

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07892

研究課題名（和文）糖尿病を母体とする肝細胞癌発症機序の解明—VEGFを分子標的とした戦略

研究課題名（英文）Clarification of the mechanism on hepatocellular carcinoma in diabetes:
VEGF-targeted therapy strategy

研究代表者

中島 一壽 (NAKASHIMA, Kazuhisa)

鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員

研究者番号：30838610

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：初年度では糖尿病背景またはNASH背景の肝細胞癌患者の検体をそれぞれ収集した。肝癌切除組織の免疫系細胞浸潤を免疫組織染色したところ、興味深い知見を得ることができた。この知見をもとに炎症関連分子について、組織染色による解析を行った。また初年度は脂肪細胞の培養について予備実験を行った。次年度は肝細胞癌患者の血液検体を用いて各血液成分中のVEGFアイソフォーム分画の測定、エクソソーム内包マイクロRNAの測定をすることで、抗がん剤による各種治療がVEGFおよびマイクロRNAに与える影響に関して検証する計画を立てた。VEGFやマイクロRNAが血管新生に与える分子生物学的機序の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

背景が非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）ではない糖尿病のみの患者からの肝細胞癌を我々が臨床病理をとおして12例経験したことがきっかけで研究がスタートした。近年増加傾向にある非B非C肝細胞癌における糖尿病のリスク因子を解明し、肝細胞癌で苦しむ患者とその家族に貢献したいと考えた。研究代表者の知見では、NASH例と非NASH例において血小板数に有意差を認めたことから、血小板内の因子がNASHからの肝細胞癌の発症に関与しているという仮説を立てた。血小板内には、癌の進展に関与する多くの増殖因子が含まれるが、その中でも血管内皮成長因子（VEGF）からのアプローチを選択したことが特徴的である。

研究成果の概要（英文）：In the first year, specimens of hepatocellular carcinoma patients with diabetic background or NASH background were collected respectively. Immunohistochemical staining of immune system cell infiltration in liver cancer resected tissue yielded interesting findings. Based on this finding, inflammation-related molecules were analyzed by tissue staining. At the same time, we conducted a preliminary experiment on adipocyte culture. The following year, we measured the VEGF isoform fraction in the blood of patients with hepatocellular carcinoma and measured exosome-encapsulating microRNA. We planned to examine the effects of various anticancer drug treatments on VEGF and microRNA, and analyzed the molecular biological mechanism of VEGF and microRNA on angiogenesis.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：肝細胞癌 2型糖尿病 NASH VEGF VEGF-A HMGB-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は 2013 年 5 月から 5 年余り専ら肝臓内科医として公益社団法人鹿児島共済会南風病院で臨床に携わってきた。その後、鹿児島大学医歯学総合研究科に進学後も肝臓内科医として臨床経験を積み、日本消化器病学会消化器病専門医および日本肝臓学会認定肝臓専門医として日々の診療を行っている。肝細胞癌は自覚症状に乏しいことから進行した状態で発見されることもあり、予後不良の癌腫の一つである。早期診断マーカーの確立ならびに高頻度に再発を認めることから再発予測因子としてのバイオマーカーの確立が求められている。進行肝細胞癌に対しては、外科手術のみならず、ラジオ波焼灼術や肝動脈化学塞栓術、化学療法を組み合わせた集学的治療法が検証され、エビデンスが証明されつつあるが、各治療法が病態に与える影響に関しては未解明のままである。

2. 研究の目的

背景が非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) ではない糖尿病のみの患者からの肝細胞癌を、臨床病理をとおして経験した(アルコールが原因と考えられた症例を除く)。この経験が研究をスタートさせたきっかけである。肝細胞癌で苦しむ患者とその家族に貢献したいと考え、近年増加傾向にある非 B 非 C 肝細胞癌における糖尿病のリスク因子を解明することを目的とした。また肝細胞癌に対して抗がん剤治療を受けた患者の血液および尿中の VEGF-A、マイクロ RNA を測定して、各治療法が病態に与える影響と VEGF-A、マイクロ RNA の関連を解析し、肝細胞癌に対する抗がん剤治療の更なる病態解明に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

2002 年 5 月～2016 年 7 月まで初回治療にて肝切除を行った非アルコール性糖尿病背景肝細胞癌患者(D 群)14 例と非アルコール性糖尿病非合併肝炎ウイルス背景肝細胞癌患者(V 群)48 例の全 62 例を対象とし、それぞれの臨床背景、病理組織、初回再発期間、予後について検討した。統計解析は Fisher の直接確率計算法、生存率・無再発率の解析には Kaplan-Meier 法を用いて検討した。研究を始めるにあたり公益社団法人鹿児島共済会南風病院の倫理委員会での承認を得た。

また、入院および外来を含む 20 歳以上の全ステージの肝細胞癌患者であって、南風病院を受診され本研究に同意を得られた方々を対象とし、血液および尿における VEGF-A、血管関連マイクロ RNA を主要評価項目とした研究を行った。VEGF 研究に用いる検体は血液および尿、外科手術で摘出した組織で、血液は南風病院受診時において通常の採血方法にて得られた血液検体を解析した。摘出組織は南風病院消化器外科にて肝細胞癌手術時に得られた検体を用いた。2020 年 10 月 9 日～2023 年 12 月 31 日までを収集期間とした。VEGF-A は ELISA 法を用いて解析し、マイクロ RNA は定量的 PCR 法を用いて解析した。研究を始めるにあたり鹿児島大学医歯学総合研究科および公益社団法人鹿児島共済会南風病院の倫理委員会での承認を得た。

4. 研究成果

研究代表者の知見では、NASH 例と非 NASH 例において血小板数に有意差を認めた(次ページ右上図)。そこで、血小板内の因子が NASH からの肝細胞癌の発症に関与しているという仮説を立てた。癌腫瘍細胞は自身が増殖、浸潤、転移するために病的な血管新生を生じている。血小板内には、癌の進展に関与する多くの増殖因子が含まれるが、我々の研究室では病的な血管新生を生じる因子として、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に注目して他癌腫を含めて研究してきた。

糖尿病背景または NASH 背景の肝細胞癌患者の検体をそれぞれ収集し、その中で数例の検体について病理像の検討を行った。肝癌切除組織の免疫系細胞浸潤を免疫組織染色したところ、興味深い知見を得ることができた。1 症例の肝組織像を右中図に示す。非 NASH にも関わらず、小葉内に炎症所見を認め、中心静脈周囲の線維化を伴っていた。この知見をもとに炎症関連分子について、組織染色、ウエスタンブロットなどによる解析を行ったが、予備実験の段階であり、今後も症例数を増やして一定の結果を得るように検討を継続する。

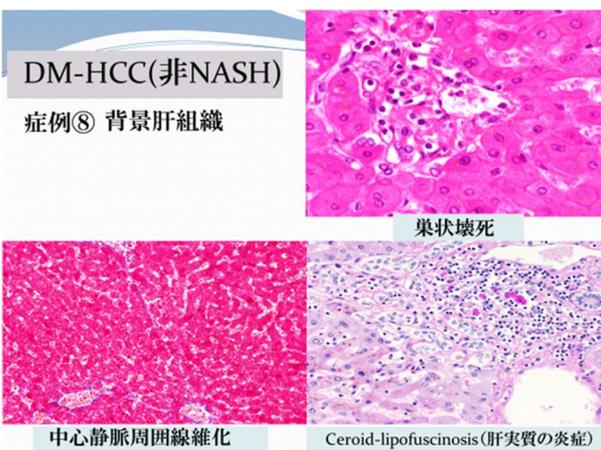
その他計 14 例について、糖尿病背景とした肝細胞癌の病理組織像のまとめが右下図である。計 5 例において、非 NASH にもかかわらず、糖尿病合併の肝細胞癌患者の背景肝組織からは巣状壊死や中心静脈周囲の線維化、肝実質の炎症といった病理所見を得ることができた。

肝細胞癌患者の血液検体を用いた各血液成分中の VEGF アイソフォーム分画の測定、エクソソーム内包マイクロ RNA の測定をすることで、抗がん剤による各種治療が VEGF およびマイクロ RNA に与える影響に関して検証する計画を立てた。検体の採取を行っているが、検体採取とその検体測定について、新型コロナウイルス感染症の影響で研究に遅延をきたし計画通りに進まず、最終年度までに一定の結果を得ることは出来なかった。しかしながら、今後も検討を継続して、論文や学会発表などで随時、成果報告を行っていく予定である。

参考文献

- 1.Hiraoka A et al. Therapeutic potential of lenvatinib for unresectable hepatocellular carcinoma in clinical practice: multicenter analysis. Hepatol Res. 2018.
- 2.Tsuchiya A et al.Changes in Plasma Vascular Endothelial Growth Factor at 8 Weeks After Sorafenib Administration as Predictors of Survival for Advanced Hepatocellular Carcinoma. Cancer 2014.
- 3.Horwitz A et al. Human and Mouse VEGFA-Amplified Hepatocellular Carcinomas Are Highly Sensitive to Sorafenib Treatment. Cancer Discovery 2014.

	NASH (n=8)	非NASH (n=5)	p-value
年齢	72.1±4.8	72.0±6.9	0.970
BMI	25.9±1.8	22.2±4.0	0.039
ALT	38.9±13.9	23.8±12.7	0.076
HbA1c(NGSP)	7.3±0.8	7.0±1.1	0.552
Plt	15.1±4.4	22.1±6.8	0.043
FiB4 index	3.20±1.27	2.05±0.60	0.087
平均腫瘍径	5.3±3.4	5.4±3.8	0.982



症例	年齢	性別	組織	脂肪化	ballooning	小葉内炎症	NAS score	NAS staging
①	76	F	NASH	3	2	3	8	2
②	79	M	○	1	0	1	2	1
③	73	F	NASH	3	2	2	7	3
④	75	F	NASH	2	2	2	6	2
⑤	73	F	NASH	2	2	1	5	2
⑥	73	M	○	0	0	1	1	1
⑦	69	M	NASH	2	2	1	5	1
⑧	63	M	○	0	0	1	1	-
⑨	78	M	○	0	0	1	1	-
⑩	72	M	NASH	3	2	2	7	1
⑪	77	M	BorderlineNASH	1	1	2	4	-
⑫	77	M	NASH	3	2	2	7	1
⑬	67	M	○	0	0	1	0	-
⑭	62	M	NASH	3	1	1	5	2

NASHに進行しなくても、糖尿病だけで肝細胞癌が発生している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島 一壽, 小森園 康二, 迫 勝巳, 柴藤 俊彦, 北園 正樹, 田中 貞夫, 東 貞行, 大山 陽子, 竹之内 和則, 山口 宗一, 橋口 照人
2. 発表標題 未破裂肝細胞癌に対しマイクロスフィア塞栓後(DEB-TACE後)に肝切除を行った症例の病理学的検討
3. 学会等名 日本臨床化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 宗一 (YAMAKUCHI Munekazu) (20325814)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	
研究分担者	大山 陽子 (OYAMA Yoko) (20583470)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員 (17701)	
研究分担者	竹之内 和則 (TAKENOUCHI Kazunori) (30646758)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	
研究分担者	橋口 照人 (HASHIGUCHI Teruto) (70250917)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------