

平成30年5月15日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19780

研究課題名(和文)肝細胞癌における肝幹細胞形質と上皮間葉移行発現に対する画像バイオマーカーの検討

研究課題名(英文)The investigation of imaging biomarkers predicting hepatic stem cell feature and epithelial-mesenchymal transition feature in hepatocellular carcinoma

研究代表者

米田 憲秀(Yoneda, Norihide)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：30721930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝幹細胞の形質を有し、予後不良なEpCAM陽性肝細胞癌ではダイナミックCT動脈相における不均一な濃染パターン、内部の造影不染域含有、MRIの拡散強調像におけるより低値なADC値、Gd-EOB-DTPA造影MRI(EOB-MRI)肝細胞相におけるnon-smooth marginという画像特徴をEpCAM陰性肝細胞癌群に比較して有意に高い頻度で認められた。これらの画像所見はEpCAM陽性肝細胞癌を推察するのに有用であり、将来的な個別化医療に貢献するものと考えられる。一方、EMT関連HCCを画像で推察することは難しいと考えられたが、EOB-MRIの肝細胞相での増強率がより低値を示す傾向を示した。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) positive hepatocellular carcinomas (HCC) having hepatic stem cell feature showed significantly higher incidence of imaging features including a heterogeneous arterial enhancement and internal no enhancement portion on dynamic CT study, lower apparent diffusion coefficient (ADC) value on diffusion weighted image, and non-smooth margin on hepatobiliary phase (HB phase) of Gd-EOB-DTPA enhanced MRI (EOB-MRI). These imaging findings are useful for predicting EpCAM positive hepatocellular carcinoma and are thought to contribute to future personalized medicine.

Regarding epithelial-mesenchymal transition (EMT) positive HCCs, there was no significant imaging features that can predict epithelial-mesenchymal transition (EMT) positive HCCs. However enhancement ratio of HB phase of EOB-MRI tended to be lower in EMT positive HCCs compared with EMT negative HCCs.

研究分野：画像診断

キーワード：肝幹細胞 上皮間葉移行(EMT) 肝細胞癌 画像バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌には他の癌同様、遺伝子学的、分子病理学的 heterogeneity (不均一さ) が存在する。すなわち、根治手術が施行されれば、比較的長期予後が期待される群から、早期に転移を来し、予後が不良なものまで様々である。我々は、近年肝特異性造影剤を使用した Gd-EOB-DTPA 造影 MRI (EOB-MRI) の肝細胞相において高信号を呈する肝細胞癌が予後良好な群であると報告した (Kitao A, Yoneda N et al. Radiology 2012; 265: 780-9)。一方、予後が不良な肝細胞癌としては、近年肝幹細胞 / 前駆細胞の形質を有するもの、上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) を呈するものは予後不良と言われている。

臨床画像においては、これら肝幹細胞 / 前駆細胞の形質を有する肝細胞癌や EMT を呈する点に注目した詳細な解析検討は未だに不十分である。画像診断でこれらの発現を予測することは、画像による肝細胞癌のより詳細な予後予測や今後の肝癌個別化医療に重要であると考え注目した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、肝幹細胞 / 前駆細胞の形質を有する肝細胞癌や上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) 発現を示唆する分子マーカーと臨床画像の関連を解析し、これらの発現に対する画像バイオマーカーを確立することである。

### 3. 研究の方法

外科切除された 85 症例 90 肝細胞癌を対象とし後方視的に検討した。肝幹細胞のマーカーとしては特に Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) に注目し、免疫

組織化学上 EpCAM が 5% 以上陽性となるものを、EpCAM 陽性肝細胞群とした。EpCAM 陽性肝細胞群 (n=24)、EpCAM 陰性肝細胞癌群 (n=66) の 2 つの群に分類した。胆管系のマーカーで肝幹細胞 / 前駆細胞マーカーでもある Cytokeratin (CK) 19 の免疫組織化学も施行した。一方、EMT に関しては、まず、間葉系のマーカーである vimentin、上皮系の細胞接着因子である E-cadherin の免疫組織化学を行い、発現の程度により、以下に示す 6 段階に半定量的に評価した。(Vimentin, 0=発現を認めない、1=癌細胞周囲に弱い発現、2=癌細胞周囲に中等度の発現、3=癌細胞周囲に高度の発現、4=癌細胞の 20% にまで発現、5=癌細胞の 20% 以上に発現。E-cadherin, 0=発現を認めない、1=癌細胞の 0-10% 未満の発現、2=10-30% 未満の発現、3=30-50% 未満の発現、4=50%-80% 未満の発現、5=80-100% の発現。) 今回は vimentin が上昇し (vimentin の免疫組織化学で 4、5 と評価したもの)、かつ、E-cadherin の発現が明らかに低下していると考えられた (E-cadherin の免疫組織化学で 0-3 と評価したもの) ものを EMT 関連 HCC 群として評価した。EMT 関連 HCC 群 (n=10) と EMT 非関連肝細胞群 (n=80) の 2 つの群に分類した。

画像では、ダイナミック CT にて増強率 (早期相の CT 値 - 造影前の CT 値 / 造影前の CT 値)、動脈相の増強パターン (びまん性、不均一、foci、乏血性)、拡張した血管の有無、内部造影不染域の有無を、MRI にて内部脂肪含有、T1 強調像、T2 強調像、拡散強調像における信号強度、ADC 値を、Gd-EOB-DTPA 造影 MRI (EOB-MRI) の肝細胞相にて腫瘍周囲の低信号の有無、腫瘍辺縁形状 (smooth、non-smooth)、増強率を検討した。それぞれの肝細胞癌群における臨床病理学的評価も併せて行った。

### 4. 研究成果

EpCAM 陽性肝細胞癌群 (n=24) では、画像検討上、ダイナミック動脈相における不均一な濃染パターン、内部造影不染域、より低値な ADC 値 (表 1)、EOB-MRI の肝細胞相での non-smooth margin が有意に高い頻度で認められた (それぞれ P=0.0154、0.0152、0.0396、0.0096) (表 1)。病理学的には EpCAM 陽性肝細胞癌群で多結節癒合型、低分化肝細胞癌、充実増殖、脈管浸潤、CK19 発現が有意に高い頻度で認められた (それぞれ P < 0.0001、0.0440、0.0316、0.0376、< 0.0001) (表 2)。

表 1. EpCAM 陽性肝細胞癌の画像解析

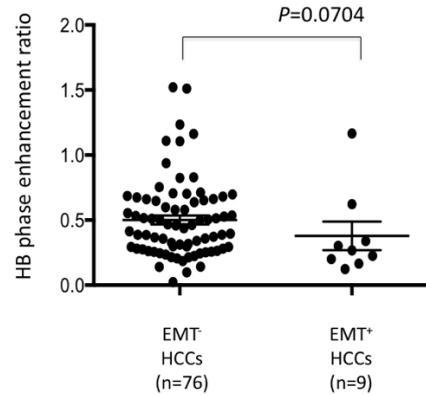
Dynamic CT evaluation		EpCAM+HCC (n=23)	ECAM-HCC (n=63)	P value
Enhancement ratio		1.34 ± 0.73	1.48 ± 0.96	0.3244
Enhancement pattern				
	hypo	2	3	
	foci	2	10	
	diffuse	2	22	0.0456
	hetero	17	28	(0.0154)
Dilated artery				
	positive	5	11	
	negative	18	53	0.7545
No enhancement portion				
	positive	15	24	
	negative	8	40	0.0152
MRI evaluation		(n=24)	(n=64)	
internal fat				
	positive	7	22	
	negative	17	42	0.6473
signal intensity of T1WI				
	hetero	8	15	
	hypo	13	40	
	iso	2	5	
	hyper	1	4	0.8026
signal intensity of T2WI				
	hetero	2	8	
	hypo	1	0	
	iso	2	7	
	slightly hyper	12	31	
	hyper	7	18	0.5471
signal intensity of DWI				
	hypo	1	1	
	iso	1	5	
	slightly hyper	15	51	
	hyper	7	7	0.1581
ADC value		1.22 ± 0.23 (n=22)	1.40 ± 0.30 (n=59)	0.0086
HB phase evaluation		(n=23)	(n=62)	
non-smooth margin				
	non-smooth	16	23	
	smooth	7	39	0.0113
peri-tumoral hypointensity				
	positive	7	24	
	negative	16	38	0.4814
enhancement ratio		0.428 ± 0.189	0.511 ± 0.336	0.6814

表 2. EpCAM 陽性肝細胞癌の臨床病理解析

Clinico-pathological evaluation		EpCAM+HCC (n=24)	ECAM-HCC (n=66)	P value
sex				
	M	16	49	
	F	8	17	0.478
age		62.5 ± 10.3	65.9 ± 9.8	0.2107
Child-pugh score				
	A	22	61	
	B	2	5	0.9055
Etiology				
	HBV	17	12	
	HCV	5	27	
	NASH or NAFLD	18	9	
	other	15	18	0.4646
back ground				
	LC	14	25	
	CH	8	33	
	other	2	8	0.2232
size		47.0 ± 47.8	38.2 ± 30.0	0.3469
macro				
	indistinct	2	3	
	simple nodular	11	45	
	nodular with extranodular	5	9	
	infiltrative	0	1	
	confluent multinodular	6	8	<0.0001
Differentiation				
	w	2	10	
	m	12	45	
	p	10	11	0.044
proliferation style				
	trabecular	11	32	
	pseudoglandular	5	24	
	scirrhous	2	6	
	solid	6	4	0.0316
vascular invasion				
	positive	15	25	
	negative	9	41	0.0376
CK19 positivity				
	positive	8	1	
	negative	16	65	<0.0001

一方、EMT 関連 HCC 群では画像検討においては上記のいずれの項目も有意差は認めなかった。ただし、EOB-MRI の肝細胞相の増強率では有意差は認めなかったが、より低値を示す傾向を有した (p=0.0704) (図 1)。

図 1. EMT 関連、非関連肝細胞癌の Gd-EOB-DTPA 造影 MRI 肝細胞相の増強率



臨床病理学的検討においては性別、年齢、術前肝機能 (child pugh 分類)、疫学 (HBV、HCV、NASH or NAFLD、その他)、背景肝の状態 (肝硬変、慢性肝炎、その他)、腫瘍サイズ、肉眼分類、分化度、増殖形態、脈管侵襲の有無、CK19 陽性の有無では両群比較で有意差を認めなかった。代表的肝幹細胞のマーカーである CK19 が陽性となるものは EMT 関連 HCC では 1 例も認められなかった。

EpCAM 陽性肝細胞癌ではダイナミック CT 動脈相における不均一な濃染パターン、内部の造影不染域含有、より低値な ADC 値、肝細胞相における non-smooth margin という画像特徴を EpCAM 陰性肝細胞癌に比して高頻度に認めた。これらの画像所見は予後の不良な EpCAM 陽性肝細胞癌 (肝幹細胞の形質を有する) を推察するのに有用であり、将来的な個別化医療に貢献するものと考えられる。

一方、EMT 関連 HCC を画像で推察することは難しいと考えられたが、EOB-MRI の肝細胞相での増強率がより低値を示す傾向を示した。

## 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 13 件)

1. Takamatsu S, Yoneda N (4 番目), 他 12 名: Pathology and images of radiation-induced hepatitis: a review article. Jpn J Radiol. 2018

- Apr;36(4):241-256. doi:  
10.1007/s11604-018-0728-1.
2. Yoshida K, Yoneda N (5 番目),他 8 名:  
Isolated Arteries Originating from  
the Intrahepatic Arteries: Anatomy,  
Function, and Importance in  
Intervention. *J Vasc Interv Radiol*.  
2018 Apr;29(4):531-537.e1. doi:  
10.1016/j.jvir.2017.12.002.
  3. Kitao A, Yoneda N (3 番目),他 18 名:  
Gadoxetic acid-enhanced magnetic  
resonance imaging reflects  
co-activation of  $\beta$ -catenin and  
hepatocyte nuclear factor 4 in  
hepatocellular carcinoma. *Hepatol  
Res*. 2018 Feb;48(2):205-216. doi:  
10.1111/hepr.12911.
  4. Yoneda N (1 番目),他 11 名:  
Peri-tumoral hyperintensity on  
hepatobiliary phase of gadoxetic  
acid-enhanced MRI in hepatocellular  
carcinomas: correlation with  
peri-tumoral hyperplasia and its  
pathological features. *Abdom Radiol  
(NY)*. 2017 Dec 19. doi:  
10.1007/s00261-017-1437-4.
  5. Toshima F, Yoneda N (5 番目),他 7 名:  
Is the combination of MR and CT  
findings useful in determining the  
tumor grade of pancreatic  
neuroendocrine tumors? *Jpn J Radiol*.  
2017 May;35(5):242-253. doi:  
10.1007/s11604-017-0627-x.
  6. Kozaka K, Yoneda N (8 番目),他 10 名:  
Dynamic CT findings of  
cholangiolocellular carcinoma:  
correlation with  
angiography-assisted CT and  
histopathology. *Abdom Radiol (NY)*.  
2017 Mar;42(3):861-869. doi:  
10.1007/s00261-016-0944-z.
  7. Yoneda N (1 番目),他 9 名: Benign  
Hepatocellular Nodules:  
Hepatobiliary Phase of Gadoxetic  
Acid-enhanced MR Imaging Based on  
Molecular Background. *Radiographics*.  
2016 Nov-Dec;36(7):2010-2027. Epub  
2016 Oct 14. Review. doi:  
10.1148/rg.2016160037
  8. Inoue D, Yoneda N (2 番目),他 11  
名:Imaging and pathological features  
of gastric lesion of immunoglobulin  
G4-related disease: A case report and  
review of the recent literature. *Mod  
Rheumatol*. 2016 Jul 21:1-5.  
doi:10.1080/14397595.2016.1209819
  9. Toshima F, Yoneda N (4 番目),他 7  
名: Adenosquamous carcinoma of  
pancreas: CT and MR imaging features  
in eight patients, with pathologic  
correlations and comparison with  
adenocarcinoma of pancreas. *Abdom  
Radiol (NY)*. 2016 Mar;41(3):508-20.  
doi: 10.1007/s00261-015-0616-4.
  10. Yoneda N (1 番目),他 11 名:  
Correlation between  
Gd-EOB-DTPA-enhanced MR imaging  
findings and OATP1B3 expression in  
chemotherapy-associated sinusoidal  
obstruction syndrome. *Abdom Imaging*.  
2015 Oct;40(8):3099-103. doi:  
10.1007/s00261-015-0503-z.
  11. Kitao A, Yoneda N (3 番目),他 17 名:  
Hepatocellular Carcinoma with  
 $\beta$ -Catenin Mutation: Imaging and  
Pathologic Characteristics.  
*Radiology*. 2015 Jun;275(3):708-17.  
doi: 10.1148/radiol.14141315. Epub  
2015 Feb 6.

12. Sasaki M, Yoneda N (2 番目), 他 9 名: Clinicopathological characteristics of serum amyloid A-positive hepatocellular neoplasms/nodules arising in alcoholic cirrhosis. *Histopathology*. 2015 May;66(6):836-45. doi: 10.1111/his.12588. Epub 2015 Jan 22.
13. Inoue D, Yoneda N (3 番目), 他 11 名: IgG4-related disease: dataset of 235 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Apr;94(15):e680. doi: 10.1097/MD.0000000000000680.

〔学会発表〕（計 19 件）

1. 米田憲秀, LIRADS2017 (EOB) とその周辺: EOB vs ECCM, 他の悪性腫瘍との鑑別、第 24 回肝血流動態・機能イメージ研究会、2018 年 2 月 3-4 日、都久志会館、(福岡、福岡)
2. 米田憲秀, 肝細胞性良性結節の画像診断、第 291 回 Open Film Conference 2018 年 1 月 18 日、群馬大学医学部、(群馬、群馬)
3. Yoneda N (1 番目), 他 8 名: Current status of the imaging biomarkers predicting biological nature of hepatocellular carcinoma, 103<sup>rd</sup> Radiological Society of North America (RSNA), Nov.26-Dec.1, 2017, McCORMICK PLACE, (Chicago, USA)
4. 米田憲秀, 各領域研究の進歩 1 胆膵、SAMI2017、2017 年 7 月 22 23 日、エルセラーンホール大阪 (大阪、大阪)
5. 米田憲秀 (1 番目), 他 9 名: 腫瘍内出血を合併した成人発症の肝未分化肉腫の 1 例、第 31 回日本腹部放射線学会、2017 年 6 月 30 日 7 月 1 日、旭川市大雪クリスタルホール (旭川、北海道)
6. 米田憲秀, 分子学的背景に基づいた肝細胞性結節の EOB-MRI 肝細胞相所見、第 10 回宮城 EOB セミナー、2017 年 5 月 12 日、青葉パークビル (仙台、宮城)
7. 米田憲秀 (1 番目), 他 9 名: アルコール性肝硬変に生じる SAA 陽性肝細胞性結節の画像所見: 多血性肝細胞癌との対比、第 76 回日本医学放射線学会総会、2017 年 4 月 13 日 - 16 日、パシフィコ横浜 (横浜、神奈川)
8. 米田憲秀, 肝硬変・慢性肝疾患に見られる良性肝細胞性結節 画像、第 36 回日本画像医学会、2017 年 2 月 25-26 日、ステーションコンファレンス東京 (東京、東京)
9. Yoneda N, Value of EOB in diagnosis, Hepatocellular adenoma (HCA) and Focal nodular hyperplasia (FNH), Asia Pacific Liver Imaging Symposium (APLIS) 2016. 2016 年 10 月 20-22 日、Conrad Beijing, (Beijing, China)
10. Yoneda N, Diagnosis for HCC, EOB-MRI as functional imaging, The 12<sup>th</sup> JSH single topic conference, 2016 年 9 月 22-23 日、ホテル日航金沢 (金沢、石川)
11. 米田憲秀, 肝血管性病変、第 52 回日本医学放射線学会秋季臨床大会、2016 年 9 月 16-18 日、京王プラザホテル (新宿、東京)
12. Yoneda N, Hyperplastic hepatocellular nodules (FNH, NRH, PNT, FNH-like nodule, NRH-like nodule); confused terminology and differentiation by MRI. 第 44 回日本磁気共鳴医学会大会、2016 年 9 月 9-11 日、大宮ソニックシティ (大宮、埼玉)
13. 米田憲秀 (1 番目), 他 9 名: EpCAM 陽性肝細胞癌における画像、臨床病理学的

検討、第 52 回日本肝癌研究会、2016 年 7 月 1-2 日、虎ノ門ヒルズフォーラム（東京）

14. Yoneda N(1 番目)、他 9 名：  
EpCAM-positive hepatocellular carcinoma: imaging and clinicopathological finding. 第 75 回日本放射線学会総会，2016 年 4 月 14-17 日，パシフィコ横浜（横浜、神奈川県）
15. 米田憲秀、肝細胞腺腫と FNH-like nodule .第 51 回日本医学放射線学会秋季臨床大会 . 2015 年 10 月 2-4 日アイーナ（いわて県民情報交流センター）（盛岡、岩手）
16. Yoneda N(1 番目)、他 8 名:Hepatobiliary phase of gadoxetic acid enhanced MR imaging of benign hepatocellular nodules based on molecule background. 101<sup>th</sup> Radiological Society of North America (RSNA), Nov.29- Dec.4, 2015, McCORMICK PLACE, (Chicago, USA)
17. Yoneda N. A case of beta-catenin activated HCA that mimicked focal nodular hyperplasia. Asia Pacific Liver Imaging Symposium (APLIS) 2015. 2015 年 9 月 17-19,日 JM Marriott Dongdaemun Square (Seoul, Korea).
18. 米田憲秀、肝良性結節性病変 (Adenoma・FNH like lesion 等) . JRC ミッドサマーセミナー2015 . 2015 年 7 月 18-19 日 神戸ポートピアホテル(神戸、兵庫)
19. Yoneda N (1 番目)、他 10 名：  
Hepatocellular adenoma with beta-catenin activation shows iso/hyperintensity on hepatobiliary phase of Gd-EOB-DTPA enhanced MRI: usefulness in predicting malignant

potentiality. The 6<sup>th</sup> asia pacific primary liver cancer expert meeting (APPLE). 2015 年 7 月 3-5 日. ハイアットリージェンシー大阪(大阪、大阪)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

米田憲秀 (YONEDA NORIHIDE)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号 : 30721930