

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390369

研究課題名（和文） 肝細胞癌再発・転移成立における遊離癌細胞と宿主側因子との相互関係の検討

研究課題名（英文） Study of the correlation between disseminated cancer cells and host factors in establishment of recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma

研究代表者

神山 俊哉（KAMIYAMA TOSHIYA）

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80322816

研究成果の概要（和文）：肝細胞癌切除例で CD133 の細胞質発現は AFP 値、分化度、門脈浸潤に関与し、陽性例の予後は不良であった。また、大腸癌症例でも CD133 過剰発現は予後不良因子であり、予後、再発、抗癌剤感受性に関与した。また、肝細胞癌症例では骨髄中 AFPmRNA 陽性は、1 年以内の切除後早期再発に関与した。肝細胞癌症例では骨髄中、末梢血中 VEGFR1mRNA はすでに高値であり、骨髄中 VEGFR-1 mRNA と AFP mRNA による分類も早期再発に関与した。このことから、遊離癌細胞と VEGFR1 陽性骨髄前駆細胞の共存は再発・転移に重要なステップであり、これら进行评估することは予後、再発予測因子として重要である。

研究成果の概要（英文）：Cytoplasmic expression of CD133 in HCC is associated with elevated serum AFP level, histologically high-grade tumor, and tumor invasion to the major branch of the portal vein. Positive cytoplasmic expression of CD133 represented the risk of poor prognosis. CD133 overexpression was an independent prognostic factor for PS of colorectal cancer (CRC) patients. Evaluation of the frequency and pattern of CD133 expression is useful for predicting prognosis, recurrence, and chemosensitivity in CRC patients. We found a significant tendency for patients who were positive for BM-AFP mRNA to experience recurrence within 1 year after surgery compared to those negative for BM-AFP mRNA. The BM-VEGFR-1 mRNA level of all HCC patients was higher than that of normal controls and the PH-VEGFR-1 mRNA level of almost all patients was higher than that of normal controls. The classification by BM-VEGFR-1 mRNA/BM-AFP mRNA was a significant risk factor for recurrence within 1 year after surgery. The importance of the coexistence of disseminated cancer cells and VEGFR-1-positive hematopoietic bone marrow progenitor cells was also proved because the DFS curve of patients negative for BM-AFP mRNA and BM-VEGFR-1 mRNA; low was better in the other 3 groups. The evaluation of BM-AFP and BM-VEGFR-1 mRNA in patients with HCC may be a valuable predictor of disease recurrence following curative resection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：遊離癌細胞、癌幹細胞、CD133、肝細胞癌、大腸癌、AFPmRNA、VEGFR1mRNA

1. 研究開始当初の背景

肝切除、ラジオ波凝固などの局所療法による根治治療が行われるようになり、肝細胞癌の治療成績は向上してきた。しかし、依然としてその再発率は高い。再発様式としては、慢性肝炎を背景とした多中心性発癌と遊離肝癌細胞による肝内転移、遠隔転移とが想定されている。しかし、肝移植の場合、背景の傷害肝は完全に除去されているにもかかわらず、移植肝、遠隔臓器に再発してくることを考えると、確かに遊離肝癌細胞が存在することが考えられる。したがって、遊離肝癌細胞からの再発、転移がどのように起こるかが解明され、少なくすることが出来ればその治療成績の飛躍的な治療成績の向上が得られ、また、肝細胞癌に対する肝移植の適応も広がり、もっと多くの肝細胞癌患者を救命することが出来るはずである。さらにその再発のおよそ半数が遊離癌細胞にもものといわれている肝切除や局所療法の治療向上も得られる。われわれは、これまでに肝細胞癌肝切除例の末梢血中、骨髓細胞中において real time PCR 法により AFPmRNA を測定し、その結果、末梢血、骨髓中 AFPmRNA 陽性、陰性により再発、予後率が予測できることを報告し(AFP mRNA Detected in Bone Marrow by Real-Time Quantitative RT-PCR Analysis Predicts Survival and Recurrence After Curative Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma. Ann Surg. 2006 Sep;244(3):451-463.)、遊離肝癌細胞により再発、転移が起こることを証明してきた。しかし、陽性でも再発しないもの、逆に陰性でも再発するものが存在した。一方、最近の研究により遊離癌細胞が存在するのみでは癌の転移は成立せず、特別な癌細胞側因子と宿主側因子が必要であると考えられるようになってきた。特別な癌細胞側因子に多分化能と自己複製能を持つ、いわゆる癌幹細胞がその役割を担うのではないかと推察され、宿主側因子として注目されているのが骨髓前駆細胞や血管内皮細胞等である。これらは癌幹細胞に対してトラップされやすい環境を作ったり、転移先での血管新生に関わることで転移に寄与すると推察されている。これらのことから、肝細胞癌の転移、再発が成立するには、遊離肝癌細胞が存在するのみでは十分条件ではなく、その細胞が真に転移能を有する癌幹細胞であることが必要であり、また、宿主側の要因として、転移形成に重要な VEGFR-1 を発現する骨髓由来の造血系骨髓前駆細胞などが存在する必要があると思われる。しかし、これまでに癌幹細胞や宿主側要因が、肝細胞癌患者の転移、再発に関与していることを研究した臨床データからの解析報告ほとんどない。一方、最近では

ISET(isolation by size of epithelial tumor cells) (Hum Pathol. 2006 Jun;37(6):711-8.) により遊離癌細胞を検出することが可能となったため、その細胞がどのような生物学的特性を有しているか、真に転移能を有するかなどを検討できるようになった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝細胞癌患者における転移・再発が成立する機序における癌幹細胞と VEGFR-1 を発現する骨髓由来の造血系骨髓前駆細胞の役割を、実験ではなく、本当の生体内、つまり肝細胞癌患者の中でで解明するために臨床データから検討する。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌切除例における末梢血、骨髓中遊離癌細胞の検出として AFPmRNA を標的とした real time PCR による末梢血、骨髓液中 AFPmRNA 値を測定

(2) 原発腫瘍における癌幹細胞の存在を CD133、CD44 による免疫染色から証明

(3) ISET による末梢血、骨髓中遊離癌細胞の検出と幹癌細胞としての可能性の検出

(4) 骨髓由来造血系骨髓前駆細胞の役割を検討するために VEGFR1mRNA を標的とした real time PCR による末梢血、骨髓液中 VEGFR1mRNA 値の測定

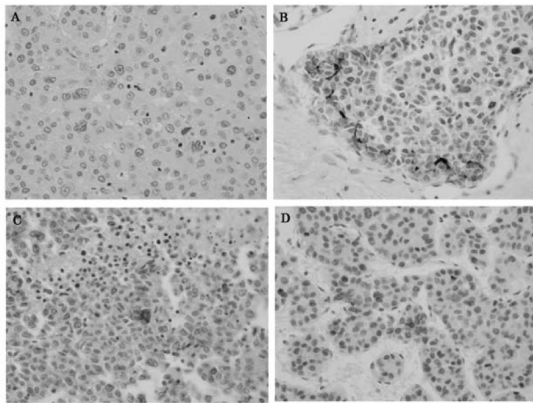
(5) 末梢血、骨髓液中 AFPmRNA、VEGFR1 mRNA の有無と臨床病理学的所見との比較検討。

(6) 末梢血、骨髓液中 AFPmRNA、VEGFR1 mRNA の有無と切除例の再発、予後との関係を検討

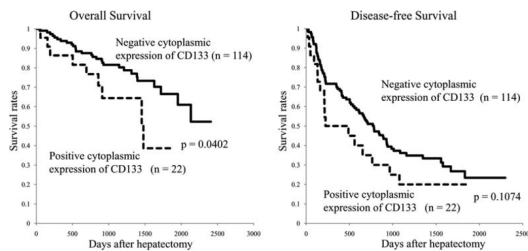
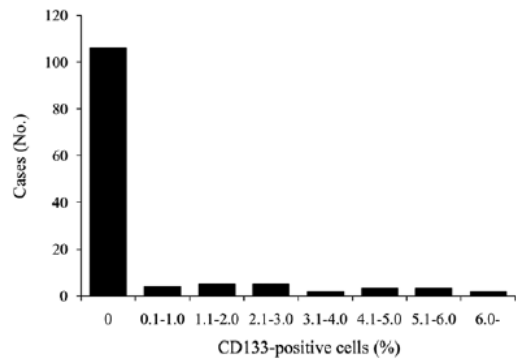
4. 研究成果

原発の肝細胞癌における癌幹細胞の存在を CD133 による免疫染色から証明するために初回根治的肝切除を行った 136 例の病理検体を用いて CD133 免疫染色を施行し腫瘍細胞の染色陽性率、染色パターンを検索した。染色性が得られた検体をさらに細胞膜陽性、細胞質陽性群に分類し、臨床病理学的因子および再発、予後との関連を単変量、多変量解析から検討した。肝細胞癌において CD133 陽性腫瘍細胞を 1 個以上認めたものを陽性とする CD133 細胞質陽性群 22 例(16%)、CD133 細胞膜陽性群 20 例(15%)であり、CD133 陽性は AFP 高値、低分化と有意に関連した。CD133 細胞質陽性群は陰性群に比べて予後不良であり、CD133 細胞膜陽性群は、遠隔転移、低分化型と有意に関連した。Stage 3、4 A 症例では CD133 細胞質陽性群は、単変量解析で有意に予後不良(p=0.0092)で、多変量解析では腫瘍因子の AFP、腫瘍径、組織学的門脈侵襲、CD133 細胞質発現のうち最

も有力な予後不良因子であった。
(CD133 免疫染色)



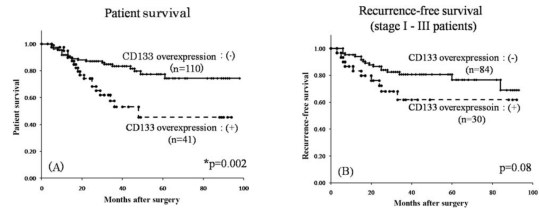
(CD133 細胞の陽性率)



M 癌を除く高/中分化腺癌であった大腸がん切除例 159 例でも CD133 免疫染色を施行した。陽性細胞数 50%以上の過剰発現例 (n=46) と 50%未満の非過剰発現例 (n=113) に分け、臨床病理学的因子および再発、予後との関連を単変量、多変量解析から検討した。CD133 は 146/159(91.8%)であった。主に大腸癌細胞の細胞膜に発現 142/159(89.3%)したが、細胞質にも発現 52/159(32.7%)した。膜・細胞質発現が混在するものも 48/159(30.2%)あった。過剰発現例は非過剰発現例に比べ有意に予後不良で(p=0.002)、多変量解析でも独立した予後因子であった。StageIII では過剰発現は有意な予後・再発因子であった(p=0.01,0.03)。中でも細胞膜過剰発現 (50%以上) が有意な因子であった。細胞膜過剰発現は化学療法を施行した StageIV・再発症例で病勢のコントロール率が低率であった。発現パターンごとの検討では CD133 細胞質発現は腫瘍の生物学的悪性

度に関与し CD133 細胞膜発現では予後と抗癌剤の対する効果に関与した。

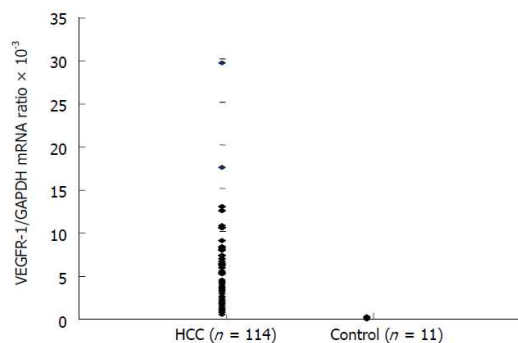
(CD133 過剰発現と予後・再発)



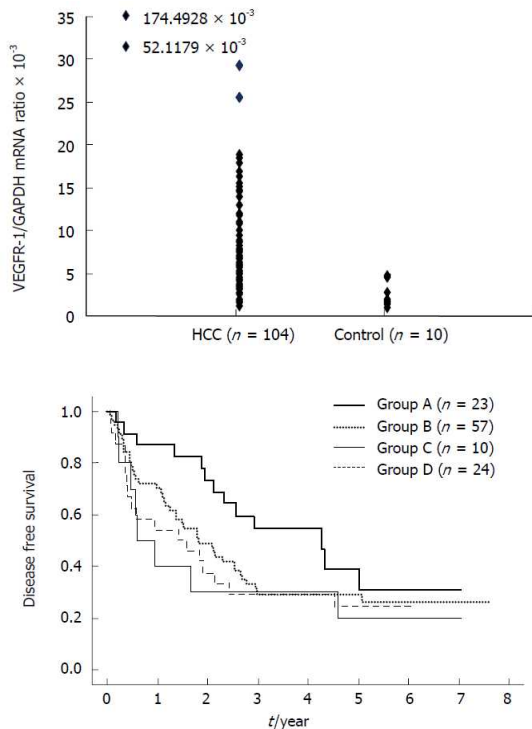
末梢血中、骨髄中肝癌細胞と臨床病理、病理組織学的因子と比較検討、再発、予後との関係に関する検討は、肝細胞癌切除患者の real time PCR で検出した骨髄中、末梢血中 AFPmRNA を遊離肝癌細胞の指標として行った。

骨髄中 AFPmRNA は、組織学的門脈侵襲と有意に相関し、組織学的分化度と有意傾向があった。末梢血中 AFPmRNA は血中 AFP 値、腫瘍数、組織学的門脈侵襲、組織学的肝静脈侵襲と有意に相関した。また、単変量解析で、骨髄中 AFPmRNA、末梢血中 AFPmRNA は、ともに 1 年以内の早期再発と有意に相関することが分かった。宿主側因子として注目されている骨髄前駆細胞については VEGFR1 陽性骨髄由来細胞が、癌転移成立に際して、premetastatic niche の形成に関与しているため、その VEGFR1 陽性骨髄由来細胞を骨髄液中、末梢血中の VEGF-R1mRNA で測定し、臨床病理、病理組織学的因子、再発、予後の詳細な検討を行った。また、骨髄液中、末梢血中 AFPmRNA との相互関係についても検討した。肝細胞癌患者の骨髄液中 VEGF-R1mRNA は、正常コントロールに比べ、全例高値を示し、末梢血中 VEGF-R1mRNA もほとんどの症例が正常コントロールに比べ、全例高値を示した。このことは担癌状態になると、premetastatic niche の形成が行われ癌転移成立の準備状態となると思われた。骨髄液中、末梢血中の VEGF-R1mRNA だけでは、単変量解析で 1 年以内の早期再発と有意に相関せず、骨髄中 AFPmRNA と関係し、骨髄液中 VEGF-R1mRNA 陽性かつ骨髄中 AFPmRNA 陽性症例が、最も再発しやすかった。

(骨髄中 VEGF-R1mRNA)



(末梢血中 VEGF-R1mRNA)



(各 Group ごとの無再発生存率)

group A (n = 23), BM-VEGFR-1/BM-AFP mRNA = low/negative, group B (n = 57) high/negative; group C (n = 10) low/positive; group D (n = 24), high/positive.

ISET で検出された癌細胞の有無と臨床的意義の評価を末梢血中、骨髄中肝癌細胞を ISET で分離し、その有無と臨床病理、病理組織学的因子と比較検討する、末梢血中、骨髄中肝癌細胞を ISET で分離し、その有無と再発、予後との関係を検討することで、検討する予定であったが、腫瘍細胞の同定が一定化せず、以下の方法に変更した。肝細胞癌患者の末梢血 10ml と骨髄血 5ml を採取し、Ficoll 処理にて単核球を分離する。MACS システムを用いて、汎白血球マーカーである CD45 陽性細胞を除去する (EpCAM 抗体使わず)。HepPar1 (発現率約 85%), Arginase1 (約 95%), AFP (30—50%) いずれかの蛍光抗体と CD45/DAPI (核) の 3 種類で多重染色する。この方法で肝細胞癌症例の骨髄血を用い、HepPar1/CD45/DAPI の多重染色にて腫瘍細胞の同定が可能であった。

まとめ

肝細胞癌、大腸癌においても CD133 で検出される癌幹細胞が、存在し、予後、再発に関与していることが分かり、転移する細胞の一つであることが推測され、肝細胞癌、大腸癌治療において、CD133 陽性細胞に代表され

る癌幹細胞を治療のターゲットとすることができれば、その治療成績の向上につながるようになる。特に肝細胞癌で、癌幹細胞の候補である CD133 陽性細胞の存在、さらに予後、再発に関与していることが証明されたことは、世界的にみても、数少ない報告である。

宿主側因子として注目されている VEGFR1 陽性骨髄前駆細胞は、肝細胞癌患者の骨髄液中 VEGF-R1 mRNA、末梢血中 VEGF-R1 mRNA が正常コントロールに比べ、全例高値を示したことから、担癌状態になると、premetastatic niche の形成が行われ癌転移成立の準備状態となっていることが推察された。肝細胞癌—宿主関連では、世界で初めての治験であり、癌細胞自体への治療の他に、癌を取り巻く宿主環境へのアプローチが、再発・転移に対する治療となり得る可能性が証明された。しかし、VEGFR1 陽性骨髄前駆細胞は、遊離癌細胞の存在があつて、はじめて転移・再発に関与すると思われるので、癌細胞自体への取り組みは必須であり、特に癌幹細胞をターゲットとする治療法の開発が望まれる。

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 14 件)

- ① alpha-Fetoprotein, vascular endothelial growth factor receptor-1 and early recurrence of hepatoma, Toshiya Kamiyama, Masato Takahashi, Kazuaki Nakanishi, Hideki Yokoo, Hirofumi Kamachi, Nozomi Kobayashi, Michitaka Ozaki, Satoru Todo. World Journal of Gastroenterology 2012 January 28; 18(4): 340-348 doi: 10.3748/wjg.v18.i4.340 (査読有)
- ② Effectiveness of Using Ultrasonically Activated Scalpel in Combination with Radiofrequency Dissecting Sealer or Irrigation Bipolar for Hepatic Resection. Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Kazuaki Nakanishi, Munenori Tahara, Daisuke Fukumori, Hirofumi Kamachi, Michiaki Matsushita, Satoru Todo. Hepatogastroenterology. 2012 May-Jun;59(115):831-5. doi: 10.5754/hge10337. (査読有)
- ③ Analysis of the risk factors for hyperbilirubinemia after hepatectomy. Daisuke Fukumori, Toshiya Kamiyama, Kazuaki Nakanishi, Hideki Yokoo, Munenori

- Tahara, Hirofumi Kamachi, Michiaki Matsushita, Satoru Todo. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2011 Sep;18(5):724-30. DOI 10.1007/s00534-011-0394-5 (査読有)
- ④ Einama T, Kamachi H, Nishihara H, Homma S, Kanno H, Takahashi K, Sasaki A, Tahara M, Okada K, Muraoka S, Kamiyama T, matsuno Y, Ozaki M, Todo S. Co-expression of Mesothelin and CA125 Correlates with Unfavorable Patient Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas* 2011 Nov;40(8):1276-82. DOI: 10.1097/MPA.0b013e318221bed8 (査読有)
- ⑤ Clinicopathological significance of nuclear factor- κ B activation in hepatocellular carcinoma. Constitutive activation of NF- κ B in advanced HCC. Hideki Yokoo, Jun Yasuda, Kazuaki Nakanishi1, Makoto Chuma, Toshiya Kamiyama, Satoru Todo, Setsuo Hirohashi, and Michiie Sakamoto. *Hepatology Research* 41(3); 240-249,2011. doi: 10.1111/j.1872-034X.2010.00758.x. Epub 2011 Jan 27. (査読有)
- ⑥ Nakanishi M, Chuma M, Hige S, Omatsu T, Yokoo H, Nakanishi K, Kamiyama T, Kubota K, Haga H, Matsuno Y, Onodera Y, Kato M, Asaka M. Relationship Between Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging and Histological Tumor Grading of Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2011 Sep 17. DOI 10.1245/s10434-011-2066-8 (査読有)
- ⑦ Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: the Japanese experience. Furukawa H, Shimamura T, Suzuki T, Taniguchi M, Nakanishi K, Yamashita K, Kamiyama T, Matsushita M, Todo S. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2010 Sep;17(5):533-8. DOI 10.1007/s00534-009-0168-5 (査読有)
- ⑧ The impact of anatomical resection for hepatocellular carcinoma that meets the milan criteria. Kamiyama T, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, Matsushita M, Todo S. *J Surg Oncol.* 2010 Jan 1;101(1):54-60. DOI 10.1002/jso.21414 (査読有)
- ⑨ Cytoplasmic expression of CD133 is an important risk factor for overall survival in hepatocellular carcinoma. Sasaki A, Kamiyama T, Yokoo H, Nakanishi K, Kubota K, Haga H, Matsushita M, Ozaki M, Matsuno Y, Todo S. *Oncol Rep.* 2010 Aug;24(2):537-46. DOI: 10.3892/or_00000890 (査読有)
- ⑩ Perioperative Management of Hepatic Resection Toward Zero Mortality and Morbidity: Analysis of 793 Consecutive Cases in a Single Institution. Kamiyama T, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, Tahara M, Yamashita K, Taniguchi M, Shimamura T, Matsushita M, Todo S. *J Am Coll Surg.* 2010 Oct;211(4):443-9. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2010.06.005 (査読有)
- ⑪ Frequency and pattern of expression of the stem cell marker CD133 have strong prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients. Takahashi S, Kamiyama T, Tomaru U, Ishizu A, Shida T, Osaka M, Sato Y, Saji Y, Ozaki M, Todo S. *Oncol Rep.* 2010 Nov;24(5):1201-12. DOI: 10.3892/or_00000973 (査読有)
- ⑫ Recurrence patterns after hepatectomy of hepatocellular carcinoma: implication of milan criteria utilization. Kamiyama T, Nakanishi K, Yokoo H, Kamachi H, Tahara M, Suzuki T, Shimamura T, Furukawa H, Matsushita M, Todo S. *Ann Surg Oncol.* 2009 Jun;16(6):1560-71. Epub 2009 Mar 4. DOI 10.1245/s10434-009-0407-7 (査読有)
- ⑬ The influence of hepatitis B DNA level and antiviral therapy on recurrence after initial curative treatment in patients with hepatocellular carcinoma. Chuma M, Hige S, Kamiyama T, Meguro T, Nagasaka A, Nakanishi K, Yamamoto Y, Nakanishi M, Kohara T, Sho T, Yamamoto K, Horimoto H, Kobayashi T, Yokoo H, Matsushita M, Todo S, Asaka M. *J Gastroenterol.* 2009;44(9):991-9. Epub 2009 Jun 25.

DOI 10.1007/s00535-009-0093-z (査読有)

- ⑭ Long-term outcome of laparoscopic hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma. Toshiya Kamiyama, Munenori Tahara, Kazuaki Nakanishi, Hideki Yokoo, Hirofumi Kamachi, Tatsuhiko Kakisaka, Yosuke Tsuruga, Michiaki Matsushita, Satoru Todo. Hepato-Gastroenterology (in press) (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 再発肝細胞癌への治療戦略 Salvage 肝移植を考慮して 神山俊哉、中西一彰、横尾英樹、蒲池浩文、田原宗徳、柿坂達彦、小丹枝裕二、山下健一郎、谷口雅彦、鈴木知己、嶋村剛、古川博之、松下通明、藤堂省 第 111 回日本外科学会定期学術集会(2011年5月 東京国際フォーラム)
- ② ANALYZE OF THE RISK FACTORS OF DEATH FROM CANCER PROGRESSION WITHIN 1 YEAR AFTER HEPATECTOMY FOR THE PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC). 2011 Annual meeting American Hepato-Pancreato-Biliary Association Miami Beach, Eden Roc, T. Kamiyama
- ③ 発現頻度・発現パターンから見た大腸癌における癌幹細胞マーカーCD133 の臨床的意義についての検討。高橋周作, 神山俊哉, 島田信吾, 工藤岳秋, 廣瀬邦弘, 佐治裕, 崎浜秀康, 尾崎倫孝, 外丸詩野, 石津明洋, 藤堂省。日本外科学会 (2010.03 名古屋国際会議場)
- ④ 肝細胞癌における CD133 発現の臨床病理学的意義。佐々木彩実, 神山俊哉, 横尾英樹, 中西一彰, 久保田佳奈子, 羽賀博典, 松下通明, 尾崎倫孝, 松野吉宏, 藤堂省: 日本外科学会 (2010.03 名古屋国際会議場)
- ⑤ AFPmRNA and VEGFR1mRNA detected in bone marrow by real time PCR relate early recurrence after curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. Kamiyama T The International Liver Cancer Association Fourth Annual Conference. September 10-12, 2010 Montreal, Canada
- ⑥ Cytoplasmic expression of CD133 is an important risk factor for overall survival in hepatocellular carcinoma. Sasaki A, Kamiyama T The International Liver Cancer Association

Fourth Annual Conference. September 10-12, 2010 Montreal, Canada

- ⑦ 肝細胞癌切除後再発への治療戦略—salvage 肝移植を考慮して— 神山俊哉、中西一彰、横尾英樹、蒲池浩文、田原宗徳、福森大介、山下健一郎、谷口雅彦、鈴木知己、嶋村剛、古川博之、松下通明、藤堂省 第 65 回日本消化器外科学会総会 (2010年7月14~16日 海峡メッセ下関)
- ⑧ 1 年以内に癌死する肝細胞癌症例の検討 第 72 回日本臨床外科学会総会 (2010年11月21~23日 パシフィコ横浜) 神山俊哉、中西一彰、横尾英樹、蒲池浩文、谷口雅彦、田原宗徳、柿坂達彦、松下通明、藤堂省
- ⑨ The efficacy of anatomical resection for hepatocellular carcinoma within the Milan criteria. 2009 Annual meeting American Hepato-Pancreato-Biliary Association Miami Beach, Eden Roc, Toshiya Kamiyama
- ⑩ 大腸癌症例における CD133 の発現と臨床的意義 高橋周作, 神山俊哉, 外丸詩野, 工藤岳明, 旭火華, 広瀬邦弘, 佐治裕, 崎浜秀康, 片岡昭彦, 藤堂省 日本消化器外科学会 (2009.07 リーガロイヤルホテル大阪)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 俊哉 (KAMIYAMA TOSHIYA)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 80322816

(2) 研究分担者

中西 一彰 (NAKANISHI KAZUAKI)
北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号: 80374338

横尾 英樹 (YOKOO HIDEKI)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号: 70399947

田原 宗徳 (TAHARA MUNENORI)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号: 30306576

藤堂 省 (TODO SATORU)
北海道大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号: 60136463

(3) 連携研究者

()

研究者番号: