

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23249067

研究課題名(和文) バイオマーカーを用いた肝細胞癌の新規画像診断システムの構築と治療への応用的展開

研究課題名(英文) Establishment of new diagnostic imaging system for hepatocellular carcinoma and its application to cancer therapy

研究代表者

國土 典宏 (KOKUDO, Norihiro)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：00205361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌(HCC)の最も有効な治療法は外科的切除であるが、術後の高頻度な再発が臨床的な課題となっている。この課題の克服には、高感度な診断法や有効性の高い術後治療法の開発が必要である。我々は、蛍光物質インドシアニングリーン(ICG)がHCC組織に長期間蓄積することを明らかにした。この性質を利用して、手術中にICGの蛍光発光を探索し、目視や既存の画像診断では検出できなかった新たなHCCを検出する術中診断技術確立した。一方、ICGが蓄積したHCC組織に対して近赤外光を照射することにより、HCC細胞のみを死滅させる光線力学療法を開発した。これらの技術は、HCCの再発の抑止に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The most effective treatment for hepatocellular carcinoma (HCC) is surgery, but the frequent recurrence of HCC after surgery is a clinical issue. Resolving the problem requires the development of sensitive diagnostic methods and efficacious post-operative therapies. We found that the fluorescent substance indocyanine green (ICG) accumulated in HCC tissue over a period of 1 week. Given this property of ICG, we examined its fluorescence during surgery and we developed an intraoperative diagnostic technique to detect sites of HCC that visual inspection and existing diagnostic images had failed to detect. Moreover, we developed a form of photodynamic therapy that illuminates HCC tissue where ICG has accumulated with near-infrared light to selectively destroy HCC cells. These approaches can help to prevent the recurrence of HCC.

研究分野：肝胆膵外科学

キーワード：肝細胞癌 バイオマーカー 画像診断 治療

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(HCC)は世界的な癌死亡原因の第3位に位置する上、アジア地域ではHCC発症の重要なリスクファクターであるウイルス性肝炎の罹患率が高いため、今後HCCの患者数が増え続けることが懸念される。当該疾患に対する現時点での最も有効な治療法は外科的切除であるが、肝機能の悪化など様々な要因による切除不適合や検知不可能だった病変に由来する切除手術後の高頻度な再発が問題となっている。

外科的治療技術においては、肝の解剖に基づく系統的切除が肝胆道系悪性腫瘍に対する根治性と安全性を両立させた治療法として確立しつつあり、これまでにHCC患者の術後生存率を飛躍的に向上させてきた実績をもつ。しかし、肝内の脈管は透見できないため、熟練した術者を除いて解剖学的な肝区域・亜区域に従って正確に肝切除を遂行することは容易でない。そこで、研究代表者である國土らの研究グループでは、術中超音波技術(IOUS)や indocyanine green (ICG) 蛍光法を用いることにより高感度にHCCを検出しながら系統的切除術を実施する一連の治療技術を構築するなど、各種画像技術を用いた肝細胞癌診断を科学的根拠に基づいた技術としてシステム化し、術前の診断はもちろん術中ナビゲーションや術後のフォローアップにおける数々の有用性を証明してきた(Kokudo N *et al.* Ann Surg 2005;242(5):651-4、Zhan K *et al.* Arch Surg 2007;142(12):1170-5、Ishizawa T *et al.* Cancer 115:2491-2504, 2009)。その結果、緻密な計算技術に基づく切除可能肝容量の判定により患者の肝機能の低下が原因の術後肝不全が回避されたほか、IOUSにより術中におけるHCCの検出感度の向上が達成された。しかし、微小なHCCや浸潤部位に対する術中診断の精度もまだ十分であるとは言えず、前述した高頻度の術後再発の原因の一つと考えられている。さらに、これら既存の画像診断技術は、病変の大きさや硬さなど物理的指標に基づく画像化のみであり、画像から腫瘍の病態や周辺組織への影響を見極めるのは困難である。

種々のバイオマーカーを用いた血清学的診断法がHCCの診断において重要なものとなっており、科学的根拠に基づいた適切な方法により高感度にHCC患者が検出される上、術後の経過を追跡することによって治療の程度や再発の判定への利用が可能である。これらのバイオマーカーは癌などの病変部位から分泌された異常タンパク質である。本研究計画の研究分担者である唐子らの研究の成果では、肝癌患者組織中における異常タンパク質の発現が癌部組織で高感度に検出されたほか、その発現性が脈管浸

潤の発生などのような癌の病態の悪化や癌患者の術後予後の低下と有意な相関性をもつことが示唆された(Tang W *et al.* Oncol Rep 2007;17(4):737-41、Tang W *et al.* Oncol Rep 2005;13(1):25-30)。なかでも、HCC細胞より発現する異常タンパク質の一種である des-gamma-carboxyprothrombin (DCP)は、癌細胞の増殖や浸潤に直接的に関与する能力をもち、HCCの病態悪化の原因となりうるということが示唆された。つまり、DCPの高発現が脈管浸潤と有意な相関性をもつという臨床学的なエビデンスと合わせて鑑みると、DCPを用いてHCCを検出することは病態を診断する上でも有効であることが示唆された(Gao FJ *et al.* Life Sci 2008;83(23-24):815-20)。以上のことから、診断用バイオマーカーとしてすでに臨床応用されている種々の異常タンパク質の発現性が、高感度な癌組織の検出とその病態の把握を可能とする画像診断技術の構築に有用であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、すでに体外検査法で使用されている癌特異的なバイオマーカーを標的としてモデル動物を用いた *in vivo* 実験や患者由来の切除標本を用いた組織学的解析を行い、HCC組織を高感度に検出する方法を確立することを目的とする。そして、検出感度及び特異性の面から有用だと判断されたバイオマーカーを臨床応用へと展開するために、先進的イメージング技術と融合させることにより独創性の高い画像診断システムを確立すると共に、診断及び治療の両面において応用可能なヒト型に変換したHCC検出用ツールを開発することを第2段階の目的とする。さらに、申請者らは静注後にICGがHCCに特異的に集積することを見出したが、上記の新規バイオマーカーに加えてICGの薬理動態の解明とイメージング技術の開発を平行して実施し、新規抗癌剤や蛍光特性を活用した治療法を開発に活用する。

## 3. 研究の方法

### (1)HCC組織におけるDCPの発現性の解析

術中採取されたHCC患者由来組織からホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、免疫組織化学的染色に供した。抗原賦活化は、クエン酸緩衝液中でマイクロウェーブ処理にて実施した。DCPの検出には、マウス由来抗DCPモノクローナル抗体を使用した。全ての症例に関して、癌部及び非癌部におけるDCPの染色像を評価し、その染色性に基づいて症例を群分けした。DCPの発現性と各種臨床病理学的因子との相関性を解析した。

## (2)HCC モデルマウスを用いた ICG 由来蛍光像の評価

マウスを用いて HCC 組織における ICG の特異的蛍光発光の誘導を検出するために、in vivo 実験系の開発を試みた。In vitro での細胞培養系にて、種々の肝癌細胞に対して ICG を添加し、その蓄積を観察した。ICG の蓄積が十分に観察された HuH-7 細胞を 5 週令オスの Balb/c ノードマウスに対して皮下移植し、腫瘍を生育させた。10-14 日後、ICG を尾静脈から 5 mg/kg で投与し、その 24 時間後に蛍光観察カメラを用いてマウス体表から発せられる蛍光の像を観察・評価した。

## (3)光線力学的治療への応用

ICG は近赤外光を吸収して、発熱する作用を有する。HCC 細胞において特異性高く滞留する性質と近赤外光による発熱性を利用して、HCC に対する光線力学的治療法の開発を試みた。前述したように、Balb/c ノードマウスに対して肝癌細胞 HuH-7 細胞を移植して肝癌モデルマウスを作製した。マウスに対して 5 mg/kg で ICG を静注し、24 時間飼育した。ICG を滞留した腫瘍組織に対して近赤外光を 160mW の強さで 3 分間照射した。その後 9 日間にわたって腫瘍の大きさを測定し、近赤外光照射の効果を評価した。

## 4. 研究成果

### (1)HCC 組織における DCP の発現の臨床病理学的意義

DCP は HCC の血清診断マーカーとして臨床医療で用いられてきたが、HCC 組織における発現性を解析し、その病理学的意義を検討した研究は少ない。また、血清中の DCP のレベルと組織発現との関連性を検討した研究はない。抗 DCP 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行い、染色像を解析した。DCP の発現は癌部だけでなく非癌部組織においても検出された(図 1)。非癌部における DCP の発現は、癌の脈管浸潤の発生 ( $P=0.02$ ) や病態の進展を示す TNM ステージの悪化 ( $P=0.01$ ) と統計学的に有意に相関した。また、組織における DCP の発現や血清中の DCP 量と HCC 症例群の予後との関連性を解析した(図 2)。その結果、癌部及び非癌部の双方で DCP の発現をみとめた症例群で最も予後が悪かった ( $P=0.03$ )。そして、組織での DCP の発現と血清中の DCP 量を両方とも鑑みたところ、組織での高発現と血清中での上昇の両方のみとめた症例群の 5 年生存率は 14%となり、他の症例群と比較して有意に悪化した ( $P=0.01$ 、図 2d)。この DCP 組織での発現と血清中での量を合わせた因子は、多変量解析により肝内転移の発生と共に予後因子とされた(ハザード比: 3.631、 $P<0.001$ )。以上の結果から、DCP の高発現は HCC 症例の病態の悪化と関連性があると示唆された。DCP の組織発現は、血清中のレベルと共に HCC 症例の病態を評価するツールとし

て有意義であると考えられる。

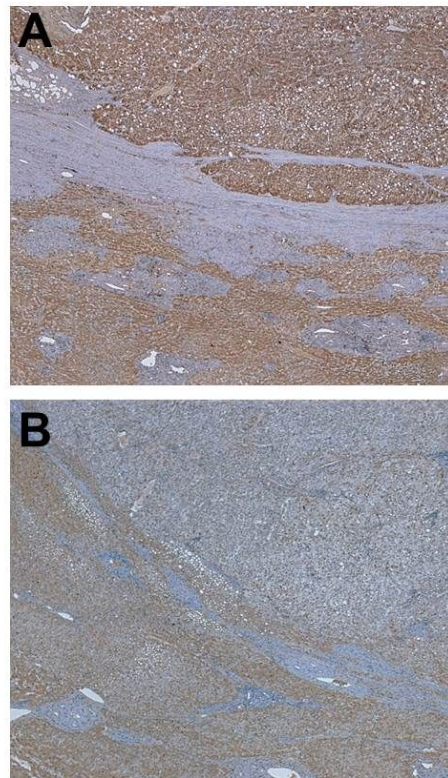


図 1. HCC 組織における DCP の発現性. A: 癌部及び非癌部組織の双方で DCP の発現をみとめた例. B: 非癌部組織のみで DCP の発現をみとめた例.

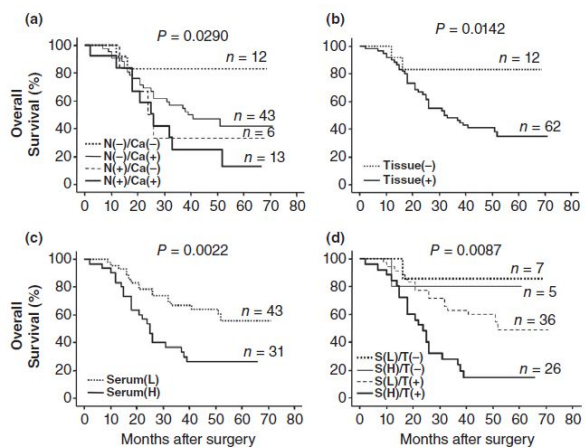


図 2. DCP の組織発現及び血清レベルと HCC 症例群の予後との関連性. (a) 癌部及び非癌部組織における DCP の発現と患者予後との関連. (b) HCC 組織全体における DCP の発現と患者予後との関連. (c) DCP の血清レベルと患者予後との関連. (d) DCP の組織発現と血清レベルを合わせた因子と患者予後との関連.



(2) HCC 移植癌モデルマウスにおける ICG の蛍光の観察と評価

ICG は、HCC 組織、とりわけ高分化型の HCC 組織において特異性高く滞留する性質を有することが臨床研究によって明らかにされた。本研究では、HCC 移植癌モデルマウスを用いて、ICG の特異的滞留性を評価できるかを検討した。まず、invitro での細胞培養系において、ICG を取り込み滞留する性質を有する細胞を探索した。その結果、HuH-7 細胞が最も強い蛍光強度を示した(図 3)。従って、HuH-7 細胞が ICG を高度に滞留する細胞であると考え、以下の実験を HuH-7 細胞を用いて実施することとした。HuH-7 細胞を皮下に移植し、腫瘍を形成させたマウスを作出した。ICG を尾静脈から投与し、24 時間後の蛍光像を観察した。静注直後は ICG 由来の蛍光発光がマウス全身から検出されたが、24 時間後は HuH-7 細胞由来の腫瘍組織のみから強い蛍光発光が観察された(図 4)。なお、ICG を滞留する性質を有さない大腸癌細胞由来の腫瘍をもったマウスでは、腫瘍組織が蛍光発光することはなかった。以上の結果から、臨床研究で明らかにされた HCC 組織における ICG の特異的滞留性は、HCC 移植癌モデルマウスを用いて再現可能であることが示された。

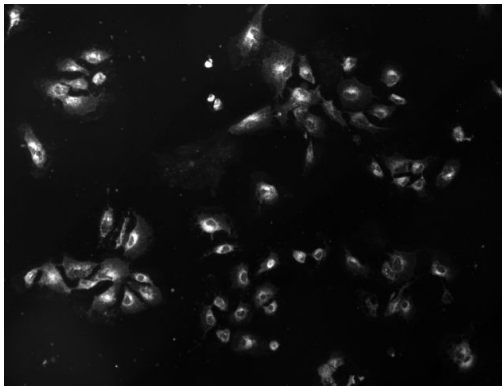


図 3 . HuH-7 細胞における ICG 由来の蛍光発光 .

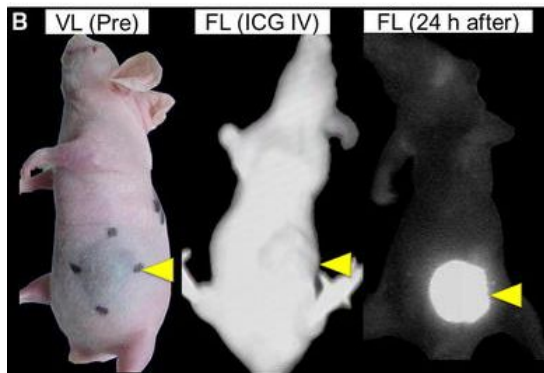


図 4 . HuH-7 細胞皮下移植モデルマウスにおける ICG 由来の蛍光発光 . (左) ICG 静注前のマウス (明視野像) . (中央) ICG 静注直後のマウス (蛍光像) . (右) ICG 静注 24 時間後のマウス (蛍光像) .

(3) ICG と近赤外光の組み合わせによる特異的光線力学療法の開発

前項目において、ヒトと同様に HCC における ICG の特異的滞留性を誘導可能なマウス癌モデルを確立した。一方で、ICG は近赤外光を吸収して、発熱する性質を有する。この性質を利用すれば、ICG の滞留した細胞に対して発熱を介した細胞死を誘導可能であると考えられた。移植癌モデルマウスの HuH-7 細胞由来の腫瘍組織に対して近赤外光 (160 mW、3 分間) を照射し、その後の腫瘍サイズを経時的に測定し、抗癌効果を評価した。その結果、ICG を静注して近赤外光を照射した群 (ICG+IR+) では腫瘍の生育が有意に抑制された ( $P < 0.01$ ) (図 5)。一方、ICG を静注せずに近赤外光を照射した群 (ICG-IR-) はじめとする他の群 (ICG+IR- 及び ICG-IR-) では腫瘍の生育は抑制されなかった。従って、ICG を滞留させた HCC 組織に対する近赤外光の照射は一定の抗癌効果を有することが示唆された。ICG を滞留させて近赤外光を照射した HCC 組織を採取して凍結切片を作製し、HE 染色を実施して細胞や組織の形態を観察した。近赤外光を照射した領域の HCC 細胞は、核が著しく凝集していた(図 6)。これは、近赤外光照射が、ICG を介して細胞内で発熱し、細胞死を誘導させたと考えられる。なお、近赤外光が照射されなかった部位では、核の凝集は見られず、細胞の異形化も起こらなかった。以上の結果から、ICG を滞留させる性質を有する HCC 組織に対する近赤外光照射は、特異的な抗癌効果を誘導する点で有効な治療法となり得ることが示唆された。今後、近赤外光の照射条件を検討することで、腫瘍の縮小を達成できるかを検討する。背景で前述したように、HCC は切除ができて術後の再発が非常に高頻度であることが臨床上的課題となっている。切除後の患者の残肝組織に対して近赤外光を照射することにより、目視できない小さな HCC を殺傷できると考えられる。この治療法は、HCC の術後の再発を抑制するうえで画期的な方法となると期待される。

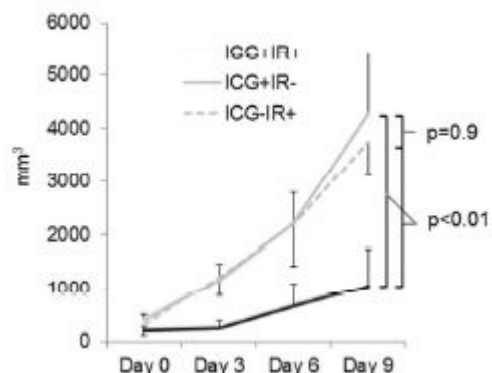


図 5 . 移植癌モデルマウスの HCC 組織に対する近赤外光照射の効果 . (太線) ICG を静注し近赤外光を照射した群、(実線) ICG を静注し近赤外光を照射しなかった群、(点線) ICG を

静注せず近赤外光を照射した群 .

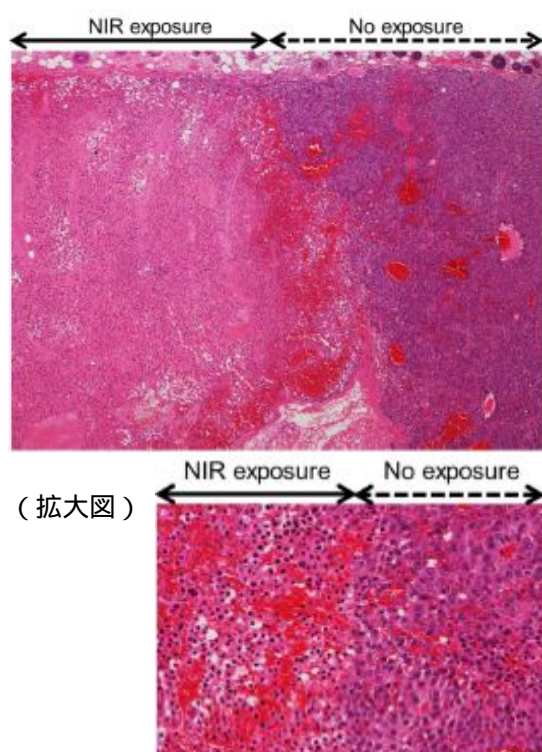


図 6 . ICG を静注し近赤外光を照射した HCC 組織の形態の変化( HE 染色像 ).拡大図では、照射部位の HCC 細胞の核が凝集している .

#### 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. Kawaguchi Y, Akamatsu N, Ishizawa T, Kaneko J, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N. Evaluation of hepatic perfusion in the liver graft using fluorescence imaging with indocyanine green. *Int J Surg Case Rep.* 14, 149-51, 2015. doi: 10.1016/j.ijscr.2015.07.031.
2. Miyata A, Ishizawa T, Tani K, Shimizu A, Kaneko J, Aoki T, Sakamoto Y, Sugawara Y, Hasegawa K, Kokudo N. Reappraisal of a Dye-Staining Technique for Anatomic Hepatectomy by the Concomitant Use of Indocyanine Green Fluorescence Imaging. *J Am Coll Surg.* 221(2), e27-36, 2015. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.05.005.
3. Kawaguchi Y, Hasegawa K, Tanaka N, Ishizawa T, Kaneko J, Sakamoto Y, Aoki T, Sugawara Y, Kokudo N. Advances in Assessment and Planning for Surgical Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis.* 33(5), 683-90, 2015. doi: 10.1159/000438498.
4. Kono Y, Ishizawa T, Tani K, Harada N, Kaneko J, Saiura A, Bandai Y, Kokudo N. Techniques of Fluorescence Cholangiography During Laparoscopic Cholecystectomy for Better Delineation of the Bile Duct Anatomy. *Medicine (Baltimore).* 94(25), e1005, 2015. doi: 10.1097/MD.0000000000001005.
5. Ishizawa T, Masuda K, Urano Y, Kawaguchi Y, Satou S, Kaneko J, Hasegawa K, Shibahara J, Fukuyama M, Tsuji S, Midorikawa Y, Aburatani H, Kokudo N. Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 21(2), 440-8, 2014. doi: 10.1245/s10434-013-3360-4.
6. Wang Z, Song P, Xia J, Inagaki Y, Tang W, Kokudo N. Can gamma-glutamyl transferase levels contribute to a better prognosis for patients with hepatocellular carcinoma? *Drug Discov Ther.* 8(3), 134-8, 2014.
7. Kaneko J, Inagaki Y, Ishizawa T, Gao J, Tang W, Aoki T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Sugawara Y, Kokudo N. Photodynamic therapy for human hepatoma-cell-line tumors utilizing biliary excretion properties of indocyanine green. *J Gastroenterol.* 49(1), 110-6, 2014. doi: 10.1007/s00535-013-0775-4.
8. Song P, Feng X, Zhang K, Song T, Ma K, Kokudo N, Dong J, Tang W. Perspectives on using des- -carboxyprothrombin (DCP) as a serum biomarker: facilitating early detection of hepatocellular carcinoma in China. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2(4), 227-31, 2013. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2013.08.11.
9. Song P, Gao J, Inagaki Y, Kokudo N, Hasegawa K, Sugawara Y, Tang W. Biomarkers: evaluation of screening for and early diagnosis of hepatocellular carcinoma in Japan and china. *Liver Cancer.* 2(1), 31-9, 2013. doi: 10.1159/000346220.
10. Seyama Y, Imamura H, Inagaki Y, Matsuyama Y, Tang W, Makuuchi M, Kokudo N. Intermittent clamping is superior to ischemic preconditioning and its effect is more marked with shorter clamping cycles in the rat liver. *J Gastroenterol.* 48(1), 115-24, 2013. Doi: 10.1007/s00535-012-0613-0
11. Gao J, Inagaki Y, Song P, Qu X, Kokudo N, Tang W. Targeting c-Met as a

promising strategy for the treatment of hepatocellular carcinoma. Pharmacol Res. 65(1), 23-30, 2012. Doi: j.phrs.2011.11.011

〔学会発表〕(計10件)

1. Kokudo T, Inagaki Y, Hasegawa K, Shirata T, Kaneko J, Akamatsu N, Arita J, Sakamoto Y, Kokudo N. Loss of e-cadherin portal vein tumor thrombosis of hepatocellular carcinoma can be reversed by c-met inhibitor. International Liver Cancer Association 9th Annual Conference ILCA 2015. 2015年9月4日~6日
2. Shirata C, Kaneko J, Inagaki Y, Kokudo T, Yamamoto S, Akamatsu N, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N. Near infrared photodynamic therapy using indocyanine green inhibits tumor growth of human hepatocellular carcinoma. International Liver Cancer Association 9th Annual Conference ILCA 2015. 2015年9月4日~6日
3. 金子順一、稲垣善則、白田力、國土典宏、山本訓史、赤松延久、有田淳一、阪本良弘、唐子堯、長谷川潔、國土典宏 . Indocyanine green 蛍光肝細胞癌に対する腹腔鏡下ないし開腹下近赤外光レーザー照射による光線力学療法 .第69回手術手技研究会 . 2015年5月16日
4. 國土典宏 . The application of ICG fluorescence imaging in liver surgery. Progress in Management on Hepatocellular Carcinoma. 2014年11月14日~16日
5. 國土典宏 . ICG 蛍光法を活用した肝癌診断と手術法の進歩 .第21回外科フォーラム . 2014年7月26日
6. 工藤宏樹、進藤潤一、赤松延久、金子順一、青木琢、阪本良弘、菅原寧彦、長谷川潔、國土典宏 . ICG 蛍光法で検出された早期肝細胞癌の一例 .第49回日本肝癌症例検討会 . 2014年4月19日
7. 河口義邦、石沢武彰、永井元樹、野村幸博、田中信孝、阪本良弘、青木琢、菅原寧彦、長谷川潔、國土典宏 . ICG 蛍光法を応用した肝切除・肝移植術中の肝内血流動態の評価 .第68回日本消化器外科学会総会 . 2013年7月17日~19日
8. 石沢武彰、谷圭吾、原田庸寛、清水篤志、田村純人、金子順一、青木琢、阪本良弘、菅原寧彦、長谷川潔、國土典宏 . ICG 蛍光法を肝癌および肝静脈・胆管の描出に用いた腹腔鏡下肝切除 .第25回日本肝臓膵外科学会 . 2013年6月12日~14日
9. 國土典宏、石沢武彰、浦野泰照 .Clinical Application of Fluorescence Imaging to Hepatobiliary and Pancreatic Surgery. 第8回分子イメージング学会 . 2013年5

月30日~31日

10. 河口義邦、石沢武彰、田中信孝、三瀬祥弘、田村純人、金子順一、阪本良弘、青木琢、菅原寧彦、長谷川潔、瀬尾明彦、永井元樹、野村幸博、國土典宏 . ICG 蛍光法による肝静脈閉塞域の肝機能評価を応用した拡大左肝切除 . 第113回日本外科学会学術集会 . 2013年4月11日~13日

〔図書〕(計2件)

1. Dip FD, Ishizawa T, Kokudo N, Rosenthal R. Fluorescence Imaging for Surgeons Concepts and Applications. Springer 2015.
2. Kokudo N, Ishizawa T. Fluorescent Imaging Treatment of Hepatobiliary and Pancreatic Diseases. KARGER 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
該当なし

取得状況(計0件)  
該当なし

〔その他〕  
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

國土典宏 (KOKUDO, Norihiro)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 00205361

(2)研究分担者

唐子堯 (KARAKO, Takashi)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 00313213  
チン ユ (CHEN, Yu)  
東京大学・新領域創成科学研究科・准教授  
研究者番号: 00272394  
石沢武彰 (ISHIZAWA, Takeaki)  
公益財団法人がん研究会・有明病院・消化器外科・副医長  
研究者番号: 10422312  
浦野泰照 (URANO, Yasuteru)  
東京大学・薬学系研究科・教授  
研究者番号: 20292956  
秋光信佳 (AKIMITSU, Nobuyoshi)  
東京大学・アイソトープ総合センター・教授  
研究者番号: 40294962

(3)連携研究者

該当なし