

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592004

研究課題名(和文) 肝移植後の肝癌再発進展に於ける腫瘍関連マクロファージの役割と分子機序の解明

研究課題名(英文) The significance of tumor associated macrophage in recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation

研究代表者

池上 徹 (IKEGAMI, TORU)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80432938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌に対して生体肝移植を施行した症例にてNLR(好中球リンパ球比)NLR>4が最も肝癌再発に強く影響を与えていた。多変量解析では、NLR>4、腫瘍径>5cm、最終治療から肝移植までの期間<3ヶ月が再発危険因子であった。NLR>4の症例では、腫瘍周囲のIL-17の発現および血清中IL17の濃度が有意に高値であり、IL17の発現が腫瘍の進展に関わっている事が明らかとなった。NLR>4の症例では腫瘍周囲のCD163陽性細胞がNLR<4の症例より多い傾向にあった。高NLRであることは腫瘍周囲の炎症細胞環境、特に腫瘍関連マクロファージとIL-17の影響を受けることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Neutrophil lymphocyte ratio >4 had significant impact on recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. Multivariate analyses showed that NLR >4, tumor size >5cm, the interval between last treatment and liver transplantation <3 months, were significantly associated with recurrence. In cases with NLR >4, peritumor and serum IL17 was significantly elevated, indicating that IL17 had significant impact on tumor progression. Moreover, the number of peritumor CD163 positive cells, indicating macrophage, was increased compared with those with NLR <4. Therefore, high NLR indicates that tumor progression, recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation in this study, was positively influenced by peritumor environment especially tumor associated macrophage and IL17.

研究分野：肝移植

キーワード：肝移植 肝癌 腫瘍関連マクロファージ IL17

1. 研究開始当初の背景

我が国の肝癌（肝細胞癌）による死亡者数は1975年以降急激に増加し、2000年以降は毎年3万人以上が肝癌にて死亡している。欧米諸国では、肝癌に対して肝移植が行われるようになった。ミラノ基準（3cm 3個、5cm 1個、N Engl J Med 1996）の導入は、肝癌に対する肝移植成績を飛躍的に向上させる結果となった。我々は、肝癌の腫瘍マーカーであるPIVKAI（Protein induced by Vitamin K absence）に注目し、九大基準（5cm以上かつPIVKAI>300mmAU/mLを除外）を初めて提唱、ミラノ基準外でも移植後を行い、移植後肝癌再発を免れる症例を報告してきた。しかしながら、腫瘍径・個数に腫瘍マーカーを組み合わせただけでは、いまだ適応基準内でも再発、あるいは基準外でも再発しない症例などが存在する。肝癌への肝移植適応基準として、(i)腫瘍径と個数、(ii)腫瘍マーカーに加え、さらに新しい第3のパラメータを加えることが必須である。我々は、好中球/リンパ球比（NLR: Neutrophil-Lymphocyte ratio）に注目した

2005年にWalshらはNLRが大腸癌術後再発の予後因子であることを報告（J Surg Oncol 2005）。その後NLR 5は切除後肝癌（World J Surg 2008）の再発および生存に対して予後不良因子であることが報告された。しかしながら、生体肝移植に於ける検討は今までなされていなかった。

2. 研究の目的

我々は、肝癌に対する生体肝移植症例で同様の検討を行って見た。結果は、上記の報告を再現するものであった。多変量解析で、NLR 5は、ミラノ基準外（Odds比15.0, $p=0.001$ ）、PIVKAI 300（Odds比3.9, $p=0.006$ ）に次ぐ第3の独立予後不良因子（Odds比3.2, $p=0.02$ ）であった。すなわち、NLR 5は肝癌に於ける予後規定因子の一つであり、腫瘍（肝癌）に対する好中球およびリンパ球を介した何らかの炎症反応の違いの結果、肝癌細胞の増殖転移に影響を与えている可能性がある。しかしながら、そのメカニズムに関しては、未だ全く解明されていない。我々は、腫瘍関連好中球、VEGF、そして最近癌進展に重要な役割を果たすとして注目を集めている腫瘍関連マクロファージ（TAM）（Cancer Res 2011）に注目し、NLRが肝移植後肝癌の再発と進展に関与するメカニズムの分子機序解明を行うことを目的として本研究を企画した。

3. 研究の方法

腫瘍関連マクロファージを中心とした好中球、VEGFの役割に注目し、「肝移植後肝癌再発進展に於ける腫瘍関連マクロファージの意義、役割およびその分子機序・シグナル伝達機構の解明」を行うことを目的として本研究を計画した。

高NLRと肝癌再発の間には様々なメカニズムが介在している可能性があり、それらを系統的に検証していくことで、病態の本質に迫る。まず、(1-1) VEGFを介した肝癌細胞と腫瘍浸潤好中球のinteractionについて検討し、同時に(1-2) NLRと病理組織学的所見との関係に関する検討を行う。そして次に、(2-1) 肝癌細胞と好中球の間に介在し、腫瘍の発育と進展に大きく影響を与えている可能性が高い（Cancer Res 2011）腫瘍関連マクロファージ（TAM）を介した細胞増殖シグナルの関与に関する検討と、(2-2) TAMからの信号により活性化するリンパ球（Th17リンパ球およびPD1発現T細胞）の関与に関する検討を行う。最後に(3) TAMを介したシグナルが腫瘍細胞に到達して以降の、細胞内情報伝達システムの分子機序へと展開する予定である。この点に関しては、STAT3系シグナルの関与を想定している。いずれもプレリミナリーな検討は終了しており、研究の目的を達成できる可能性が高いと考えられる。

4. 研究成果

肝細胞癌に対して生体肝移植を施行した症例で検討を行った。NLR（好中球リンパ球比） $NLR>4$ が $p<0.0001$ で最も肝癌再発に強く影響を与えていた。ミラノ基準内（ $n=94$ ）あるいは基準外（ $n=64$ ）のいずれに於いても無再発生存率は $NLR>4$ にて有意差（それぞれ $p=0.0008$ および $p=0.0002$ ）を認めた。また、ミラノ基準内かつ $NLR<4$ では5年生存率100%、ミラノ基準外かつ $NLR>4$ では5年生存率0%であった。さらに、今回は肝移植後肝癌再発における症例で検討を行った。多変量解析では、好中球/リンパ球比（NLR） >4 （ $p=0.03$ ）、組織学的腫瘍径 >5 cm（ $p=0.03$ ）、最終治療から肝移植までの期間 <3 ヶ月（ $p=0.01$ ）が再発危険因子であった。それら再発症例に於いて、再発までおよび再発から死亡までの平均期間はそれぞれ3.7年および1.7年であった。一方、再発後の生存率は、男性（ $p<0.01$ ）、再発時AFP <300 mmAU/ml（ $p<0.01$ ）、好中球/リンパ球比（NLR） <4 （ $p<0.01$ ）、再発病変に対する外科的切除可能である（ $p<0.01$ ）症例にて於いて有意に良好であった。 $NLR>4$ の症例では、腫瘍周囲のIL-17の発現および血清中IL-17の濃度が有意に高値であった。よって腫瘍周囲の環境がIL-17の発現を介して腫瘍の進展に関わっている事が明らかとなった。 $NLR>4$ の症例では腫瘍周囲のCD163陽性細胞が $NLR<4$ の症例より多い傾向にあった。すなわち、高NLRであることは腫瘍周囲の炎症細胞環境、特に腫瘍関連マクロファージとIL-17の影響による腫瘍細胞の活性化を意味するが、VEGFなどの関与の可能性が低いことが明らかとなった。

(1) Th17リンパ球および腫瘍関連マクロファージを介した細胞増殖シグナルの関与に関する検討を行った。我々はIL-17に注目し

た。IL-17 はいわゆる Th17 細胞とよばれる Helper T細胞から産生されるサイトカインである。まず免疫組織染色を行ったところ、IL17は腫瘍内ではNLRの高低で差はなかったが、腫瘍周辺の IL17 は NLR 高値群にて有意に高発現していた。さらに血清中の IL-17 も NLR 高値群にて有意に高値であった。よって腫瘍周囲の環境が IL17 の発現を介して腫瘍の進展に関わっている事が明らかとなった。また、PD-1 の発現に関しては腫瘍内部および腫瘍周囲に於いて NLR と PD-1 および PD-1 ligand の発現で有意差は認めなかった。(2) 血管増殖因子 (VEGF) の関与に関しては、腫瘍内および腫瘍周囲の VEGF と IL-8 の免疫組織染色および定量的 RT-PCR を行った。その結果、蛋白および RNA レベルいずれに於いても血管増殖関連因子 (VEGF、IL-8) は NLR の高低に関わっていなかった。よって腫瘍増生因子や血管増生因子は白血球分科画の構成比率と腫瘍の進展再発の間をつなぐものではないと判断された。

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 12 件)

Takeishi K, Taketomi A, Shirabe K, Toshima T, Motomura T, Ikegami T, Yoshizumi T, Sakane F, Maehara Y. Diacylglycerol kinase alpha enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J Hepatol.* 2012 Jul;57(1):77-83.

Motomura T, Shirabe K, Mano Y, Muto J, Toshima T, Umemoto Y, Fukuhara T, Uchiyama H, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Maehara Y. Neutrophil-lymphocyte ratio reflects hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation via inflammatory microenvironment. *J Hepatol.* 2013 Jan;58(1):58-64.

Ijichi H, Shirabe K, Taketomi A, Yoshizumi T, Ikegami T, Mano Y, Aishima S, Abe K, Honda H, Maehara Y. Clinical usefulness of (18) F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for patients with primary liver cancer with special reference to rare histological types, hepatocellular carcinoma with sarcomatous change and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Hepatol Res.* 2013 May;43(5):481-7.

Yoshizumi T, Ikegami T, Yoshiya S, Motomura T, Mano Y, Muto J, Ikeda T, Soejima Y, Shirabe K, Maehara Y. Impact

of tumor size, number of tumors and neutrophil-to-lymphocyte ratio in liver transplantation for recurrent hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2013 Jul;43(7):709-16.

Harimoto N, Shirabe K, Nakagawara H, Toshima T, Yamashita Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Ikeda T, Maehara Y. Prognostic factors affecting survival at recurrence of hepatocellular carcinoma after living-donor liver transplantation: with special reference to neutrophil/lymphocyte ratio. *Transplantation.* 2013 Dec 15;96(11):1008-12.

Yoshizumi T, Ikegami T, Toshima T, Harimoto N, Uchiyama H, Soejima Y, Yamashita Y, Shirabe K, Maehara Y. Two-step selection criteria for living donor liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Transplant Proc.* 2013 Nov;45(9):3310-3.

Shirabe K, Toshima T, Kimura K, Yamashita Y, Ikeda T, Ikegami T, Yoshizumi T, Abe K, Aishima S, Maehara Y. New scoring system for prediction of microvascular invasion in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2014 Jul;34(6):937-41.

Ikegami T, Bekki Y, Imai D, Yoshizumi T, Ninomiya M, Hayashi H, Yamashita Y, Uchiyama H, Shirabe K, Maehara Y. Clinical outcomes of living donor liver transplantation for patients 65 years old or older with preserved performance status. *Liver Transpl.* 2014 Apr;20(4):408-15.

Iguchi T, Shirabe K, Aishima S, Wang H, Fujita N, Ninomiya M, Yamashita Y, Ikegami T, Uchiyama H, Yoshizumi T, Oda Y, Maehara Y. New Pathologic Stratification of Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma: Predicting Prognosis After Living-Donor Liver Transplantation. *Transplantation.* 2014 Nov 25. [Epub ahead of print]

Ninomiya M, Shirabe K, Facciuto ME, Schwartz ME, Florman SS, Yoshizumi T, Harimoto N, Ikegami T, Uchiyama H, Maehara Y. Comparative study of living and deceased donor liver transplantation as a treatment for hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg.* 2015

Mar;220(3):297-304.e3.

Yamashita YI, Yoshida Y, Kurihara T, Itoh S, Harimoto N, Ikegami T, Yoshizumi T, Uchiyama H, Shirabe K, Maehara Y. Surgical results for recurrent hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy: Repeat hepatectomy versus salvage living donor liver transplantation. Liver Transpl. 2015 Mar 13. doi: 10.1002/lt.24111. [Epub ahead of print]

Harimoto N, Yoshida Y, Kurihara T, Takeishi K, Itoh S, Harada N, Tsujita E, Yamashita YI, Uchiyama H, Soejima Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Kawanaka H, Ikeda T, Shirabe K, Saeki H, Oki E, Kimura Y, Maehara Y. Prognostic Impact of Des- -carboxyl Prothrombin in Living-Donor Liver Transplantation for Recurrent Hepatocellular Carcinoma. Transplant Proc. 2015 Apr;47(3):703-4.

〔学会発表〕(計 2件)

生体肝移植術後の肝細胞癌再発における好中球リンパ球比の意義

本村 貴志, 池上 徹,

第 112 回日本外科学会学術集会

2012 年 4 月 12 日 (木) ~ 14 日 (土)

千葉

生体肝移植後肝細胞癌再発に於ける外科的切除の有効性

池上 徹, 調 憲

第 50 回日本癌治療学会学術集会

2012 年 10 月 25 日 (木) ~ 27 日 (土)

横浜

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池上 徹 (九州大学・大学病院・助教)

研究者番号 : 80432938

(2) 研究分担者

調 憲 (九州大学・医学研究科・准教授)

研究者番号 : 70264025

吉住 朋晴 (九州大学・大学病院・講師)

研究者番号 : 80363373

(3) 連携研究者

該当なし