

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860211

研究課題名(和文)プロテオーム解析による肝細胞がんの再発予測

研究課題名(英文)Prediction of HCC recurrence by proteome analyses

研究代表者

斉藤 雅也(Masaya, Saito)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00631558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞がんの外科的切除後の患者のうち、研究の同意が得られた患者についてのみ血清を提供していただいた。術後1年での再発の有無を腹部超音波検査ならびに腹部CTで評価した。そして、肝細胞がん切除後1年以内に再発した群と1年以上無再発であった群の両群間で比較検討し肝細胞がんの再発に関わる代謝産物のパターンを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The factor associated with the recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) was found between early recurrence group and late recurrence group.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は日本人の死亡原因の第1位であり、その中でも肝細胞がんは男性で第4位、女性では第7位を占める〔平成21年度〕。この原因としては、肝がんのリスクファクターである慢性肝炎の有病者が多いこと（慢性B型肝炎で120万人、慢性C型肝炎で200万人）未だ根治的な治療法が存在しないことが挙げられる（国民衛生の動向2011）。幼若期に感染したB型肝炎ウイルス、および、C型肝炎ウイルスは、いずれも肝細胞に慢性持続性感染を誘導し、慢性肝炎から徐々に肝硬変へと進展、さらに高率に肝細胞がんを誘発することが知られている。申請者は、肝細胞がんに対し、担がん患者の生存期間の延長、ならびに、QOLの向上を目標に診療を行ってきた。

いったん肝細胞がんが発生すると、外科的根治術がなされても、残肝再発は高頻度に出現する。肝細胞がんの術後5年生存率は全国集計で60%であり、肝切除後1年で約25%、2年で50%、5年では80%の症例で再発が起こることが報告されている。こうなると、残肝組織は正常肝組織とはいえず、すでに肝細胞がん再発の芽が存在するとも考えられる。現在、再発危険因子として、腫瘍最大径、個数、門脈腫瘍栓、術前AFP値、PIVKA-II値、肝内転移、肝硬変の有無などが報告されている。さらに申請者は、再発危険因子である術前PIVKA-II値が高値であればあるほど、予後が短いことを報告している(Saito M, et al. J Gastroenterol 2012; 47(10): 1134-1142)。また、肝細胞がん切除後1年以内に再発した症例では、1年以上無再発であった症例より予後が短いことが報告されている。

近年、肝細胞がんの再発抑制に関する内科的治療法が報告されている。肝細胞がん治療後に分岐鎖アミノ酸(BCAA)製剤を内服することにより、3回目以降の肝細胞がんの再発率

低下が得られることが明らかになってきている。また、申請者はBCAA製剤内服による肝代謝の改善が肝細胞がんの再発のみならず生命予後の延長にもつながることを報告している(Saito M, et al. PLoS One 2013; 8: e55441. doi: 10.1371/journal.pone.0055441. Epub 2013 Mar 8)。しかし、早期再発リスクが高いハイリスク症例に対し、より重点的に早期からの再発抑制治療を行えるようにするため、より詳細で高解像度な肝細胞癌再発の予測および予防法を開発する必要がある。

これまで、薬理遺伝学の研究分野においては、タンパク質解析によるゲノムの解析機能、診断や治療にSNPsなどの遺伝子多型や遺伝子の発現量をマーカーとして利用する研究が進められている。これらのことから、生命機能に関連したプロテオーム研究により、タンパク質の量的、質的変動に関する情報が得られ、相互に作用するタンパク質のリンケージ解析が行われ、その生理機能がより詳細に解明されるものと期待されている。肝細胞がんの背景肝である硬変肝では、肝機能悪化のキーとなるタンパク質の発現、ならびに、その活性変化により、代謝・分解された新たな代謝産物が生成される。このような具体的なタンパク質の機能解析に加えて、タンパク質以外の細胞内低分子の量的、質的な変動に対する代謝分子の総体の解析(プロテオーム解析)が必要になると考えている。近年、申請者が所属する機関において、近年、ガスクロマトグラフ四重極型質量分析計(GC/MS)を用いたプロテオーム解析を行うことで、いくつかの疾患において特異的な血液代謝物のパターンが存在することを明らかになった。そこで、申請者は、このプロテオーム解析を自分の研究分野に応用しようと着想した。

本研究では、肝細胞がん切除後のマウスモデルならびにヒト臨床検体を用いて、肝内再

発の有無で分けたプロテオーム解析を行う。肝細胞がんの再発に関わる代謝産物パターンの解析を行い、再発予測因子を同定し臨床応用の礎とする。

## 2. 研究の目的

これまでに、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いた血清プロテオミクス研究において、肝細胞がん切除後の血中代謝物 (プロテオーム) パターンが、切除後 1 年以内に再発したヒトと 1 年以上再発がなかったヒトとで比較して有意に異なることを明らかにしている。そこで本研究では、肝細胞がん切除後患者に絞り、これらの症例数を増やして GC/MS を用いた血清プロテオミクス研究を実施する。これにより、肝細胞がんの再発に関わる因子を詳細に検討し、統計学に基づいたより正確なデータベースを作成する。マウス、ならびに、ヒトでの肝細胞がん再発を病理組織学的ないし画像診断的に評価するという条件を満たした上で、ヒトでは 100 例以上の症例数を目標として設定する。GC/MS を用いたアミノ酸・有機酸分析を行うことで、肝細胞がんの再発予測に役立つ血中代謝物パターンの変動に関するより多くの情報の獲得を目指す。

## 3. 研究の方法

課題 : 網羅的代謝物解析による肝細胞がんの再発予測のための血清プロテオームの同定

1-1: GC/MS を用いた肝細胞がん切除後のマウスモデルでのアミノ酸、有機酸分析

肝細胞がんモデルマウス (ステリック再生医科学研究所) は脂肪性肝炎から肝硬変を経て肝細胞がんになり、そのうち半数はすぐに再発を来たことが知られている。課題 1-1 では、早期に肝細胞がんを再発したモデルマウスを用いて、それぞれ血清中代謝産物を脂溶性化合物、水溶性化合物に分けて網羅的に解析する。

具体的には、肝細胞がんを切除した後 4 週

間目、あるいは、8 週間目のマウスの肝組織の病理組織学的検索にて、肝細胞がん再発の有無を確認した後、それぞれのマウス血清からそれぞれ代謝産物を抽出し、得られた抽出液を GC/MS に供する。得られたクロマトグラムを主成分分析によりアミノ酸、有機酸の比較解析を行う。この結果により、肝細胞がんの再発に関わるプロテオームを同定する。

1-2: GC/MS を用いた肝細胞がん切除後の患者でのアミノ酸、有機酸分析

肝細胞がんの外科的切除後の患者のうち、研究の同意が得られた患者についてのみ血清を提供していただき、術後 1 年での再発の有無を腹部超音波検査ならびに腹部 CT で評価する。そして、-1 で確立した方法を用いて、GC/MS を用いたアミノ酸、有機酸の比較解析を実施する。肝細胞がん切除後 1 年以内に再発した群と 1 年以上無再発であった群の両群合わせて 100 例以上の症例数を目標として設定する。得られた解析結果と、画像検査による肝細胞がんの再発の有無とを照らし合わせることで、肝細胞がんの再発に関わる代謝産物のパターンを明らかにする。

課題 : 肝細胞がん再発予測式の検討

-1: 肝炎から肝硬変への進展予測式の作成  
肝炎から肝硬変への進展予測式を作成するために、GC/MS 分析において、以下の項目をファーストスクリーニングとして検討する。

-2: 肝細胞がん切除後の再発予測式の確認  
確認試験として、予測式を作成したのとは別の検体の分析結果を作成した予測式に挿入し、同様に感度、特異度を評価することで、作成した予測式の信頼性を確認する。

## 4. 研究成果

肝細胞がんの外科的切除後の患者のうち、研究の同意が得られた患者についてのみ血清を提供していただいた。術後 1 年での再発の有無を腹部超音波検査ならびに腹部 CT で評価した。そして、肝細胞がん切除後 1 年以内に再発した群と 1 年以上無再発であった群の

両群間で比較検討し肝細胞がんの再発に関わる代謝産物のパターンは明らかとならなかったが、今後症例数を増やして明らかにしていく必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Masaya Saito, Yoshihiko Yano, Hirotaka Hirano, Kenji Momose, Yuki Kawano, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Visceral fat accumulation is associated with increased mortality rate after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. J Cancer Ther, 2015, in press
2. Masaya Saito, Yoshihiko Yano, Hirotaka Hirano, Kenji Momose, Kentaro Mouri, Akitoyo Hishimoto, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. The serum level of NX-DCP-R, but not DCP, is not increased in alcoholic liver disease without hepatocellular carcinoma. Cancer Biomark 2015 Nov 23. [Epub ahead of print]
3. Masaya Saito, Hirotaka Hirano, Yoshihiko Yano, Hiroki Hayashi, Kenji Momose, Akihiro Minami, Yuki Kawano, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Recent topics of diagnosis and treatment in minimal hepatic encephalopathy of cirrhotic patients. Journal of Hepatitis 2015, in press
4. Masaya Saito, Hirotaka Hirano, Yoshihiko Yano, Kenji Momose, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Serum level of taurine would be associated with the amelioration of minimal hepatic encephalopathy in cirrhotic patients. Hepatol Res 2015 Jul 29. doi: 10.1111/hepr.12565. [Epub ahead of print]
5. Yuki Kawano, Shin Nishiumi, Masaya Saito, Yoshihiko Yano, Takeshi Azuma, Masaru Yoshida. Identification of Lipid Species Linked to the Progression of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. Curr Drug Targets. 2015 Apr 7. [Epub ahead of print]
6. Masaya Saito, Yoshihiko Yano, Hirotaka Hirano, Kenji Momose, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma. Serum NX-DCP is a new noninvasive model for predicting significant liver fibrosis in chronic hepatitis C. Hepat Mon 2015; 15(2): e22978, DOI: 10.5812/hepatmon.22978
7. Hirotaka Hirano, Masaya Saito, Yoshihiko Yano, Kenji Momose, Masaru Yoshida, Atsushi Tanaka, Takeshi Azuma. Chronic liver disease questionnaire would be a primary screening tool of neuropsychiatric test detecting minimal hepatic

encephalopathy of cirrhotic patients.

Hepatol Res 2015; 45(9): 939-1046.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

斉藤 雅也 (SAITO, Masaya)

神戸大学医学部附属病院 医員

研究者番号：00631558