瘍形成、及びマウス初期胚へのインジェクションによるキメラマウス作製によって行った。E9.5-E13.5 での iPSC 様細胞の寄与について検討した。

【実験2】

Apc Min マウス大腸腫瘍の初期化に加えて、明細胞肉腫細胞株の初期化も試みた。明細胞肉腫腫瘍株を得るために明細胞肉腫マウスモデルの作製を行った。明細胞肉腫で検出される EWS/ATF1 融合遺伝子を発現誘導できるマウスの作製を行った。得られた皮下腫瘍から培養細胞株を樹立し、レトロウイルスにより山中 4 因子 (OCT3/4, KLF4, SOX2, CMYC)を導入し、iPS 細胞樹立を試みた。

得られた細胞株に対して Nanog 遺伝子の発現を確認するとともに、Scid マウス皮下でのテラトーマ形成能を評価し、未分化性、多能性の検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、京都大学 iPS 細胞研究所動物実験委員会での承認を得た後、動物愛護に配慮し、3R の精神に則って行った。

C. 研究結果

【実験 1】

Apc Min マウス大腸腫瘍に山中 4 因子を導入することで、形態が iPS/ES 細胞に類似した細胞株を得ることが出来た。得られた iPSC 様細胞では Apc 遺伝子の LOH が確認され、腫瘍細胞由来であることが確認された。樹立した細胞株ではアルカリフォスファターゼ活性を有し、初代 iPS 細胞(2006)のマーカである Fbxo15 遺伝子の発現上昇が確認された。しかしながら、完全初期化のマーカとして用いられる Nanog の発現上昇は確認されず、得られた細胞は部分的に初期化された細胞であることが示唆された。

得られた細胞に in vitro で分化を誘導すると、細胞の形態は速やかに変化した。分化様細胞では、Cdx2 や Eomes の発現上昇が確認された。Cdx2 や Eomes は胎盤分化に重要な転写因子であることが報告されており、栄養膜細胞への分化誘導が示唆された。Nude マウス皮下に腫瘍を形成させると、明らかなテラトーマ形成は確認されず、比較的未分化な細胞の増生からなる腫瘍形成が確認された。腫瘍では Oct3/4 の発現低下に伴い、Cdx2 の発現誘導が確認された。

大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞を、マウス初期胚にインジェクションすることで、キメラマウスを作製し、iPSC 様細胞の寄与について検討を行った結果、胎児成分への寄与は確認されなかったが、胎盤の一部に大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞が寄与していることが明らかとなった。

【実験 2】

EWS/ATF1 遺伝子強制発現により、皮下腫瘍形成が認められた。皮下腫瘍は組織学的にヒト明細胞肉腫に類似し、明細胞肉腫で発現するマーカの発現が確認された。マウス皮下腫瘍より細胞株を樹立し、山中 4 因子を導入することで、肉腫腫瘍株より、形態が iPS/ES 細胞に類似した細胞株を得ることが出来た。樹立した細胞株の一部では、完全初期化のマーカである Nanog の発現が確認され、発現レベルも ES 細胞と遜色無いレベルであった。得られた細胞株を Scid マウス皮下に移植することで、異なる三胚葉に分化するテラトーマの形成が確認された。

D. 考察

がん細胞がどの程度初期化可能かの検討を行った。Apc Min マウス大腸腫瘍の初期化の試みでは、現在の所 Nanog を発現するような完全に初期化された細胞は樹立できていない。しかしながら、不完全に初期化された細胞であっても、栄養膜細胞への分化転換が可能であることが示唆され、がん細胞の分化転換が可能であることが示唆された。一方で明細胞肉腫細胞株からは Nanog 陽性細胞の樹立が可能であり、がん種によっては完全な初期化が可能であることが示唆された。

E. 結論

少なくとも一部のがん細胞は初期化が可能であり、初期化後の再分化によるがん細胞の分化転換が可能であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T and **Yamada Y***. Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis. *Development*, in press, 2012

Hatano Y, **Yamada Y***, Hata K, Phutthaphadoong S, Aoki H and Hara A. Genetic ablation of a candidate tumor suppressor gene, *Rest*, does not promote mouse colon carcinogenesis. *Cancer Sci*, 102: 1659-1664, 2011.

2. 学会発表

Yamada Y, Role of epigenetic modifications in multistage colon carcinogenesis, 27th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Jeju, Republic of Korea, Nov. 2011.

G. 知的財産権の出願・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

特になし。

固形がん幹細胞を標的とした革新的治療法の開発に関する研究

研究分担者 石井秀始 大阪大学大学院 消化器癌先進化学療法開発学寄附講座 教授

研究要旨

森総括班の方針に従い、癌細胞の性質を大きく変化させるリプログラミング方法の医療応用の実現に向けて基盤構築を行った。最近注目されている epigenetic RP 誘導に加えて、本研究ではマイクロ RNA による RP 誘導の基盤を構築しメカニズム解析した。その結果、新たに癌幹細胞の根絶を目指す代謝特性を利用した metabolic RP が方法論として構築され、難治性消化器癌の革新的な治療に向けて大きく展開された。

A. 研究背景、目的

(目的)

造血器腫瘍等の化学療法に高感受性を示す腫瘍に対する治療では、治療により腫瘍の縮小を含む顕著な縮小効果が期待できて治療を目指した治療戦略となるが、それとは対照的に、消化器癌等の固形癌では一般に化学療法に低感受性であり、手術不適応の進行癌は極めて難治性であり、その克服は国民の喫緊の課題である。その克服のために、癌幹細胞と呼ばれる治療抵抗性細胞の生物学的弱点を先端的基礎研究によって明らかにし、それらの所見を強力な共同研究体制によって融合、増幅することによりトランスレーショナル研究を推進し、最終的には革新的治療法の開発とその実施を達成することを目的とする。その目標達成のために、新しいリプログラミング技術を用いて癌幹細胞の性状を大きく変換させ、また同技術を用いて宿主免疫細胞(リンパ球・ニッチ)に対しては、リンパ球等免疫担当細胞の大幅な賦活化を図り、ニッチ制御による兵糧攻めを加えて、固形癌治療効果を最大限に高める。

B. 研究方法

本申請のための予備段階として、消化器癌(肝臓癌)の癌幹細胞に関して、2種類

(CD13+CD90-細胞周期静止期癌幹細胞と、CD13-CD90+活動期癌幹細胞)を同定した。細胞周期静止期癌幹細胞では、活性酸素の解毒制御が亢進し、酸化ストレス耐性の機構が明らかとなり、これが抗癌剤・放射線療法抵抗性の本態を成すことが明らかとなった。従来の薬剤を用いてもこの克服は困難であり、耐性の付加的獲得を繰り返すことから、根本的に革新的な創薬が望まれる状況である。そこで本申請においては、更にスクリーニングを進めて、癌幹細胞の治療抵抗性に深く関わる標的分子を同定するとともに、この最も強い治療抵抗性を示す静止期癌幹細胞に対して、細胞の再プログラム化を誘導して、細胞の性質を大きく変換することを研究する。この分子の酸化ストレス特性は佐谷らの分子 CD44 とも類似した特性を示すことから、これが癌幹細胞の本態であることを強く示唆することから協力して研究を進める。医療応用を目指す場合には、安全性と高効率化が要となるため、安全性は代表者森ら(人工合成核酸創薬)、分担者落谷・片岡ら、高効率化は分担者中内・山田らと密接に連携する。

●治療抵抗性に深く関わる癌幹細胞表的分子の同定:網羅的抗体アレイで抗癌剤耐性に深く関わる新規分子を同定する。

●再プログラム化を癌(幹)細胞で実現:山中因子以外に、人工合成核で高度で簡便な細胞の再プログラム化を目指す。

●消化器癌幹細胞の遺伝子制御の解明:マイクロRNA生成機構を操作することにより、耐性機構を具体的な分子として提示することにより創薬に展開する。網羅的遺伝子発現・マイクロRNA発現解析のデータに基づき、細胞周期静止期癌幹細胞を安全・効果的に標的化し撲滅するための基盤を構築する。

(倫理面への配慮)

●実験動物使用を含む研究計画:

動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号)、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)、大阪大学動物実験規則を遵守する。

●ヒトゲノム・遺伝子解析研究を含む研究計画:

平成16年度に改正された文部科学省、厚生労働省、経済産業省によるヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき研究を遂行する。ヘルシンキ条約に則りインフォームドコンセントを行い、同意の得られた検体のみを使用し、個人情報の匿名化と守秘は厚生労働省および大阪大学の既定に則って行う。

●遺伝子組換え実験を含む研究計画:

遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律(「バイオ

セーフティに関するカルタヘナ議定書」に基づくカルタヘナ法)」の定める細則と、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の定める細則、ならびに施設内の組み換えDNA実験指針の基準に従って、定められた基準に適合することを確認し、指針に従ってDNA組み換え実験委員会等の倫理審査委員会の審査を経る手続きを適切に行う。

●臨床研究に関する倫理指針:

厚生労働省(臨床研究に関する倫理指針)および大阪大学の既定の指針および細則、規則に則って、円滑に臨床研究を行うために研究者等が遵守すべき事項に従う。

●疫学研究に関する倫理指針:

厚生労働省(臨床研究に関する倫理指針)および大阪大学の既定の指針および細則、規則に則って、円滑に臨床研究を行うために研究者等が遵守すべき事項に従う。

●ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針:

厚生労働省(臨床研究に関する倫理指針)および大阪大学の既定の指針および細則、規則に則って、円滑に臨床研究を行うために研究者等が遵守すべき事項に従う。

C. 研究結果

治療抵抗性に深く関わる癌幹細胞表的分子の同定として、網羅的抗体アレイで抗癌剤耐性に深く関わる新規分子を同定した。治療抵抗性のクローンとして複数の表面抗原を同定して解析したところ、癌細胞の代謝特性に関わるもの、細胞の動きに関わるものの2種類に大きく類別できることが明らかとなった。血

管内皮増殖因子受容体の情報伝達経路に結合する神経ガイダンス分子類似の蛋白質を同定した。再プログラム化を癌(幹)細胞で実現として山中因子以外に、人工合成核で高度で簡便な細胞の再プログラム化を目指して、3種の完全人工合成リボ核酸分子(mir-200c, 302, 369)のみにより、脂肪幹細胞から出発してES/iPS細胞に類似の多能性を誘導することが出来た(epigeneticリプログラミング)。マウスでキメラマウス、生殖細胞系列への移行を認め、マウス・ヒトでテラトーマを形成した。さらに癌細胞でこれらマイクロRNAを導入すると、細胞の系譜を根本から変革させ、新たな治療策定に向けて基盤を構築した。特にマイクロRNAの標的に焦点を当てて研究を進め、癌細胞の代謝特性としての酸化ストレス応答に関わる機構を解明した。消化器癌幹細胞の遺伝子制御の解明としてマイクロRNA生成機構を操作することにより、耐性機構を具体的な分子として提示することにより創薬に展開を図った。網羅的遺伝子発現・マイクロRNA発現解析のデータに基づき、細胞周期静止期癌幹細胞を安全・効果的に標的化し撲滅するための基盤を構築した。

D. 考察

私達を含む内外の研究により、癌幹細胞の性質を大きく変革できる技術開発の道が拓けた。現在可能な細胞リプログラミング(RP)方法には『3種類』が注目されている。第一は転写因子による epigenetic RP 誘導(京都大学山中先生 iPS 細胞/我々はこれを癌に応用した[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(1), 40-45, 2010])。第二はマイクロRNAによる RP 誘導(我々[*Cell Stem Cell*, 8,376,2011]、および米国 Morrissey 博士[*Cell Stem Cell*, 8,633,2011]

の mi-iPS 細胞)。第三は、癌幹細胞の根絶を目指す代謝特性を利用した metabolic RP であり、本申請で研究開発する。

三番目の metabolic RP に関しては、現在注目されている pathway は、嫌気性解糖系とアミノ酸合成系(特にグリシン)であり、『癌細胞では正常酸素分圧にも関わらず嫌気性解糖系が優位に働き、低いエネルギー産生効率の中で多量のバイオマスを生産している(Warburg 効果)』が知られている。鍵を握る酵素として、pyruvate kinase(PKM2), glycine decarboxylase(GLDC), Isocitrate dehydroxylase(IDH), phosphoglycerate dehydroxylase(PHGDH) の4つが知られているが、Bioinformatics から10前後が Driver Enzymes とされる(*Cell*,148,1-14,2012)。本申請でこれらを同定し創薬シーズに上げる。

E. 結論

革新的な医療を創出して出来るだけ早く臨床現場に展開するための創薬シーズの開発に向けて着実な基盤を構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Moriwaki K, Okudo K, Haraguchi N, Takeishi S, Sawaki H, Narimatsu H, Tanemura M, Ishii H, Mori M, Miyoshi E. Combination use of anti-CD133 antibody and SSA lectin can effectively enrich cells with high tumorigenicity. *Cancer Sci*, 102(6), 1164-1170, 2011.
- 2) Nishida N, Mimori K, Fabbri M, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M. MicroRNA-125a-5p is an independent

prognostic factor in gastric cancer, and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in combination with trastuzumab. *Clin Cancer Res*, 1;17(9), 2725-2733, 2011.

- 3) Ohkuma M., Haraguchi N., Ishii H., Mimori K., Tanaka F., Kim HM., Shimomura M., Hirose H., Yanaga K., Mori M. Absence of CD71 transferrin receptor characterizes human gastric adenocarcinoma stem cells. *Ann Surg. Oncol*, 2011 (in press).
- 4) Hirose H., Ishii H., Mimori K., Tanaka F., Takemasa I., Mizushima T., Ikeda M., Yamamoto H., Sekimoto Doki, Y., Mori, M. The significance of PITX2 overexpression in human colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 18(10), 3005-3012, 2011
- 5) Kita Y, Mimori K, Iwatsuki M, Yokobori T, Ieta K, Tanaka F, Ishii H., Okumura H, Natsugoe S, Mori M. STC2: A Predictive Marker for Lymph Node Metastasis in Esophageal Squamous-Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 18(1), 261-272, 2011.
- 6) Takahashi H, Ishii H., Nishida N, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yokobori T, Mimori K, Yamamoto H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Significance of Lgr5(+ve) Cancer Stem Cells in the Colon and Rectum. *Ann Surg Oncol*, 18(4), 1166-1174, 2011.

2. 学会発表

- 1) 石井秀始、他：癌・固形腫瘍の診断・治

療、第 21 回日本サイトメリー学会学術集会、2011 年 6 月 25 日 京都

- 2) 友國晃、他：肝細胞癌の再発・転移を制御する microRNA の探索、第 21 回日本サイトメリー学会学術集会、2011 年 6 月 25 日 京都
- 3) 山下晋也、他：転移性大腸癌患者における骨髄中細胞の分画分析、第 21 回日本サイトメリー学会学術集会、2011 年 6 月 25 日 京都
- 4) 原口直紹、他：肝臓癌幹細胞の分離・同定と治療標的化へ向けた検討、第 21 回日本サイトメリー学会学術集会、2011 年 6 月 26 日 京都

G. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：誘導多能性幹細胞の製造方法
出願人：国立大学法人大阪大学：
K20090215(平成21年10月20日)

出願日：平成 22 年 2 月 18 日

出願番号：特願 2010-34008

届出日：平成 21 年 10 月 14 日

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。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山田泰広・山中伸弥	iPS細胞のエピゲノム	児玉龍彦	エピゲノム研究最前線	医歯薬出版株式会社	東京	2011	75-80

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
Tomimaru Y, et.al	Fresh frozen plasma transfusion does not affect outcomes following hepatic resection for hepatocellular carcinoma.	<i>Gastroenterology</i>	16(44)	5603-5610	2010
Miyoshi N, et.al	Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs.	<i>Cell Stem Cell</i>	8(6)	633-638	2011
Dyah Laksmi Dewi, et.al	Cancer stem cell theory in gastrointestinal malignancies: recent progress and challenges.	<i>J Gastroenterol</i>	24(10)	1145-1157	2011
Hirose H, et.al	The Significance of PITX2 Overexpression in Colorectal Cancer.	<i>Surg Oncol</i>	18(10)	3005-3012	2011
Dyah LD, et.al	Reprogramming of gastrointestinal cancer.	<i>Cancer Sci</i>	in press	in press	2011
Kim HM, et.al	Increased CD13 Expression Reduces Reactive Oxygen Species, Promoting Survival of Liver Cancer Stem Cells via an Epithelial-Mesenchymal Transition-like Phenomenon.	<i>Ann Surg Oncol</i>	in press	in press	2011

Ohkuma M, et.al	Absence of CD71 Transferrin Receptor Characterizes Human Gastric Adenosquamous Carcinoma Stem Cells.	<i>Ann Surg Oncol</i>	in press	in press	2011
Tanemura K, et.al	Rapamycin Causes Upregulation of Autophagy and Impairs Islets Function Both In Vitro and In Vivo.	<i>Am J Transplant</i>	12(1)	102-104	2012
Hoshino H, et.al	Hypoxia and TP53 Deficiency for induced pluripotent stem cell-like properties in gastrointestinal cancer.	<i>Int J Oncol</i>	in press	in press	2012
T. Suma, et.al	Enhanced stability and gene silencing ability of siRNA-loaded polyion complexes formulated from polyaspartamide derivatives with a repetitive array of amino groups in the side chain.	<i>Biomaterials</i>	33 (9)	2770-2779	2012
H. -J. Kim, et.al	PEG-detachable cationic polyaspartamide derivatives bearing stearyl moieties for systemic siRNA delivery toward subcutaneous BxPC3 pancreatic tumor.	<i>J. Drug Target.</i>	20 (1)	33-42	2011
H. Cabral, et.al	Accumulation of sub-100nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size.	<i>Nat. Nanotech.</i>	6 (12)	815-823	2011
R. J. Christie, et.al	Effect of polymer structure on micelles formed between siRNA and cationic block copolymer Comprising thiols and amidines.	<i>Biomacromolecules</i>	12 (9)	3174-3185	2011

F. Pittella, et.al	Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity.	<i>Biomaterials</i>	32 (11)	3106-3114	2011
M. Murakami, et.al	Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting.	<i>Sci. Transl. Med.</i>	3 (64)	64ra2	2011
Yamazaki Y, et.al	Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche.	<i>Cell</i>	147	1146-1158	2011
Hamanaka S, et.al	Generation of Germline-Competent Rat Induced Pluripotent Stem Cells.	<i>PLoS ONE</i>	6	7	2011
Nishimura K, et.al	Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming.	<i>Journal of Biological Chemistry</i>	286	4760-4771	2011
Suzuki N, et.al	Homeostasis of hematopoietic stem cells regulated by the myeloproliferative disease associated-gene product Lnk/Sh2b3 via Bcl-xL.	<i>Exp Hematol</i>	40	166-174	2011
Umemoto T, et.al	Integrin $\alpha v \beta 3$ regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells.	<i>Blood</i>	Epub ahead of print	Epub ahead of print	2011
Nishino T, et.al	Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by garcinol, a potent inhibitor of histone acetyltransferase.	<i>PLoS One</i>	6	9	2011

Ishihara M, et.al	Plasmin inhibitor reduces T-cell lymphoid tumor growth by suppressing matrix metalloproteinase-9-dependent CD11b(+)/F4/80(+) myeloid cell recruitment.	<i>Leukemia</i>	26	332-339	2011
Yoshida K, et.al	Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia.	<i>Nature</i>	478	64-69	2011
Yokoi T, et.al	Minimum requirement of donor cells to reduce the glycolipid storage following bone marrow transplantation in a murine model of Fabry disease.	<i>J Gene Med</i>	13	262-268	2011
Morita Y, et.al	Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen.	<i>Exp Hematol</i>	39	351-359	2011
Arima Y, et.al	Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-negative breast cancer.	<i>International Journal of Cancer</i>	in press	in press	2012
Shimizu T, et.al	Fibroblast growth factor-2 (Fgf2) is an important factor that maintains cellular immaturity and contributes to aggressiveness of osteosarcoma.	<i>Molecular Cancer Research</i>	in press	in press	2012
Tamada M, et.al	Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells.	<i>Cancer Research</i>	in press	in press	2012

Kosaka N, et.al	Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs.	<i>J. Biol. Chem.</i>	287	1397-1405	2012
Yamamoto Y, et.al	An integrative genomic analysis revealed the relevance of microRNA and gene expression for drug-resistance in human breast cancer cells.	<i>Mol Cancer</i>	10	135	2011
Kawamata M, et.al	Gene-manipulated embryonic stem cells for rat transgenesis.	<i>Cell Mol Life Sci.</i>	68	1911-1915	2011
Osaki M, et.al	MicroRNA-143 Regulates Human Osteosarcoma Metastasis by Regulating Matrix Metalloprotease-13 Expression.	<i>Mol Ther</i>	19	1123-1130	2011
Aoki H, et.al	Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis.	<i>Development</i>	139(4)	667-77	2012
Hatano Y, et.al	Genetic ablation of a candidate tumor suppressor gene, Rest, does not promote mouse colon carcinogenesis.	<i>Cancer Sci</i>	102	1659-1664	2011
Pandian GN, et.al	Synthetic small molecules for epigenetic activation of pluripotency genes in mouse embryonic fibroblasts.	<i>Chembiochem</i>	12(18)	2822-8	2011

山田泰広	癌幹細胞のエピジェネティック制御	医薬ジャーナル	47(11)	2702-2705	2011
Moriwaki K, et.al	Combination use of anti-CD133 antibody and SSA lectin can effectively enrich cells with high tumorigenicity.	<i>Cancer Sci</i>	102(6)	1164-1170	2011
Nishida N, et.al	MicroRNA-125a-5p is an independent prognostic factor in gastric cancer, and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in combination with trastuzumab.	<i>Clin Cancer Res</i>	17(9)	2725-2733	2011
Ohkuma M, et.al	Absence of CD71 transferrin receptor characterizes human gastric adenocarcinoma stem cells.	<i>Ann Surg Oncol</i>	in press	in press	2011
Hirose H, et.al	The significance of PLTX2 overexpression in human colorectal cancer.	<i>Ann Surg Oncol</i>	18(10)	3005-3012	2011
Kita Y, et.al	STC2: A Predictive Marker for Lymph Node Metastasis in Esophageal Squamous-Cell Carcinoma.	<i>Ann Surg Oncol</i>	18(1)	261-272	2011
Takahashi H, et.al	Significance of Lgr5 (+ve) Cancer Stem Cells in the Colon and Rectum.	<i>Ann Surg Oncol</i>	18(4)	1166-1174	2011

Fresh frozen plasma transfusion does not affect outcomes following hepatic resection for hepatocellular carcinoma

Yoshito Tomimaru, Hiroshi Wada, Shigeru Marubashi, Shogo Kobayashi, Hidetoshi Eguchi, Yutaka Takeda, Masahiro Tanemura, Takehiro Noda, Koji Umeshita, Yuichiro Doki, Masaki Mori, Hiroaki Nagano

Yoshito Tomimaru, Hiroshi Wada, Shigeru Marubashi, Shogo Kobayashi, Hidetoshi Eguchi, Yutaka Takeda, Masahiro Tanemura, Takehiro Noda, Yuichiro Doki, Masaki Mori, Hiroaki Nagano, Department of Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, 565-0871, Osaka, Japan
Koji Umeshita, Division of Health Sciences, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, 565-0871, Osaka, Japan

Author contributions: Tomimaru Y was responsible for the review of the literature and initial preparation of the paper; Wada H, Marubashi S, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Noda T and Umeshita K contributed to the data collection; Doki Y, Mori M and Nagano H prepared the final version of the manuscript.

Correspondence to: Hiroaki Nagano, MD, PhD, Department of Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka E-2, Suita, 565-0871, Osaka, Japan. hnagano@gesurg.med.osaka-u.ac.jp

Telephone: +81-6-68793251 Fax: +81-6-68793259

Received: May 7, 2010 Revised: June 28, 2010

Accepted: July 5, 2010

Published online: November 28, 2010

≥ 2000 mL (Group B1 ≥ 2000 mL and Group B2 ≥ 2000 mL), postoperative complications, liver function tests, and cancer prognosis were compared.

RESULTS: No mortality was registered in Group B, compared to 8 patients (3.9%) of Group A. The incidence of morbidity in Group B2 [23.2% (64/275)] was not significantly different from Group B1 [40.9% (9/22)] and Group A [27.0% (55/204)]. The incidence of complications and postoperative liver function tests were comparable between Group B1 ≥ 2000 mL vs Group B2 ≥ 2000 mL. Postoperative prognosis did not correlate with administration of FFP, but with tumor-related factors.

CONCLUSION: The outcome of hepatectomy for HCC is not influenced by FFP transfusion. We suggest FFP transfusion be abandoned in patients who undergo hepatectomy for HCC.

© 2010 Baishideng. All rights reserved.

Key words: Fresh frozen plasma; Hepatocellular carcinoma; Surgery; Transfusion

Peer reviewers: Itaru Endo, MD, PhD, Professor and Chairman, Department of Gastroenterological Surgery, Yokohama City University, Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, 2360004, Japan; Ingmar Königsrainer, MD, Department of General, Visceral and Transplant Surgery, Hoppe Seyler Str. 3, 72076 Tübingen, Germany; Dr. Selin Kapan, Associate Professor of General Surgery, Dr. Sadi Konuk Training and Research Hospital, Department of General Surgery, Kucukcekmece, Istanbul 34150, Turkey

Tomimaru Y, Wada H, Marubashi S, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Noda T, Umeshita K, Doki Y, Mori M, Nagano H. Fresh frozen plasma transfusion does not affect outcomes following hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16(44): 5603-5610 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i44/5603.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v16.i44.5603>

Abstract

AIM: To investigate whether fresh frozen plasma (FFP) transfusion affects outcomes following hepatic resection for hepatocellular carcinoma (HCC) in terms of liver function, postoperative complications and cancer prognosis.

METHODS: We retrospectively compared the incidence of postoperative complications between 204 patients who underwent hepatectomy for HCC with routine FFP transfusion in an early period (1983-1993, Group A) and 293 with necessity for FFP transfusion during a later period (1998-2006, Group B), and also between two subgroups of Group B [22 patients with FFP transfusion (Group B1) and 275 patients without FFP transfusion (Group B2)]. Additionally, only in limited patients in Group B1 and Group B2 with intraoperative blood loss

INTRODUCTION

Surgical resection is the established optimal treatment for hepatocellular carcinoma (HCC) associated with hepatitis B virus or hepatitis C virus infection. Since HCC usually develops in patients with liver cirrhosis, most such patients present with bleeding tendencies based on chronic liver dysfunction^[1,2]. Accordingly, bleeding is a major problem in liver surgery for HCC, and it also affects postoperative mortality and morbidity^[3-5].

Fresh frozen plasma (FFP) is human donor plasma, and contains near normal levels of many plasma proteins, including procoagulants and inhibitory components of the coagulation cascades, acute phase proteins, immunoglobulins and albumin. The clinical use of FFP has increased steadily over the last two decades in many countries^[6-8]. Furthermore, in the surgical treatment of HCC, FFP has been frequently administered to supply coagulation factors, maintain serum albumin level and circulating blood volume, and prevent postoperative hepatic failure^[9-12]. On the other hand, FFP transfusion is reported to induce adverse effects in some patients: transmission of infection, allergic reactions, hemolysis, anaphylaxis, and transfusion-related acute lung injury (TRALI)^[13-15]. Moreover, some studies have reported a relationship between perioperative transfusion and postoperative HCC recurrence^[16,17]. In addition to these adverse effects, the amount of FFP is limited because of its source from human donation. Therefore, appropriate use of FFP is needed in terms of application and volume, as stated in the guidelines of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare^[18]. Regarding surgery for HCC, recent advances in both surgical and anesthetic techniques that have led to a reduction in intraoperative blood loss, have resulted indirectly in a gradual decrease in the need for FFP perioperatively^[19,20]. Considering the reduction in intraoperative blood loss and the aforementioned potential adverse effects of FFP transfusion, we believe there is no need for FFP in surgery for HCC. In order to discuss this need, we first should investigate whether FFP transfusion affects outcomes following hepatic resection for HCC.

In this study, we retrospectively investigate whether FFP transfusion affects outcomes following hepatic resection for HCC in terms of liver function, postoperative complications and cancer prognosis.

MATERIALS AND METHODS

Trends in transfusion

Until 1993, FFP was routinely administered to patients after hepatectomy for HCC at the Department of Surgery, Osaka University Hospital. In 1994, HCC patients began to donate their blood preoperatively for autologous blood transfusion during or after surgery. Between 1994 and 1997, the use of autologous blood transfusion and FFP transfusion was determined by the surgeon. However, in 1998, the use of autologous blood transfusion was implemented in our institution to cover all HCC

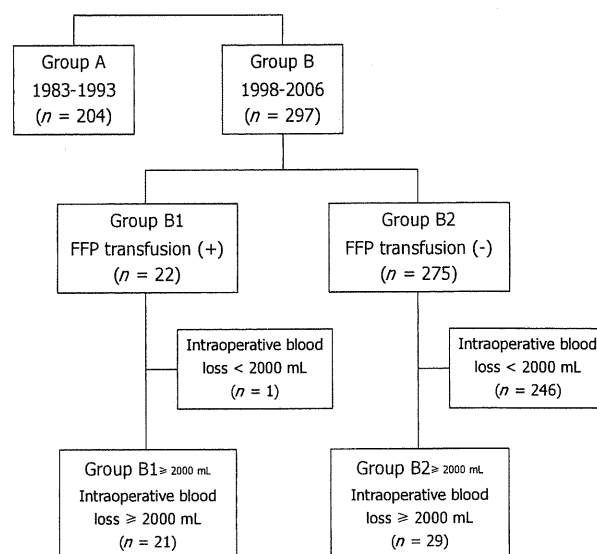


Figure 1 Distribution of the enrolled patients according to the clinical background of hepatectomy for hepatocellular carcinoma. FFP: Fresh frozen plasma.

patients with hemoglobin of ≥ 11.0 g/dL. FFP was administered only to patients with extensive bleeding intraoperatively and low levels of coagulation factors. After the publication of Guidelines by the Japanese Ministry of Health and Welfare, we adhered to these guidelines in the use of FFP^[18].

Patients

Between 1998 and 2006, 297 patients underwent curative hepatic resection for HCC in our institution. In this study, we retrospectively compared the incidence of postoperative complications and postoperative cancer prognosis in the 297 patients with those of 204 patients with HCC who underwent curative hepatic resection with the routine use of FFP between 1983 and 1993. These 204 patients and 297 patients were categorized into Group A and Group B, respectively. The 297 patients of Group B were also divided into two groups depending on their history regarding perioperative FFP transfusion: 22 patients (7.4%) with FFP transfusion (Group B1) and 275 patients (92.6%) without FFP transfusion (Group B2). The distribution of patients enrolled in this study is illustrated accordingly in Figure 1. In patients of Group B1, FFP transfusion was performed either during the surgery or within 3 d after surgery. The median number of total units of transfused FFP was 10 (range, 4-40). In these groups, the need and validity of routine FFP transfusion were retrospectively evaluated based on the following postoperative complications and cancer prognosis.

Surgery and postoperative complications

In our institution, indication for hepatectomy for HCC is based on the value of indocyanine green retention rate at 15 min, and five factors included in the Child-Pugh classification: albumin, prothrombin time (PT), total bilirubin

Table 1 Comparison of perioperative characteristics between Group A (1983-1993) and Group B (1998-2006), and between Group B1 and Group B2. *n* (%)

	Group A (1983-1993) (<i>n</i> = 204)	Group B (1998-2006) (<i>n</i> = 297)	<i>P</i> -value	Group B		<i>P</i> -value
				Group B1 (<i>n</i> = 22)	Group B2 (<i>n</i> = 275)	
Age (yr)						
< 60	114 (55.9)	207 (69.7)	0.0015	9 (40.9)	81 (29.5)	NS
≥ 60	90 (44.1)	90 (30.3)		13 (59.1)	194 (70.5)	
Gender						
Male	178 (87.3)	235 (79.1)	0.0188	20 (90.9)	215 (78.2)	NS
Female	26 (12.7)	62 (20.9)		2 (9.1)	60 (21.8)	
Child-Pugh						
A	187 (91.7)	251 (84.5)	0.0176	17 (77.3)	234 (85.1)	NS
B	17 (8.3)	46 (15.5)		5 (22.7)	41 (14.9)	
Viral infection						
HBV (+)	40/201 (19.9)	56 (18.9)	NS	4 (18.2)	52 (18.9)	NS
HCV (+)	47/78 (60.3)	177 (59.6)	NS	11 (40.9)	166 (61.1)	NS
Surgical procedure						
≤ Hr1	171 (83.8)	241 (81.1)	NS	14 (63.6)	227 (82.5)	0.0436
≥ Hr2	33 (16.2)	56 (18.9)		8 (36.4)	48 (17.5)	
Intraoperative blood loss (mL)						
< 2000	133 (65.2)	247 (83.2)	< 0.0001	1 (4.5)	246 (89.5)	< 0.0001
≥ 2000	71 (34.8)	50 (16.8)		21 (95.5)	29 (10.5)	
Use of FFP						
(-)	0 (0)	275 (92.6)	< 0.0001			
(+)	204 (100.0)	22 (7.4)				
Mortality	8 (3.9)	0 (0)	0.0007	0 (0)	0 (0)	--
Morbidity	55 (27.0)	73 (24.6)	NS	9 (40.9)	64 (23.2)	NS

HBV: Hepatitis B virus; HCV: Hepatitis C virus; ≤ Hr1: Partial resection, subsegmentectomy, and segmentectomy of the liver; ≥ Hr2: Bisegmentectomy or more; FFP: Fresh frozen plasma; NS: Not significant.

(T-Bil), presence of ascites, and presence of encephalopathy. The selected surgical procedure was based on tumor location and predicted residual liver function, according to the classification system of the Liver Cancer Study Group of Japan^[21]. The indication for surgery and selection of surgical procedure were not different between Group A and Group B. Death within 30 d after surgery was considered operative mortality. Morbidities were represented by the following complications that required additional treatment: cardiopulmonary complications, hepatic failure, bleeding, bile leakage, ascites and/or pleural effusion, ileus, and wound infection. PT and T-Bil [preoperative, postoperative day (POD) 1, 3, 5, 7] were used as representative markers of postoperative liver function.

Statistical analysis and ethical considerations

Differences between groups were assessed by the χ^2 test, Fisher's exact test or the Mann-Whitney *U* test. Survival rates were calculated according to the Kaplan and Meier method and compared using the log-rank test. Statistical analysis was performed using StatView (version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC). A *P* value < 0.05 was considered statistically significant. The study was approved by the Human Ethics Review Committee of Osaka University Hospital and a signed consent form was obtained from each patient.

RESULTS

Table 1 lists the differences in perioperative characteristics

between Group A and Group B. Patients classified as Child-Pugh A were significantly more common among Group A than Group B (*P* = 0.0176). Intraoperative blood loss in Group A was significantly greater than in Group B (*P* < 0.0001). While the postoperative mortality was 3.9% (8/204) in Group A, no mortality was recorded in Group B (*P* = 0.0007). The incidence of postoperative complications was 27.0% (55/204) in Group A and 24.6% (73/297) in Group B, and the incidence did not significantly differ between the two groups.

Various perioperative parameters were compared between Group B1 and Group B2 (Table 1). The preoperative factors were similar in the two groups. The incidence of hepatectomy equal to or more than Hr 2 was significantly higher in Group B1 than in Group B2 (*P* = 0.0436), and a significantly greater intraoperative blood loss was recorded in Group B1 than in Group B2 (*P* < 0.0001). There was no operative mortality in either of the two groups. The incidence of postoperative complications was 40.9% (9/22) in Group B1 and 23.2% (64/275) in Group B2, and the incidence did not significantly differ between the two groups. No adverse events related to FFP transfusion were found in Group B1. Postoperative complications and liver function were compared between Group B1 and Group B2 only in patients with intraoperative blood loss of ≥ 2000 mL (Group B1 ≥ 2000 mL: *n* = 21, Group B2 ≥ 2000 mL: *n* = 29). Comparison of clinical features of patients in these two groups is summarized in Table 2. There were no significant differences in the preoperative factors. Intraoperative blood loss and the frequency of administra-

Table 2 Comparison of perioperative characteristics between Group B1 ≥ 2000 mL and Group B2 ≥ 2000 mL. *n* (%)

	Group B1 ≥ 2000 mL (<i>n</i> = 21)	Group B2 ≥ 2000 mL (<i>n</i> = 29)	<i>P</i> -value
Age (yr)			
< 60	9 (42.9)	11 (37.9)	NS
≥ 60	12 (57.1)	18 (62.1)	
Gender			
Male	20 (95.2)	23 (79.3)	NS
Female	1 (4.8)	6 (20.7)	
Child-Pugh			
A	17 (81.0)	21 (72.4)	NS
B	4 (19.0)	8 (27.6)	
Viral infection			
HBV (+)	5 (23.8)	3 (10.3)	NS
HCV (+)	9 (42.9)	19 (65.5)	NS
Maximum size of tumor(s) (cm)	8.3 \pm 6.3	6.9 \pm 4.6	NS
Intrahepatic metastasis			
(-)	9 (26.8)	17 (58.6)	NS
(+)	12 (63.2)	12 (41.4)	
Vascular involvement			
(-)	8 (38.1)	17 (58.6)	NS
(+)	13 (61.9)	12 (41.4)	
Operative time (min)	426 \pm 154	391 \pm 130	NS
Intraoperative blood loss (mL)	5364 \pm 1651	2854 \pm 1056	< 0.0001
Use of RCC			
(-)	3 (14.3)	19 (65.5)	0.0004
(+)	18 (85.7)	10 (34.5)	
Surgical procedure			
\leq Hr1	14 (66.7)	17 (58.6)	NS
\geq Hr2	7 (33.3)	12 (41.4)	

HBV: Hepatitis B virus; HCV: Hepatitis C virus; \leq Hr1: Partial resection, subsegmentectomy, and segmentectomy of the liver; \geq Hr2: Bisegmentectomy or more; RCC: Red cell concentrate; NS: Not significant.

Table 3 Comparison of postoperative complications between Group B1 ≥ 2000 mL and Group B2 ≥ 2000 mL. *n* (%)

	Group B1 ≥ 2000 mL (<i>n</i> = 21)	Group B2 ≥ 2000 mL (<i>n</i> = 29)	<i>P</i> -value
Mortality	0 (0)	0 (0)	--
Morbidity	9 (42.9)	9 (31.0)	NS
Cardiopulmonary	2 (9.5)	0 (0)	
Renal dysfunction	0 (0)	0 (0)	
Hepatic failure	0 (0)	0 (0)	
Bleeding	1 (4.8)	1 (3.4)	
Bile leakage	1 (4.8)	2 (6.9)	
Ascites and/or pleural effusion	0 (0)	3 (10.3)	
Ileus	2 (9.5)	0 (0)	
Wound infection	3 (14.3)	3 (10.3)	

NS: Not significant.

tion of red cell concentrates (RCC) in Group B1 ≥ 2000 mL were significantly more than those in Group B2 ≥ 2000 mL ($P < 0.0001$ and $P = 0.0004$, respectively). Operative mortality was not encountered in the two groups. The incidence of postoperative complications was 42.9% (9/21) in Group B1 ≥ 2000 mL and 31.0% (9/29) in Group B2 ≥ 2000 mL. Table 3 lists the types of complications. Neither postop-

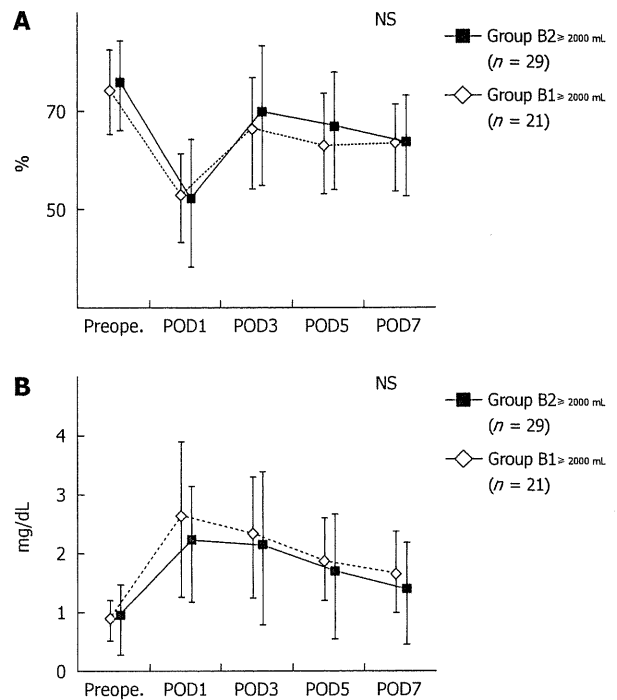


Figure 2 Perioperative changes in (A) serum prothrombin time, and (B) total bilirubin levels in Group B1 ≥ 2000 mL and Group B2 ≥ 2000 mL. NS: Not significant; Preope.: Preoperative; POD: Postoperative day.

erative hepatic failure nor postoperative bleeding occurred in the two groups.

Figure 2 demonstrates the perioperative changes in PT and T-Bil in patients with intraoperative blood loss of ≥ 2000 mL. The levels of PT and T-Bil were not significantly different between the two groups, irrespective of the POD.

Long-term postoperative outcomes, including disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) after hepatic resection, were also examined in patients with intraoperative blood loss of ≥ 2000 mL (Table 4). Vascular invasion (absent/present), FFP transfusion (transfused/non-transfused), tumor size (< 5 cm/ ≥ 5 cm), RCC transfusion (transfused/non-transfused) were significant factors in univariate analysis of DFS among the clinicopathological factors tested ($P = 0.0101, 0.0276, 0.0288, \text{ and } 0.0343$, respectively). Multivariate analysis for DFS using the four factors identified vascular invasion as the only significant independent factor ($P = 0.0299$). The DFS in Group B2 ≥ 2000 mL was significantly better than in Group B1 ≥ 2000 mL ($P = 0.0276$), though the factor was not significant on multivariate analysis (Figure 3A). Next, univariate analysis for OS using various clinicopathological factors demonstrated that vascular invasion (absent/present) and number of nodules (single/multiple) were significant factors ($P = 0.0024$ and $P = 0.0150$, respectively). Multivariate analysis for OS using the two factors, identified vascular invasion as the only significant independent factor ($P = 0.0185$). There was no significant difference in OS between Group B2 ≥ 2000 mL and Group B1 ≥ 2000 mL ($P = \text{not significant}$) (Figure 3B).

Table 4 Multivariate analysis of disease-free survival and overall survival after hepatectomy for hepatocellular carcinoma in patients with intraoperative blood loss of ≥ 2000 mL

	n	DFS			OS		
		OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
Maximum size of tumor (cm)		1.553	0.755-3.191	NS			
≤ 5	16						
> 5	31						
Tumor number					2.280	0.874-5.591	NS
Single	24						
Multiple	26						
Vascular invasion		2.445	1.091-5.464	0.0299	3.203	1.216-8.439	0.0185
(-)	25						
(+)	25						
RCC transfusion		1.695	0.674-4.261	NS			
(-)	22						
(+)	28						
FFP transfusion		1.340	0.512-3.005	NS			
(-)	29						
(+)	21						

DFS: Disease-free survival; OS: Overall survival; OR: Odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval; RCC: Red cell concentrate; FFP: Fresh frozen plasma; NS: Not significant.

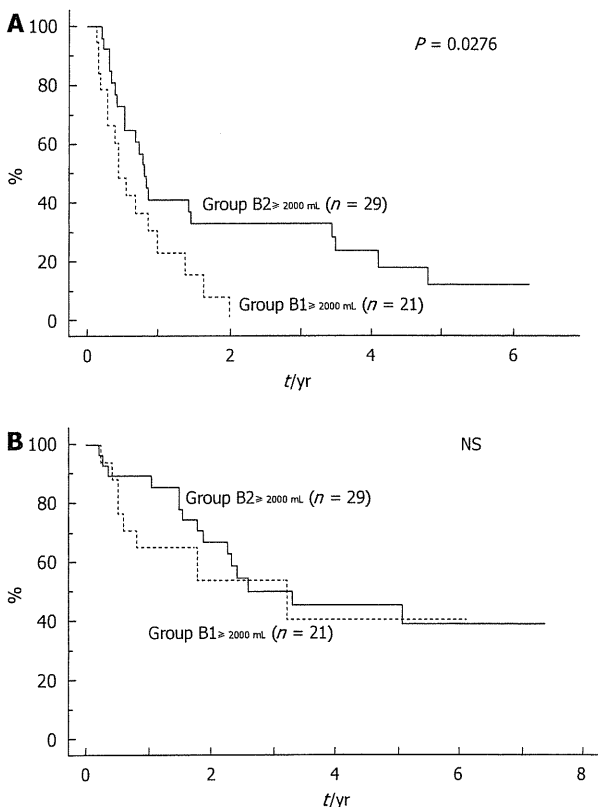


Figure 3 Disease-free survival (A) and overall survival (B) in Group B1 ≥ 2000 mL and Group B2 ≥ 2000 mL. NS: Not significant.

DISCUSSION

The present study was designed to investigate whether the outcomes of hepatectomy for HCC are influenced by FFP transfusion. Firstly, we compared the incidence of mortality and morbidity between Group A and Group

B, indicating no significant difference in the incidence between the two groups. However, the comparison is considered to be difficult because of differences in the background of each period such as surgical and anesthetic techniques. For example, there were significant differences in liver function evaluated by Child-Pugh classification, and in intraoperative blood loss, between the two groups. Therefore, for more justified analysis, we next compared the outcomes between Group B1 and Group B2. The result showed the incidence of mortality and morbidity to be comparable between Group B1 and Group B2. However, since there were significant differences in the surgical procedure and intraoperative blood loss between the two groups, we also compared the postoperative complications between Group B1 ≥ 2000 mL vs Group B2 ≥ 2000 mL. The results showed equal rates of postoperative complications in the two groups. In particular, hepatic failure (prevention of which is one of the purposes of FFP administration) was not identified in the two groups. Postoperative residual liver function, represented by PT and T-Bil, was also equal in the two groups. Furthermore, the incidences of postoperative mortality and morbidity in Group B1 and Group B2 were similar to those reported in other studies^[5,22-24]. For example, Imamura *et al*^[5] reported the surgical result of 1056 hepatic resections including 532 HCC cases, with incidences of postoperative mortality and morbidity of 0% and 39.0%, respectively. However, they did not report the number of patients who received FFP. FFP was reported to be administered at a rate that exceeded the amount of blood loss by 10% to 20% during surgery; it substituted the amount of protein lost so as to maintain serum total protein level at 6.0 g/dL in that study. Based on our results and those of early studies, it cannot be concluded that FFP administration would contribute to the incidences of postoperative mortality and morbidity, including hepatic failure.