

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08990

研究課題名(和文) 肝前駆細胞マーカー陽性肝細胞癌の生物学的悪性度を規定する因子の解明

研究課題名(英文) Analysis of the factors of malignant behavior in hepatic progenitor cell marker expressing hepatocellular carcinoma

研究代表者

土屋 淳紀(Tsuchiya, Atsunori)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：70464005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は肝細胞癌251症例を4種の肝前駆細胞マーカーの発現や臨床所見、腫瘍マーカー等から解析し、手術後の予後に及ぼす影響や肝前駆細胞マーカーの発現意義を見たものです。結果EpCAMの発現、DCP>300 mAU/ml、年齢>60、肝機能の指標であるChild-Pugh score grade BまたはCが、肝細胞癌術後の独立した予後予測因子とわかりました。更に4種類の肝前駆細胞マーカーのうち、2種類以上を同時に発現する肝細胞癌患者は、術後の予後が特に不良で肝前駆細胞マーカーの発現頻度は腫瘍マーカーのAFP、AFP-L3のレベル、血管の浸潤の頻度、癌細胞の悪性度と相関を認めました。

研究成果の概要(英文)：In this study we analyzed the expression of four hepatic progenitor cell markers in 251 hepatocellular carcinomas (HCCs) with their clinical data and tumor markers, and significance of the hepatic progenitor markers in HCC for prognosis. We elucidated that EpCAM expression, DCP>300 mAU/ml, age > 60, Child-Pugh score grade B or C were independent prognostic factors of poor outcome and were used in a new scoring system for HCC prognosis after operation. Expression of two or more HPC markers was a significant predictor of poor HCC outcome and co-related with AFP and AFP-L3 levels, blood vessel invasion and differentiation of the tumor.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝細胞癌 肝前駆細胞 EpCAM NCAM CK19 DLK1

1. 研究開始当初の背景

肝癌は、癌による死亡者数では世界で2番目に多い癌種で、その90%は原発性の肝細胞がんからなり、C型肝炎ウイルスやB型肝炎ウイルスの感染、アルコールの過剰摂取、非アルコール性脂肪性肝炎など、様々な背景によって多段階に癌の発生と進行が進む難治性のがんです。肝細胞癌は組織学的に非常に不均一な癌細胞集団から構成されており、そのことが肝細胞がんの治療における患者の層別化を困難なものにしており、腫瘍細胞の挙動や予後因子など包括的な肝細胞がんのバイオマーカーの確立が必要とされています。

2. 研究の目的

肝細胞癌は前述のとおり、一例一例、そして同一人物の癌の一部であってもその部位ごとに性質が異なる性質があります。このように多様性を持つ癌を以下に効率よく理解していくことを考えたときに、発現すると予後が悪くなると考えられている4種類の肝前駆細胞マーカー(EpCAM, NCAM, DLK-1, CK19)に着目し、それぞれの発現頻度、臨床的特徴、血清腫瘍マーカーとの関係など今まで明らかになっていない肝細胞癌の多様性を明らかにすることによって、将来の個別化医療へ向けての礎が作れることを目的としました。

3. 研究の方法

本研究は、2008年から2014年の間に新潟大学医歯学総合病院(160症例)と新潟県立中央病院(91症例)において、肝細胞がんの患者から手術によって摘出された肝細胞癌病理検体251症例について、発現すると臨床的予後不良になると考えられている4種類の肝前駆細胞マーカー(EpCAM, NCAM, DLK-1, CK19)の発現プロファイルを免疫組織染色により解析し、患者の臨床病理学的な特徴、癌悪性度、および血清腫瘍マーカー(AFP^{*1}, AFP-L3^{*2}, DCP^{*3})および手術後の患者予後との相関についてレトロスペクティブに解析し、肝前駆細胞マーカーの高度にヘテロな細胞集団からなる肝細胞癌において、個別化医療にむけた診断、治療標的分子としての可能性を評価したものです。

*1 AFP (α-fetoprotein)

肝細胞癌の代表的な腫瘍マーカーの1つ。肝炎や肝硬変でも上昇する場合がある。

*2 AFP-L3 (lectin-reactive α-fetoprotein)

AFPのうち、癌化にともない変化した糖鎖構造をもつ分画(L3分画)で、レクチンとの結合性を利用して検出することができる

*3 DCP (des-γ-carboxy prothrombin)

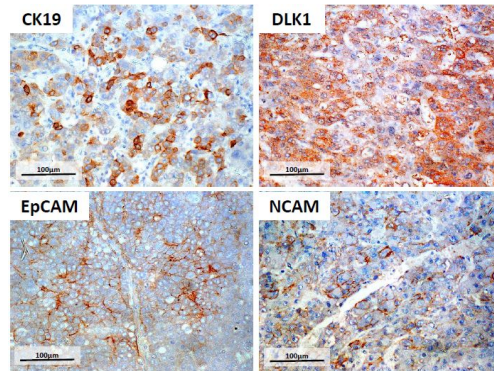
肝細胞癌の腫瘍マーカーの1つで、別名PIVKaII(protein induced by vitamin-K absence II)とも呼ばれビタミンK欠乏で産

生される異常プロトロンビンである。

4. 研究成果

(1) 肝細胞癌症例のおよそ10%程度にそれぞれの肝前駆細胞マーカーが発現している。

はじめに、我々は免疫染色にて、肝細胞癌中に肝前駆細胞マーカーEpCAM, NCAM, DLK-1, CK19がそれぞれどのくらいの頻度で発現しているかを確認した。その結果、EpCAM, NCAM, DLK-1, CK19の発現頻度はそれぞれ、14.3%, 7.1%, 18.3%, 8.0%であった。(図1)



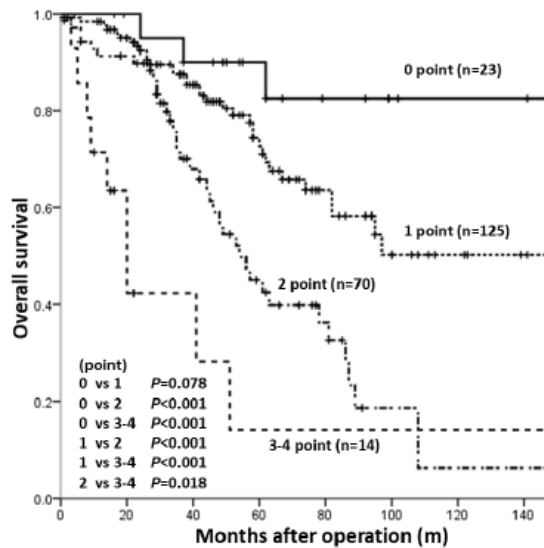
(図1)それぞれの肝幹細胞マーカーの肝細胞癌での発現

(2) 肝前駆細胞マーカー陽性の肝細胞癌はAFPやAFP-L3の上昇が見られているものが多く血管浸潤を伴うものも多かった。

次に、肝前駆細胞マーカーと腫瘍の分化度、腫瘍マーカーAFP, AFP-L3, DCPとの関係、血管浸潤の有無、リンパ節への転移、腫瘍のサイズ、腫瘍のステージなどの臨床的な情報との関連を見ていった。そうしたところ肝前駆細胞マーカー陽性の肝細胞癌はAFPやAFP-L3の上昇が見られているものが多く血管浸潤を伴うものも多かった。

(3) EpCAMの発現、DCP>300 mAU/ml, 年齢>60, Child-PughスコアのグレードBまたはCが肝細胞がん患者の独立した予後予測因子である。

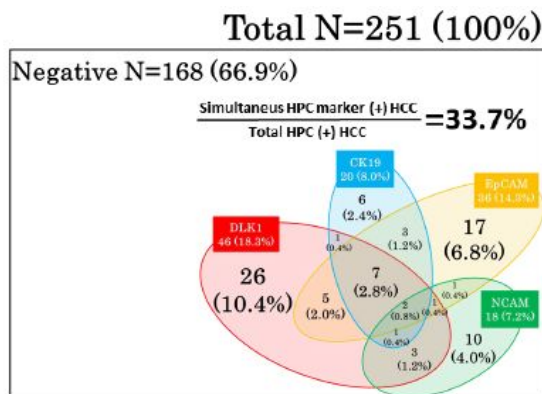
我々は更に、どのようなパラメーターを用いると手術後患者の予後を明確に予測できるのかを解析していった。単変量解析の後、多変量解析を行って解析を行ったところ、EpCAMの発現、DCP>300 mAU/ml, 年齢>60, Child-PughスコアのグレードBまたはCが肝細胞がん患者の独立した予後予測因子であることが判明した。これら4つのパラメーターをそれぞれ1点ずつ分配し症例ごとに点数をつけそれぞれの予後 Kaplan-Meier 曲線を書き解析を行って行ったところ点数が悪いものほど予後が悪くなることが明確に示された。(図2)



(図 2) EpCAM、DCP、年齢、Child-Pugh スコアの 4 つの指標から予測される術後の予後。

(4) 肝前駆細胞マーカーの重なりを意識した解析をすることで、2 つ以上の肝前駆細胞マーカーの発現する肝細胞癌は予後が悪いことがわかった。

私たちは症例ごとの重なり合いを Venn 図を作成して見ていくこととした。Venn 図(図 3)を作成したところ、多数の症例で二つ以上の肝前駆細胞マーカーを持つことがわかった。そこで今後は重なりを意識した解析を行っていった。そうしたところ、2 つ以上の重なりをもつ肝細胞癌は特に予後が悪いことがわかった。(図 4)

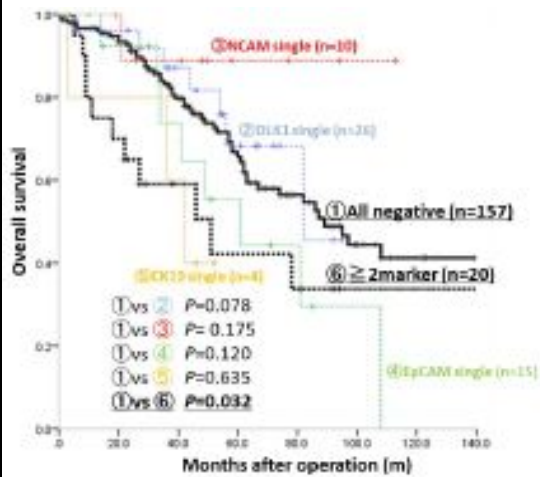


(図 3) Venn 図

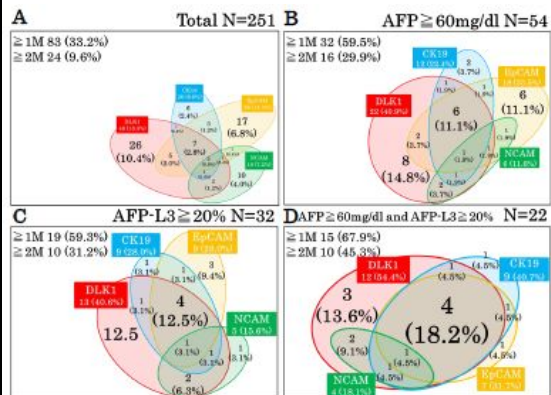
(5) 肝前駆細胞の発現の予測は、AFP、AFP-L3 で高率にしばり込める。

また、我々は肝前駆細胞マーカー陽性の肝細胞癌の発現が腫瘍マーカーでしばり込めるかを検討を行った。様々な検討を行ったが腫瘍マーカーの AFP および AFP-L3 を用いて解析を行うことで効率よく肝前駆細胞マーカー陽性肝細胞癌をしばり込めることがわかった。(図 5) 以上の結果は今後それぞれの

肝前駆細胞マーカーをターゲットとした新薬が開発された際に、腫瘍マーカーの AFP および AFP-L3 を用いて解析を行うことである程度症例をしばり込めることを意味している。



(図 4) マーカーの重なり合いを意識した予後解析。二つ以上の肝前駆細胞マーカーの重なりがあるものほど予後が悪い。



(図 5) AFP、AFP-L3 を用いた肝前駆細胞マーカー陽性肝細胞癌の絞込み

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 1 件)

Seino S, Tsuchiya A, Watanabe Y, Kawata Y, Kojima Y, Ikarashi S, Yanai H, Nakamura K, Kumaki D, Hirano M, Funakoshi K, Aono T, Sakai T, Sakata J, Takamura M, Kawai H, Yamagiwa S, Wakai T, Terai S. Clinical outcome of hepatocellular carcinoma can be predicted by the expression of hepatic progenitor cell markers and serum tumour markers. *Oncotarget*. 2018 Apr 24;9(31):21844-21860. 査読有

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.25074>

〔学会発表〕(計 3 件)

Tsuchiya A et al. Analysis of prognostic significance of hepatic progenitor cell marker positive hepatocellular carcinoma. JDDW Japan (インターナショナルシンポジウム) 2015

Tsuchiya A et al. Significance of hepatic progenitor cell marker positive hepatocellular carcinoma and its possible prediction by AFP-L3. AASLD 2016

清野智、土屋淳紀 肝前駆細胞マーカー陽性肝細胞癌の臨床的特徴と AFP-L3 分画を用いた拾い上げの可能性の検討。第 53 回日本肝臓学会総会 2017.

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/in3/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

土屋 淳紀 (TSUCHIYA Atsunori)
新潟大学医歯学総合病院・消化器内科・助教
研究者番号：70464005

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者

寺井 崇二 (TERAI Shuji)
新潟大学大学院医歯学総合研究科・消化器内科・教授
研究者番号：00332809

(4)研究協力者

小島 雄一 (KOJIMA Yuichi)
清野 智 (SEINO Satoshi)