

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15808

研究課題名(和文) 肝臓がんにおける循環腫瘍細胞検出系の確立

研究課題名(英文) Development of circulating tumor cell detection system in hepatocellular carcinoma

研究代表者

大藤 和也 (Ofuji, Kazuya)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：60597699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌は、焼灼術や外科切除などの根治的治療を行った後も高率に再発する予後不良な悪性疾患である。本研究では微小流路デバイスであるマイクロキャピティアレイ(MCA)を用いて、肝細胞癌における新たな循環腫瘍細胞(CTC)検出法の確立とHCC患者におけるCTCの臨床的意義を明らかにすることを目的として検討を行った。

肝細胞癌株を用いた検討により、MCAによるHCCのCTC検出が可能であることを確認した。臨床検体を用いた検討では、肝細胞癌患者ではより多くのCTCが検出され、またCTC陽性例では有意に予後不良であることを見出した。CTC由来の遺伝子発現解析にてHCC患者でalb発現が多く、予後不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発したMCAシステムを用いた検討により、肝細胞癌患者においてCTCが検出されることは、腫瘍の進展、再発リスク評価につながることを示唆された。すなわち、肝細胞癌患者における再発予防や予後延長をめざした医療において、再発危険度の高い患者を適切に絞り込むことが可能であることが示唆された。再発高危険度群の患者を絞り込むことで再発予防を目的としたテーラーメイド医療に応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma is a malignant disease with a poor prognosis that recurs at a high rate even after definitive treatment such as cauterization or surgical resection. In this study, we will establish a new method for detecting circulating tumor cells (CTC) in hepatocellular carcinoma and clarify the clinical significance of CTC in HCC patients using the microcavity array (MCA), which is a microchannel device. It was examined as a purpose. Examination using a hepatocellular carcinoma strain confirmed that CTC detection of HCC by MCA is possible. A study using clinical specimens found that more CTCs were detected in patients with hepatocellular carcinoma and that the prognosis was significantly worse in CTC-positive patients. In the gene expression analysis derived from CTC, alb expression was high in HCC patients, and the prognosis was poor.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞癌 循環腫瘍細胞 マイクロキャピティアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝細胞がんは根治的治療を行っても高率に肝臓内や遠隔臓器に再発、転移する予後不良の悪性疾患であり、現行の画像診断等による方法では、再発、転移リスク評価は困難である。肝がん治療後の再発高危険度群の予測による最適な患者選択は、再発予防を目的とした adjuvant 治療において重要である。

(2) 申請者らは、肝細胞がんの早期診断、再発転移予測についての新たな候補として“liquid biopsy(液体生検)”として注目される血中循環腫瘍細胞(CTC)に着目した。これまで、種々の原理に基づいた CTC 検出系の報告がなされるが、感度や検出システムの煩雑さの観点からは未だ十分に確立されたといえるものはない。肝細胞がんに新たな CTC 検出系開発は新規の再発、転移リスク評価法のバイオマーカーとなる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究では細胞サイズや細胞変形能に基づいた本邦独自の CTC 検出系であるマイクロキャピティアレシシステム(MCA)を用いて(図1)、肝細胞がん CTC 検出系の構築 CTC 細胞特性解明による発がんリスク予測、再発進展に関する候補標的の同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝がん由来培養細胞株 (HuH7、HepG2、PLC/PRF/5)での CTC 回収率を MCA で評価し、肝細胞がんにおいて MCA の CTC 検出システムを構築する。CTC は MCA にて捕捉された細胞について蛍光免疫染色を施行し、DAPI(+)/Cytokeratin(+)/CD45(-) の細胞を CTC とした。

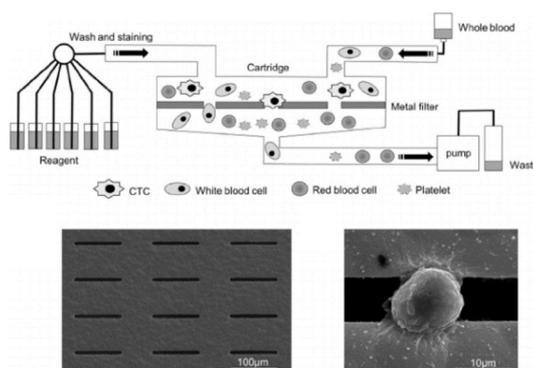


図1 MCA による CTC 検出システム

(2) 肝がん患者、肝硬変患者、健常人コントロールそれぞれの全血 3ml より MCA を検出し、CTC 検出数、検出率を計測する。

(3) (2)でえられた肝がん患者 CTC より mRNA を抽出し、肝特異的遺伝子群〔AFP、Glypican-3 (GPC3)、EpCAM、Albumin (ALB)〕について発現解析を行う。

(4) CTC 検出率/CTC 由来肝特異的遺伝子群 mRNA 発現と臨床背景、経過との関連性について検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト肝がん由来培養細胞株 0 個から 1000 個を健常人全血 3ml に混合して検出率を検討した。免疫染色を用いて CTC は同定可能であることを確認した(図 2a)。MCA を用いた肝癌細胞株の検出率は、HepG2 65.1%、HuH7 76.7%、PLC/PRF/5 99.0%であった(図 2)。

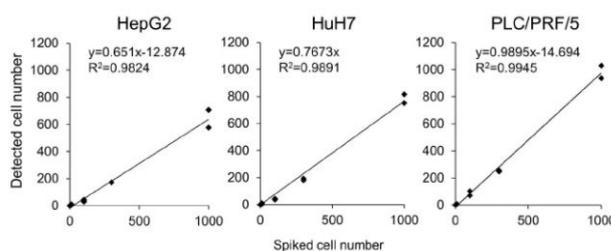


図2 肝細胞がん株回収率

(2) 患者検体を用いた検討では、HD、LC、HCC 群の CTC 陽性率(平均 CTC 数)はそれぞれ、0%(0.1 個)、14.3%(5.3 個)、54.8%(47.6 個)であった。HCC の有無と CTC 数から ROC 解析を行い、CTC のカットオフ値 10 個を設定すると、HCC 群の CTC 陽性率は、LC 群と比較し有意に高かった (P<0.05)。局所性 HCC 群と転移性 HCC 群の CTC 陽性率(平均 CTC 数)は、38.9%(8.2 個)、76.9%(102.2 個)であり、転移性 HCC 群の CTC 数は有意に多かった (P<0.05) (図 3)。

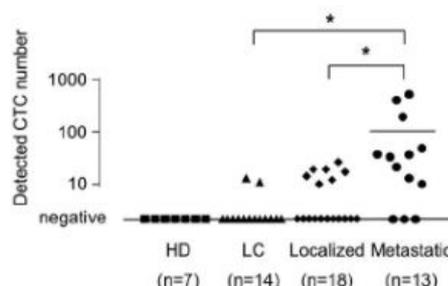


図3 CTC 数

(3) 肝細胞がん患者よりえられた CTC より、CTC 由来の肝特異的遺伝子発現解析が可能であった。肝特異的遺伝子発現解析群 AFP、GPC3、EpCAM、ALB の発現率はそれぞれ 15.4%、7.7%、15.4%、46.2%であった。ALB 発現率は、転移性 HCC 群（83.3%）で局所性 HCC 群（14.3%）より有意に高かった（ $P<0.05$ ）(図 4)。

Patient No.	P30	P35	P36	P38	P39	P41	P42	P28	P29	P31	P32	P33	P34
group	Localized							Metastatic					
CTC count	26	14	8	3	0	2	17	33	191	13	36	9	37
AFP													
GPC3													
EpCAM													
ALB													

ND
 001
 01
 1
 10
 100

図 4 CTC 由来肝特異的遺伝子発現

(4) 肝細胞がん患者において CTC 検出率と全生存期間との関連性について解析した。CTC 陽性例(CTC \geq 10)は陰性例と比較し累積生存率が有意に低かった（ $P<0.05$ ）(図 5a)。また、進行度別では、転移性 HCC 群においては、予後に差はみられなかったが、局所性 HCC 群において、CTC 陽性例は陰性例に比べ累積生存率が低かった（ $P<0.05$ ）(図 5b)。

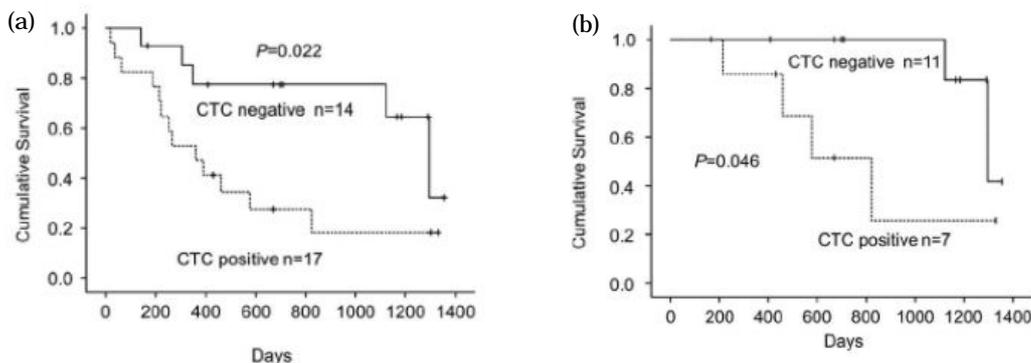


図 5 全生存率 (a) 全 HCC 例 (b) 局所性 HCC 例

(5) 以上の研究課程において、MCA を用いた肝細胞がんの新規 CTC 検出系を確立した。肝細胞がん患者において、MCA は高感度に CTC を検出可能であり、転移例ではより多くの CTC が検出された。CTC 陽性肝細胞がん例は、陰性例と比較し予後不良であり、特に局所性肝細胞がん例においてよりその傾向は顕著であった。また CTC 由来 mRNA 発現解析により、肝細胞癌進行度と CTC 由来 ALB 発現が関連していた。以上の結果より、MCA を用いた CTC 検出系は、病勢進行や予後の予測が困難な肝細胞癌患者における新たなバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi Kazuto, Ofuji Kazuya, Hiramatsu Katsushi, Nosaka Takuto, Naito Tatsushi, Matsuda Hidetaka, Endo Katsuya, Higuchi Masayuki, Ohtani Masahiro, Nemoto Tomoyuki, Nakamoto Yasunari	4. 巻 10
2. 論文標題 Circulating tumor cells detected with a microcavity array predict clinical outcome in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 2300 ~ 2309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.3790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kazuto Takahashi, Kazuya Ofuji, Katsushi Hiramatsu, Takuto Nosaka, Tatsushi Naito, Hidetaka Matsuda, Masahiro Ohtani, Yasunari Nakamoto
2. 発表標題 Circulating tumor cells detected with microcavity array predict clinical outcome in patients with hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 AASLD 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大藤和也 野阪拓人 中本安成
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤による肝障害発症様式の検討
3. 学会等名 JDDW 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大藤 和也、高橋 和人、中本 安成
2. 発表標題 微小流路デバイスを用いた血中循環腫瘍細胞による膵癌早期診断
3. 学会等名 第106回消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuya Ofuji, Takuto Nosaka, Kazuto Takahashi, Tatsushi Naito, Hidetaka Matsuda, Masahiro Ohtani, Katsushi Hiramatsu, Yasunari Nakamoto
2. 発表標題 Cholestatic type of liver injury onset by immune checkpoint inhibitor may be characteristic in Japanese patients
3. 学会等名 AASLD 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋和人、大藤和也、平松活志、野阪拓人、内藤達志、松田秀岳、大谷昌弘、根本朋幸、中本安成
2. 発表標題 循環腫瘍細胞を用いた肝癌の非侵襲的分子病態解析
3. 学会等名 第105回消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuto Takahashi, Kazuya Ofuji, Katsushi Hiramatsu, Takuto Nosaka, Tatsushi Naito, Hidetaka Matsuda, Masahiro Ohtani, Tomoyuki Nemoto, Yasunari Nakamoto
2. 発表標題 Clinical implication of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a microcavity array
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大藤和也 野阪拓人 中本安成
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤による肝障害の検討
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Ofuji, Kazuto Takahashi, Takuto Nosaka, Tatsushi Naito, Hidetaka Matsuda, Masahiro Ohtani, Katsushi Hiramatsu, Tomoyuki Nemoto, Yasunari Nakamoto
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF A NOVEL CIRCULATING TUMOR CELLS ISOLATION SYSTEM IN PATIENTS WITH PANCREATIC CANCER USING A MICROCAVITY ARRAY
3. 学会等名 DDW 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuto Takahashi, Kazuya Ofuji, Katsushi Hiramatsu, Takuto Nosaka, Tatsushi Naito, Hidetaka Matsuda, Masahiro Ohtani, Tomoyuki Nemoto, Yasunari Nakamoto
2. 発表標題 Sensitive Detection of Circulating Tumor Cells in Patients with Chronic Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma Using a Microcavity Array
3. 学会等名 APASL Single Topic Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuto Takahashi, Kazuya Ofuji, Katsushi Hiramatsu, Takuto Nosaka, Tatsushi Naito, Hidetaka Matsuda, Masahiro Ohtani, Tomoyuki Nemoto, Yasunari Nakamoto
2. 発表標題 A Novel Analysis Method of Circulating Tumor Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma using a Microcavity Array
3. 学会等名 AASLD2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------