

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462082

研究課題名(和文)画像情報解析による肝癌バイオマーカーの検索と肝機能評価方法の確立

研究課題名(英文)Exploratory analysis for imaging biomarkers of hepatocellular carcinoma

研究代表者

伴 大輔 (Ban, Daisuke)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：40376736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：EOB-MRIで得られた画像所見と臨床病理学的特徴を解析した。肝細胞相で腫瘍内部の信号強度によって高い症例は全体の比較的予後良好で、低い症例は不良であることが明らかとなった。網羅的遺伝子発現解析では信号が高い症例でSLC01B3が高発現していた。EOB-MRI肝細胞造影相の肝細胞癌の信号強度と悪性度は相関する可能性があり、予後予測の一助になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：On Gd-EOB-DTPA, although hepatocellular carcinoma (HCC) is typically lower intensity lesion in the hepatobiliary phase, cases of highly enhanced HCC (High-HCC) have been reported. This study aimed to reveal the clinicopathological and biological properties of the High-HCC. Patients who underwent curative hepatectomy as the first treatment for HCC were included. We retrospectively performed clinicopathological and global gene expression analyses. Serum PIVKA-II levels in the High-HCC were lower, and the High-HCC were well-differentiated. Disease-free survival was prolonged in the High-HCC. Global gene expression analysis revealed the upregulated genes included those mediating normal hepatic metabolism. In addition, SLC01B3 was upregulated in the High-HCC. This was validated by immunohistochemical analysis. We revealed HCC characteristics of hyperintensity in the hepatobiliary phase of EOB-MRI and a relatively low malignant potential.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：肝細胞癌 EOB-MRI SLC01B3 OATP1B3

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は世界で6番目多く、死亡率は第3位と言われる。癌の悪性度を正しく評価し、より効果的な治療方針を定める必要がある。その評価法としてEOBMRIは肝細胞癌の診断に有用で近年注目されている。

Gd-EOB-DTPAは静脈投与後、一定時間経過後に肝細胞に特異的に取り込まれ胆汁排泄される。その際に肝細胞造影相として撮像することで、肝臓内の占拠性病変や瀰漫性肝疾患の診断能が向上した。

肝細胞癌は典型的にEOBMRI肝細胞造影相で低信号域として描出される。しかし6-15%に等～高信号の肝細胞癌を認める。Gd-EOB-DTPAの癌細胞への取り込みや排出に関わるtransporterの発現の違いにより信号強度に変化が見られると考えられている。このように高信号となる肝細胞癌について幾つか報告があるが、網羅的遺伝子解析を行った報告はない。

2. 研究の目的

我々がこれまで行ってきた画像情報から肝細胞癌悪性度診断と分子生物学的背景を解析する研究をさらに前進させる形で、術中超音波画像、EOB-MRIから得られる画像情報を解析して有用な評価方法を確立する。そして、再発・予後に関するバイオマーカーの開発、分子標的治療薬など治療開発へ応用することを目指す。さらに、超音波画像、EOB-MRI画像から肝機能評価方法を確立し、既存の指標に加えて新たな評価軸を呈示する。

3. 研究の方法

EOBMRIは同じprotocolで術前平均30.1日前に施行した。肝細胞造影相はGd-EOB-DTPAを静注20分後撮像した。すべての画像は少なくとも2人以上の放射線科医が診断し肝細胞癌と診断した。肝細胞造影相で高信号となる肝細胞癌(HighHCC)を背景肝と比較し高信号の腫瘍と定義した。信号値の測定はThe Centricity Enterprise™ Web version (GE Healthcare Pty Ltd., Piscataway, NJ) picture archiving and communication system.を用いた。

まず腫瘍が最大径となる高さの画面において背景肝と腫瘍内部の信号値を測定した。背景肝は脈管を避けた径1cmの範囲の信号値を測定し腫瘍内部の信号値の背景肝に対する信号値の比を計測した。その比率が1以上であればHigh-HCCと定義し、1未満であればLow-HCCと定義した。このカットオフ値はこれまでの報告を参考にした。この画像解析は3人の肝臓専門家が個別に評価した。

臨床病理学的解析

HighHCCとLowHCCは採血data、ChildPughScore、病理組織型、分化度、脈管侵襲、TNM分類を比較した。予後解析は手術日を基準として無再発生存率と生存率を比

較した。術後検査は毎月の腫瘍マーカーの測定と3ヵ月後とのCT検査とEOBMRIを行った。

遺伝子解析

肝細胞癌の癌組織からRNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いてTotalRNAを抽出した。RNAのRINは5以上とした。the 3' IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA)を用い100ngのTotalRNAからcRNAを合成し、HG133 Plus2.0 arrays(Affymetrix)を用いてHybridizationとsignal detectionを行った。計18個のmicroarrayのdataはR statistical software version 2.12.0 (R Development Core Team, 2010)のthe robust multi-array average methodを用いて解析した。microarray dataからHighHCCとLowHCCで遺伝子発現が有意に異なるprobe setを抽出した。

遺伝子発現機能解析

HighHCCに発現亢進していた遺伝子群からHighHCCで亢進している生物学的な機能をDAVID Bioinformatics Resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)を用いて解析した。遺伝子群はthe Gene Ontology terms (GOTERM_BP_FAT)とthe KEGG pathway database (KEGG_PATHWAY)を用いた。

免疫組織学的解析

SLC01B3 (OATP2/8) (1:500; Cell Signaling Technology; Beverly, MA)を用いて免疫染色を行った。免疫染色の評価は400倍で無作為に観察した3か所から2人の観測者で行った。SLC01B3陽性細胞の数を測定し0-1%を(-)、1-10%を(±)10%以上を(+)とした。陽性細胞の評価はcellSens Digital Imaging Software (Olympus, Tokyo, Japan).を用いた。

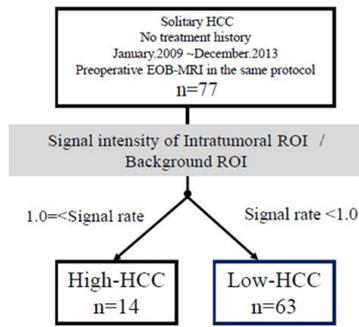
統計解析

統計解析はSPSS v. 21 (SPSS Inc., Chicago, IL)を解析softとして用いた。dataは平均±標準偏差で表記した。dataは正規分布ではなかったためThe Mann-Whitney U testで解析。予後解析はKaplan-Meier analysisを用いた。P値0.05以下を有意差とした。

4. 研究成果

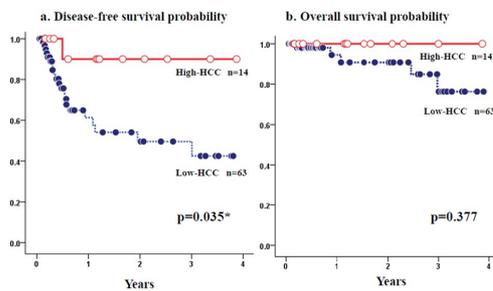
77人の対象のうちHighHCCは14人、63人がLowHCCであった(Figure1)。この2群間の臨床病理学的解析結果はtable1に示した。Clinicalfeature、年齢性別、肝機能に関連する採血data、背景肝疾患は有意な差を認めなかった。AFPは2群間で有意な差は認めなかったが、PIVKA-IIはHighHCCが有意に低値を示していた。病理学的評価ではHighHCCがLowHCCと比較して高率に高分化肝細胞癌が多いということが解った。また有意差はなかったが脈管浸潤がHighHCCは脈管侵襲が14%であるのに対し、LowHCCは29%であった。

Figure 1. Flow chart of the 77 patients according to the imaging patterns in the hepatobiliary phase of EOB-MRI



予後の検討は2群間の経過観察期間は平均で782.3日であった。HighHCCの平均観察期間は508.8日でLowHCCの平均観察期間は466日で有意差は認めなかった。この観察期間でHighHCCは死亡がなく、全員が無再発生存状態であった。一方で両群の3年間生存率はHighHCCとLowHCCがそれぞれ90%と43%で無再発生存率はHighHCCの方が有意に良かった。(P=0.035)(Figure2)

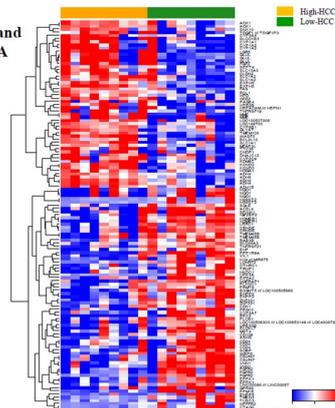
Figure 2. Disease-free survival and overall survival of patients with HCC according to the imaging patterns in the hepatobiliary phase of EOB-MRI



HighHCC と LowHCC の遺伝子発現解析

Gd-EOB-DTPA の取り込みに関連する肝細胞癌の遺伝子についてDNAmicroarrayを行ったところ、53個の発現亢進した遺伝子 probe set と発現抑制された71個遺伝子 probe set を特定した (Figure3)。

Figure 3. Gene expression profiling and patterns of Gd-EOB-DTPA uptake in HCC.



ADH1B, 4, 6 や CYP450family など肝代謝に関する遺伝子が HighHCC で有意に発現亢進していた。興味深い結果として SLC01B3 などの胆汁酸や bilirubin 輸送に重要な役割を果たす膜蛋白に関連する遺伝子発現も発現亢進

していた。一方 CDK1, MST4, ASNS, CD24 などの apoptosis 関連遺伝子は HighHCC において発現抑制があった。

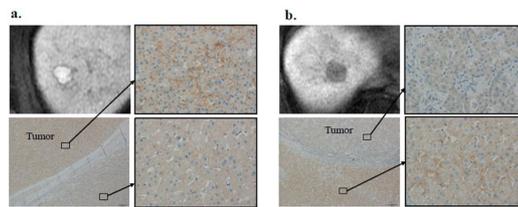
EOB 取り込みに関連する遺伝子機能解析

HighHCC と LowHCC で有意に異なる遺伝子機能解析を行った。DAVID を用いて機能解析を行ったところ、酸化還元、薬剤代謝、ethanol 分解など、いくつか肝代謝経路に関連する遺伝子が HighHCC に発現亢進があった。この結果は Gene Ontology terms と KEGG pathway database の両方の解析で矛盾が無かった。さらに、organic anion transport and acidic amino acid transport などの anion transport 活性に関する遺伝子群の発現が亢進していた。

免疫組織学的解析

遺伝子解析の検証実験とし免疫組織学的解析を行った。SLC01B3 は organic anion transporter family の肝臓特有の protein のうちの一つであり、Gd-EOB-DTPA の取り込みに関連が強い可能性があるため SLC01B3 について解析を行った。HighHCC の 14 症例のうちすべてが強陽性であった。LowHCC も 2 例は陽性であったが、他のすべての蛋白発現は陽性-陰性であった。SLC01B3 の蛋白発現は有意に HighHCC に亢進していた (figure4)。

Figure 4. Immunohistochemical analysis of SLC01B3



	High-HCC (n=14)	Low-HCC (n=63)	p value
SLC01B3 positive cells rate	43 ± 24 %	1.0 ± 2.1 %	<0.0001
SLC01B3			<0.0001
(-)	< 1%	0	47
(+)	≥ 1%, < 10%	0	14
(++)	≥ 10%	14	2

以上の結果を American Journal of Surgery に投稿し掲載された。

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 11 件 全て査読あり)

Miura T, Ban D, Tanaka S, Mogushi K, Kudo A, Matsumura S, Mitsunori Y, Ochiai T, Tanaka H, Tanabe M. Distinct clinicopathological phenotype of hepatocellular carcinoma with ethoxybenzyl-magnetic resonance imaging hyperintensity: association with gene expression signature. Am J Surg. 2015 Sep;210:561-9. doi: 10.1016/j.amjsurg.2015.03.027. Ban D, Kudo A, Irie T, Ochiai T, Aihara

A, Matusmura S, Tanaka S, Tanabe M. Advances in reduced port laparoscopic liver resection. Asian Journal of Endoscopic Surgery. 2015;8:11-15 doi: 10.1111/ases.12164.

Matsunaga H, Tanaka S, Aihara A, Ogawa K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Ariei S, Tanabe M. A Novel Therapeutic Combination Sequentially Targeting Aurora B and Bcl-xL in Hepatocellular Carcinoma. Ann Surg Oncol. 2015 Sep;22(9):3079-86 doi: 10.1245/s10434-014-4292-3.

Nakao K, Tanaka S, Miura T, Sato K, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Ariei S, Tanabe M. A novel Aurora/VEGFR dual kinase inhibitor as treatment for hepatocellular carcinoma. Cancer Science, 2015;106(8):1016-22. doi: 10.1111/cas.12701.

Ban D, Kudo A, Ito H, Mitsunori Y, Matsumura S, Aihara A, Ochiai T, Tanaka S, Tanabe M, Itano O, Kaneko H, Wakabayashi G. The difficulty of laparoscopic liver resection. Updates Surg. 2015 Jun;67:123-8. doi: 10.1007/s13304-015-0302-7.

Ban D, Tanabe M, Ito H, Otsuka Y, Nitta H, Abe Y, Hasegawa Y, Katagiri T, Takagi C, Itano O, Kaneko H, Wakabayashi G. A novel difficulty scoring system for laparoscopic liver resection. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014 Oct;21(10):745-53. doi: 10.1002/jhbp.166.

Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Tanabe M, Ariei S. Age-related clinicopathologic and molecular features of patients receiving curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. Am J Surg. 2014;208(3):450-6. doi: 10.1016/j.amjsurg.2014.01.015.

Kudo A, Matsumura S, Ban D, Irie T, Ochiai T, Tanaka S, Ariei S, Tanabe M. Does the preoperative alpha-fetoprotein predict the recurrence and mortality after hepatectomy for hepatocellular carcinoma without macrovascular invasion in patients with normal liver function? Hepatol Res. 2014 Apr 2 doi: 10.1111/hepr.12335.

Ogawa K, Tanaka S, Matsumura S, Murakata A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanabe M, Ariei S. EpCAM-targeted therapy for human

hepatocellular carcinoma. Ann Surg Oncol. 2014;21(4):1314-22. doi: 10.1245/s10434-013-3430-7.

Miura T, Ban D, Koyama T, Kudo A, Ochiai T, Irie T, Nakamura N, Tanaka S, Ariei S. Severe postoperative hemorrhage caused by antibody-mediated coagulation factor deficiencies: report of two cases. Surg Today. 2014 May;44(5):976-81. doi: 10.1007/s00595-013-0584-7.

Kudo A, Tanaka S, Ban D, Matsumura S, Irie T, Ochiai T, Nakamura N, Ariei S, Tanabe M. Alcohol consumption and recurrence of non-B or non-C hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a propensity score analysis. J Gastroenterol. 2014; 49: 1352-61 doi: 10.1007/s00535-013-0899-6.

〔学会発表〕(計 35 件)

1. 伴大輔 腹腔鏡下膵体尾部切除術後膵液漏予防のための工夫 第7回膵臓内視鏡外科研究会 2015.12.13 京都
2. 伴大輔 Difficulty scoring systemに応じた腹腔鏡下肝部分切除のパターン化と新規デバイスの工夫 第28回日本内視鏡外科学会総会 2015.12.12 大阪
3. 伴大輔 腹腔鏡下肝切除の難易度スコアリングを用いたステップアッププログラム 第77回日本臨床外科学会総会 2015.11.27 福岡
4. 伴大輔 定型的な腹腔鏡下肝切除のための手技と工夫 第77回日本臨床外科学会総会 2015.11.26 福岡
5. 伴大輔 Difficulty scoring systemから見た単一術者の経時的ステップアップの検討 第9回日本肝臓内視鏡外科研究会 2015.11.25 福岡
6. 伴大輔 膵頭十二指腸切除から見た膵鉤部周囲化の解剖 第19回臨床解剖研究会 2015.11.14 東京
7. Ban D Surgical anatomy around the pancreatic uncus for pancreatoduodenectomy 3rd International Conference of Federation of Asian Clinical Oncology(FACO) 2015.10.30 Kyoto
8. 伴大輔 膵頭十二指腸切除のための膵鉤部解剖 第23回日本消化器関連学会週間 2015.10.10 東京
9. 伴大輔 膵体尾部切除術後の膵断端に対する組織接着剤と被覆材を用いた膵液漏予防 第42回日本膵切研究会 2015.8.28 大阪
10. 伴大輔 肝胆膵領域における Reduced Port Surgery 4th Reduced Port Surgery Forum 2015.8.1 秋田

11. 伴大輔 画像の腫瘍形態を考慮した肝細胞癌の治療選択 第 51 回日本肝臓研究会 2015.7.23 神戸
 12. 伴大輔 Resection of Mesopancreatoduodenum -Left approach 第 70 回日本消化器外科学会総会 2015.7.16 東京
 13. 伴大輔 A novel difficulty scoring system for laparoscopic liver resection 第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2015.6.13 東京
 14. 伴大輔 Reduced port technique in liver and pancreas surgery 第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2015.6.13 東京
 15. 伴大輔 膵頭十二指腸切除における SMA 左側アプローチの効率的な郭清方法に対する考察 第 69 回手術手技研究会 2015.5.15 高崎
 16. 伴大輔 肝胆膵領域における Reduced port surgery. 第 76 回日本臨床外科学会 2014.11.20 郡山
 17. 伴大輔 Treitz 靱帯を意識した Total Mesopancreas Exclusion. 第 76 回日本臨床外科学会 2014.11.20 郡山
 18. 伴大輔 内視鏡下肝切除の難易度スコアリングシステムの提唱. 第 8 回 肝臓内視鏡外科研究会 2014.11.19 郡山
 19. 伴大輔 Mesopancreas をめぐる膵鉤部解剖. 第 18 回臨床解剖研究会 2014.11.08 東京
 20. 大庭篤志 腹腔鏡下肝切除のデバイスとテクニックの進歩：安全性への寄与. 第 8 回肝臓内視鏡外科研究会 2014.11.19 郡山
 21. Ban D Efficacy of the bioabsorbable sheet wrapping with fibrin-glue for the pancreatic stump after distal pancreatectomy. The 6th Scientific Meeting of Japan-Hungary-Poland Surgical Society 2014.10.17 Tokyo
 22. 大庭篤志 膵体尾部切除術の Reduced Port Surgery. 第 27 回日本内視鏡外科学会総会 2014.10.03 盛岡
 23. 伴大輔 腹腔鏡下肝切除における Reduced port surgery の意義. 第 27 回日本内視鏡外科学会総会 2014.10.02 盛岡
 24. 伴大輔 ドラムスティック鉗子を用いた腹腔鏡下膵体尾部切除術. 第 8 回日本膵臓内視鏡外科研究会 2014.10.01 盛岡
 25. Ban D Anatomy of Mesopancreas The Korea-Japan Pancreato-Biliary Collaborative Multicenter Symposium 2014.8.29 Seoul
 26. 伴大輔 腹腔鏡下膵体尾部切除術の reduced port surgery. 第 41 回日本膵切研究会 2014.08.22 東京
 27. 伴大輔 単孔式肝外側区域切除の定型化. 第 8 回単孔式内視鏡手術研究会 2014.08.01 福井
 28. 伴大輔 腹腔鏡下肝胆膵外科領域手術における体内組み立て型ニードルデバイス (Drum-stick 法) の有用性. 第 69 回日本消化器外科学会総会 2014.07.18 郡山
 29. 大庭篤志 IPMN の手術適応と術式選択の検討. 第 69 回日本消化器外科学会総会 2014.07.18
 30. 三浦智也、伴大輔 肝細胞癌における EOBMRI のイメージバイオマーカーとしての有用性の検討 第 69 回日本消化器外科学会総会 2014.7.16 郡山
 31. 大庭篤志 病理学的グルカゴン産生膵神経内分泌腫瘍の検討. 第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2014.06.13 和歌山
 32. 伴大輔 新規開発した体内組立型ニードルデバイスの肝胆膵腹腔鏡下手術における有用性. 第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2014.06.12 和歌山
 33. 伴大輔 Propensity score 解析を用いた肝細胞癌に対する腹腔鏡手術の検討. 第 50 回肝臓研究会 2014.06.05 京都
 34. 伴大輔 膵頭十二指腸切除における Treitz 靱帯アプローチの提唱. 第 68 回手術手技研究会 2014.05.16 東京
 35. 三浦智也、伴大輔 EOB-MRI 肝細胞相画像所見を用いた肝細胞癌の術前悪性度予測と分子メカニズムの解明 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014.4.3 日 京都
- 〔図書〕(計 0 件)
なし
〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
なし
- 取得状況 (計 件)
- 〔その他〕
ホームページ等
6. 研究組織
(1) 研究代表者
伴大輔 (BAN, Daisuke)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：40376736
- (2) 研究分担者
田中 真二 (TANAKA, Shinji)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：30253420
- 田邊 稔 (TANABE, Minoru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：50197513

三浦 智也 (MIURA, Tomoya)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・医員
研究者番号：30618111
異動のため平成 26 年 6 月 1 日に削除

大庭 篤志 (OBA, Atsushi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・医員
研究者番号：70740257
平成 26 年 6 月 1 日 追加