

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07052

研究課題名(和文)肝類洞様血管構造解析による肝細胞癌に対する肝移植後再発機序の解明

研究課題名(英文)Hepatocellular carcinoma with vessels that encapsulated tumor clusters is associated with poor prognosis and recurrence after living donor liver transplantation.

研究代表者

原田 昇 (HARADA, Noboru)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：80419580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓に対する生体肝移植後1.VETC(+, 17例)とVETC(-, 95例)では、腫瘍径5cm以上($p<0.05$)、低分化度($p<0.05$)、脈管侵襲有り($p<0.01$)、VETC(+)では有意に腫瘍径が大きく、低分化で脈管侵襲があり、病期は進行していた。2.5年無再発生存率、5年全生存率はVETC(+)とVETC(-)ではそれぞれ52.9% vs 85.0% ($p<0.001$)、70.1% vs 91.3% ($p<0.01$)と、VETC(+)群で有意に不良であった。結果としてVETC構造をもつHCCは肝移植術後無再発生存率、全生存率ともに不良であった。

研究成果の概要(英文)：As for the results, there was more tumor aggressive grade such as low differentiation, more than tumor diameter 5cm, and the progressed stage of a disease in VETC(+, 17) group than those of VETC(-, 95) group after a living donor liver transplantation for the hepatocellular carcinoma. Five-year recurrence-free survival (RFS) was significantly better in the VETC(-) than VETC(+) group after living donor liver transplantation (52.9% vs. 85.0%, $p<0.001$). Then, Five-year overall survival (OS) was significantly better in the VETC(-) than VETC(+) group after living donor liver transplantation (70.1% vs. 91.3%, $p<0.01$). Multivariate analysis showed that VETC(+) was an independent predictor of worse RFS. In conclusion, VETC(+) structure was the poorer recurrence factor in hepatocellular patients after living donor liver transplantation.

研究分野：肝臓癌

キーワード：肝細胞癌 生体肝移植 類洞様血管構造 再発

1. 研究開始当初の背景

本邦を含む東アジア地域は肝細胞癌の好発地域として知られている。我が国の肝細胞癌死亡者数は 2000 年代前半を最多として、その後は徐々に減少しつつある。しかし、未だに年間総死亡者数は 3 万人を超えており、疾患対策上極めて重要な疾患と考えられる。成囚として C 型肝炎は減少傾向にあり、脂肪肝を含む非 B 非 C 型が増加傾向にある。肝細胞癌の治療は、肝機能が良好な場合には、標準治療として肝切除術、焼灼術、血管塞栓術さらに多発の肝細胞癌には分子標的薬である Raf キナーゼ活性やチロシンキナーゼ活性を阻害するソラフェニブが治療法として用いられている。しかしながら最近報告された国立がんセンターによる肝細胞癌の 10 年生存率では 15.3%と 5 大がん中最低に位置し、非常に予後不良であり、その腫瘍学的悪性度の解明と治療法の確率が急務であると考えられる。(国立研究開発法人国立がん研究センター 2016 年 1 月発表データより)。日本では肝機能不良な早期肝細胞癌には肝移植術が保険適応とされ、非常に良好な成績を得ることが可能となっている。しかしながら、一方で再発した症例では通常の肝切除後に認める肝内多中心性再発ではなく、遠隔転移を中心とした再発形式を認め、腫瘍進展速度は特に速く、非常に予後が不良となっている。我々はこれまで、生体肝移植において 700 例を超える症例を経験し、肝細胞癌に対する肝移植術を 100 例以上施行してきた国内外で有数の施設となっており、肝移植後の肝癌再発の研究は非常に重要な課題ととらえている。図 1 のように肝細胞癌の再発形式を検討すると、生体肝移植後の再発部位は、通常の肝切除後の再発部位とは全く違う分布を示すと考えられる。通常の肝切除後の再発部位は残肝が 85%と最も多く、肺が 3%、骨が 1%であるが、生体肝移植後の再発部位は多発転移が最も多く、その後、骨が 23%、肺が 20%、肝が 15%と遠隔部での再発が多い傾向がある (Todo et al. *Ann. Surg.* 2004)。そのため、肝移植後転移再発治療を想定して、免疫抑制下における肝移植グラフト機能を障害せずに、腫瘍新生血管を特異的に抑制する新規療法の開発を考え、本研究を着想、創案するに至った。

2. 研究の目的

肝細胞癌は 10 年生存率が非常に低く (15.3%)、5 年再発率も非常に高い (80%)、生物学的悪性度の非常に高い癌である。生物

学的悪性度解明の 1 つの機序として、最近一層の類洞様血管構造で囲まれる特殊な血管パターンが存在する肝細胞癌サブタイプで脈管浸潤が起こりやすく、術後無再生存率が不良であることが報告された。現在肝機能不良な肝細胞癌では肝移植が保険適応され、非常に良好な術後治療成績が得られるが、肝移植後の免疫抑制剤による影響を受け、肝内再発とともに肺、リンパ節、骨及び脳への遠隔転移再発形式をとることが分かっている。肝移植後免疫抑制下での肝細胞癌の転移再発機序を肝細胞癌の解剖学的血管構築を中心に解析し、癌微小血管新生に着目した視点から、転移再発への影響を解明し、既存の治療法とは異なる革新的治療法の開発のために、詳細な検討を行うことである。

3. 研究の方法

(1)これまで当大学にて施行された 1996 年以来、600 例以上の生体肝移植のうちの肝細胞癌症例 100 例以上の症例の肝細胞癌病変を抽出し、類洞様血管構造 (VETC) 発現の有無について検討し、発現率等を数値化する。(Fang JH et al, *Hepatology*, 2015; 62: 452-65)。Human CD34 抗体による染色、Human CD34 と α -SMA (α -smooth muscle actin) による免疫蛍光染色を施行する。可能であれば血管構造の 3 次元構造解析を施行し、比較検討する。現在肝細胞癌では通常の毛細血管 Capillary とは全く異なる構造を腫瘍における構造では VETC は呈しており、CD34 で腫瘍を取り囲むように形成される VETC が指摘される。また Human CD34 と α -SMA の免疫蛍光染色を施行することによって、平滑筋を持った構造として血管様構造として VETC が腫瘍を取り囲む様子が分かる。肝移植後肝細胞癌再発転移病変の臨床検体から CD34 抗体を用いて類洞様血管構造 (VETC) の構築について、免疫化学染色を行い、早期に再発した群と遅発的に再発した群、転移巣及び通常の肝細胞癌再発腫瘍での VETC 構造の相違について詳細に検討する。

(2)VETC の有無と好中球リンパ球比、腫瘍マーカー、病期、全生存期間、無再生存期間、門脈腫瘍栓の臨床背景因子を検討する。

(3)上記標本で Angiopoietin2 (Ang2) 染色し、Image J を用いて Ang2 発現を評価する。

4. 研究成果

<対象>

HCCに対し生体肝移植を施行した179例(1999年-2015年)を検討した。単発49例、多発130例であり、多発例は腫瘍径の大きいものから2個の腫瘍を評価した。

<結果1>

生体肝移植レシピエントの背景因子はVETC陽性者と陰性者において年齢、性別、病因、NLR、MELD値、PIVKA値には有意差はなく、AFP値においてVETC陽性群で高値であった。

結果1

レシピエント因子

因子	VETC(-) n=147	VETC(+) n=32	p値
年齢(歳)	59 (40 - 73)	57 (44 - 72)	0.25
性別 (男/女)	84/63	17/15	0.68
病因 (HBV,HCV,NBNC)	25/102/20	4/25/3	0.78
NLR(≥4)	18 (12.3%)	7 (21.9%)	0.16
MELD値	12.5 ± 4.9	11.8 ± 5.3	0.32
AFP (≥400ng/ml)	14 (9.5%)	12 (37.5%)	<0.01
PIVKA II (≥300mAU/ml)	21 (14.3%)	7 (21.9%)	0.28

NLR; neutrophil-to-lymphocyte ratio
MELD; model for end-stage liver disease

<結果2>

腫瘍因子ではVETC陽性群で腫瘍径が大きく、腫瘍個数が多く、腫瘍分化度が低く、病理学的脈管浸潤が多く、進行度が進んでいるという結果であった。

結果2

レシピエント腫瘍因子

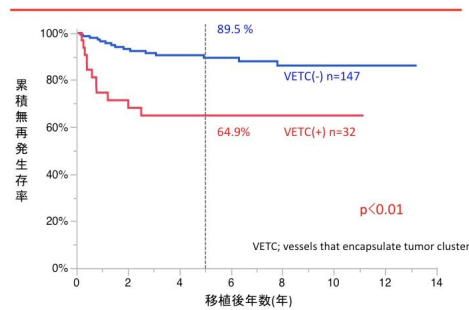
因子	VETC(-) n=147	VETC(+) n=32	p値
最大腫瘍径(cm)	2.2 ± 1.2	3.0 ± 1.7	<0.01
腫瘍数	7 (0 - 185)	19 (1 - 300)	0.01
分化度(高/中/低分化)	15/100/30	1/17/14	0.02
脈管浸潤(+/-)	36/111	18/14	<0.01
p-Stage (I, II, III, IVA)	30/53/43/20	3/5/13/11	<0.01
ミラノ基準内	100 (68.0%)	16 (50.0%)	0.05

<結果3>

無再発生存率(RFS)において、VETC陽性群は有意に不良で、5年無再発生存率は64.9%とVETC(-)の89.5%に比べ不良であった。

結果3

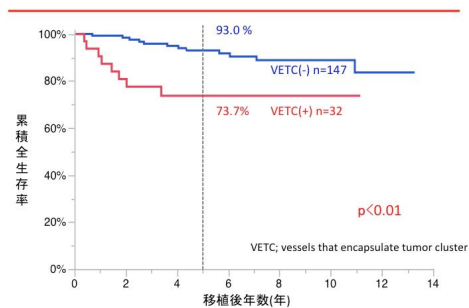
無再発生存率



全生存率においても、VETC陽性群は有意に不良で、5年生存率は73.7%とVETC(-)の93.0%に比べ不良であった。

結果3

全生存率



<結果4>

Coxハザードモデルを用いて肝癌再発のリスク比を検討しましたところ、好中球リンパ球比、AFP、PIVKA、腫瘍径・個数・分化度、脈管浸潤、進行度、VETCが挙げられた。多変量解析では、PIVKAとVETC陽性が独立因子となった。

結果4

再発リスク因子(多変量解析)

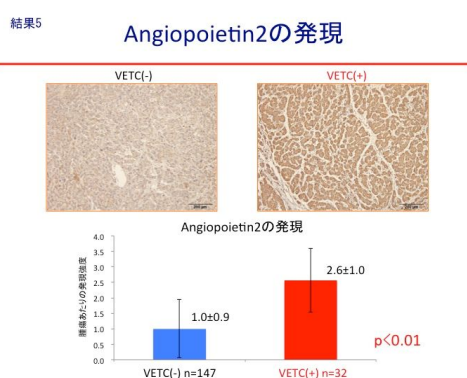
因子	ハザード比	95% CI	p値
PIVKA II (≥300mAU/ml)	4.64	1.51 - 13.9	<0.01
VETC (+)	2.66	1.03 - 6.75	0.04
腫瘍径 (≥5cm)	3.02	0.94 - 10.1	0.06
AFP (≥400ng/ml)	2.12	0.88 - 5.05	0.09
p-Stage (≥III)	2.99	0.80 - 14.3	0.11
分化度(低分化)	2.26	0.80 - 6.48	0.12
NLR (≥4)	2.10	0.80 - 5.24	0.12
脈管浸潤 (+)	0.63	0.21 - 6.48	0.40
腫瘍数 (≥5)	1.24	0.52 - 2.98	0.62

VETC; vessels that encapsulate tumor cluster
NLR; neutrophil-to-lymphocyte ratio

<結果 5>

Ang2 の発現は、ImageJ で定量化を行い、VETC 陽性群で有意に Ang2 の発現が高いことが分かった。

上記の Ang2 は VETC 形成に関与しているが、その機序は解明されていない (Zhou HC, et al. *J Pathol.* 2016; 240: 450-60)。Ang 2 は血管新生において、血管周皮細胞と内皮細胞の接着を阻害し、腫瘍の血行性転移を促進させる (Augustin HG, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10: 165-177.)。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

川崎淳司、原田昇 etc. PM13-7. 第 72 回日本消化器外科学会総会、2017 年 7 月 20-22 日、石川

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 昇 (HARADA, Noboru)

九州大学・医学研究院・准教授