

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17654

研究課題名（和文）循環腫瘍細胞を用いた肝細胞癌の転移制御のための研究

研究課題名（英文）Research on the control of circulating tumor cells and metastasis of hepatocellular carcinoma

研究代表者

濱岡 道則（Hamaoka, Michinori）

広島大学・医系科学研究科（医）・専門研究員

研究者番号：70805639

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肝細胞癌に特異的に高発現しているGlypican-3をターゲットに肝細胞癌の循環腫瘍細胞(CTC)の検出、解析を行った。3cm以下の小型の肝細胞癌においても、CTCが多い症例では系統的肝切除が望ましいことを明らかにした。系統的肝切除施行症例において、門脈中のCTCは予後因子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
切除可能な肝細胞癌に対して、系統的切除か非系統的切除かの術式選択においてCTCの有用性を示すことができた。また本研究では、門脈血中のCTC測定の有用性を示すことができ、将来的に肝細胞癌の再発制御につながる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：We detected and analyzed circulating tumor cells (CTC) in hepatocellular carcinoma (HCC) by targeting glypican-3, which is specifically highly expressed in HCC. This study showed that anatomical hepatectomy should be performed in cases with high CTC levels, even if the hepatocellular carcinoma is less than 3 cm in size. Furthermore, in a study of cases in which anatomical hepatectomy was performed, CTC in the portal vein were found to be a prognostic factor.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：循環腫瘍細胞 肝細胞癌 癌免疫

1. 研究開始当初の背景

本邦における肝細胞癌による死亡数は減少傾向にはあるものの、予後不良な疾患でありさらなる治療成績の向上が望まれる。肝細胞癌の治療の困難さの要因の一つに、根治切除後も高率に再発を来すことが挙げられる。根治術後の転移再発は予後不良であり、その機序解明と制御方法の確立が急務である。転移形成には循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cell; CTC)が寄与していると推定されるが、肝細胞癌における CTC の報告は少ない。我々は肝細胞癌で特異的に高発現している膜糖蛋白質である Glypican3 (GPC3) を標的に肝細胞癌の CTC を検出する方法を開発した。我々の検討では CTC5 個以上の患者は、腫瘍径が大きく、脈管侵襲を伴うといった進行癌症例が多かった。また、これらの患者は有意に予後不良であることを明らかにした (Hamaoka M, et al. PLoS One, 29;14(5):e0217586, 2019.)。しかしながら、肝細胞癌患者においてどのような機序で CTC が転移形成に寄与しているのかは不明である。また、CTC 増殖に関連する因子については不明である。

2. 研究の目的

本研究は肝細胞癌患者の CTC の検出により、肝細胞癌の転移機序の解明と治療成績の向上を目指し、CTC 増殖に関連する因子を明らかにすることで癌転移の制御を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌患者の CTC の解析

CTC の測定は以前の報告と同様に次の手順で行った。①肝細胞癌患者の採血を行い、全血を用いて密度勾配遠心分離を行い単核球層を回収する。②GPC3 抗体、磁気ビーズを用いて MACS 法により GPC3 陽性細胞を回収する。③FACS 法により GPC3 陽性細胞数である CTC 数を計測する。転移形式の解明のため、肝細胞癌患者で肝切除施行症例において手術中に末梢血、門脈血、肝静脈血をそれぞれ採血し、CTC を測定した。CTC 数と肝癌患者の臨床病理学的因子との関連について解析を行った。

また、血漿中のケモカインと CTC の関連を評価するために、肝細胞癌の増殖に寄与すると考えられる CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、CCL2、CCL5 の測定を行った。さらに、IL-1 β の遺伝子多型が肝癌術後の生存率に関連があるため、CTC との関連についても評価を行った。

(2) 炎症性サイトカインと CTC の関連

炎症性サイトカインと癌増殖および CTC の関連の評価のために、マウスを使用した。Hepa1-6 を脾注し、その後に脾摘、肝切除モデルとして 30%の肝切除、肝壊死モデルとして 30%の肝壊死手術を施行した。CTC の測定は EpCAM を用いた Positive selection 法で行った。各モデルにおけるサイトカイン量と腫瘍量の関連について評価を行った。

4. 研究成果

(1) 肝細胞癌に対して肝切除を施行した 194 症例で解析を行った。GPC3 陽性 CTC 数のカットオフ値を 4 個と設定し、CTC high 群および low 群の 2 群に分けた。肝切除術式に関しては系統的肝切除 (AR)、非系統的肝切除 (NAR) での検討を行った。CTC high 群は有意に腫瘍径が大きく、顕微鏡的脈管侵襲陽性 (mPVI) が多かった ($P < 0.01$)。多変量解析の結果、AFP ($P < 0.01$)、CTC high ($P < 0.01$) が mPVI の独立したリスク因子であった。腫瘍径 ≥ 30 mm において、NAR と AR で予後の差はなかった。一方で、腫瘍径 < 30 mm の小型肝癌で、CTC high の場合には、NAR で無再発生存率は有意に不良であった (図 1)。

以上より、CTC4 個以上の症例では小型の肝癌であっても系統的肝切除の選択が望ましいことが示唆された。

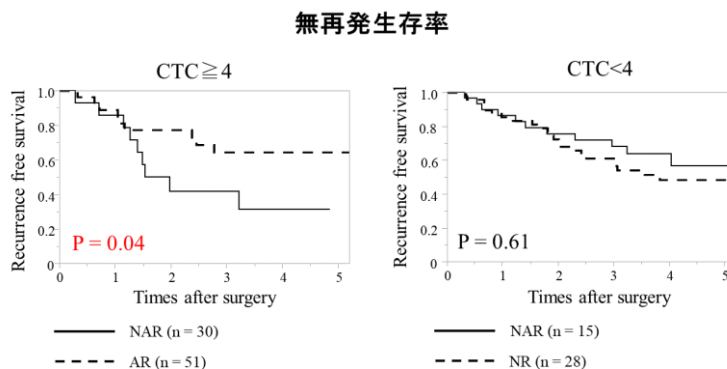
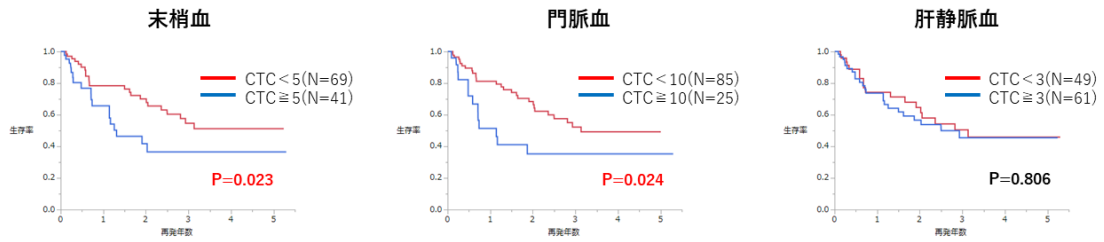


図 1. 腫瘍径 30mm 未満における術式と無再発生存率

無再発生存率



全生存率

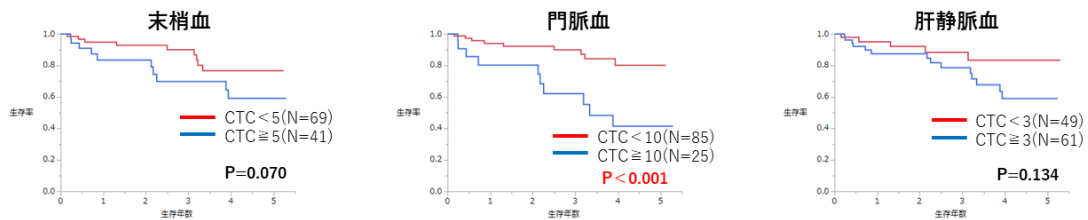


図 2. 末梢血、門脈血、肝静脈血における CTC と生存率

AR を施行し術中に末梢血、門脈血、肝静脈血を採血した 110 例の解析では、mPVI 症例において有意に多く門脈血 CTC を認めた。ROC により末梢血、門脈血、肝静脈血それぞれのカットオフを設定した。末梢血および門脈血の CTC 陽性症例で無再発生存率は有意に不良であり、門脈血の CTC 陽性症例は全生存率も有意に不良であった(図 2)。全生存率について多変量解析を行うと門脈血 CTC、AFP が独立した予後不良因子であった(図 3)。

	univariate		Multivariate	
	RR	P value	RR	P value
Peripheral CTC ≥ 5	2.057	0.119		
Portal CTC ≥ 10	3.989	0.003	3.285	0.031
HV before hepatectomy CTC ≥ 3	2.311	0.089		
HV after hepatectomy CTC ≥ 3	0.757	0.546		
LD B/C	5.198	<0.001	1.883	0.267
AFP > 10	5.851	<0.001	6.636	<0.001
PIVKA > 60	2.508	0.077		
Tumor diameter > 50	3.603	0.006	1.967	0.192
Multiple tumor	4.516	0.001	2.837	0.056
Vascular invasion	2.400	0.070		

図 3. 生存に寄与する因子

末梢血、門脈血、肝静脈血それぞれでケモカインの測定を行ったところ、CCL2、CCL5、CXCL8 は末梢血より門脈血で高値であった(図 4)。門脈血 CTC10 個以上の群と 10 個未満の群と比較したところ、門脈血 CTC10 個以上の群では門脈中の CXCL9 (P=0.012)、CXCL10 (P=0.033) が有意に高値であり、これらが癌の脈管侵襲、血管内への播種に寄与している可能性が考えられた。

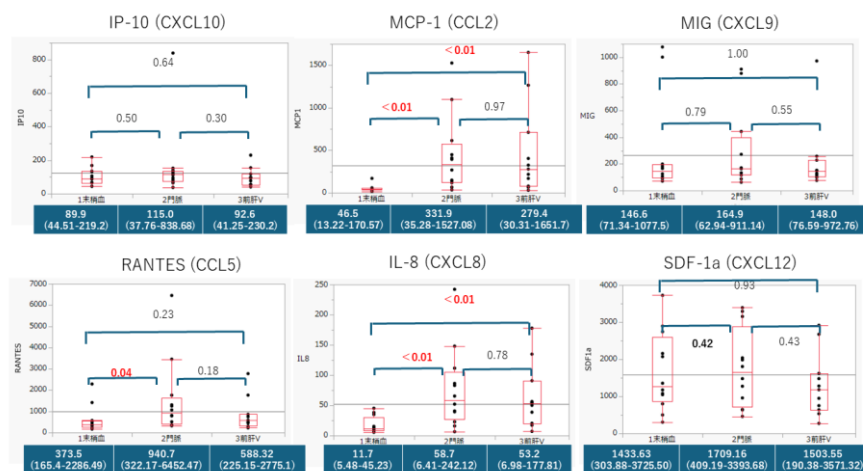


図 4. 末梢血、門脈血、肝静脈血におけるケモカイン

IL-1 β SNP の rs16944 A/A と G/A+G/G との比較では、A/A は門脈血 CTC が有意に多かった(図5)。肝切除症例の検討で A/A は有意に再発率が高かったことから、門脈血 CTC と転移再発に関連性がある可能性が示唆された。

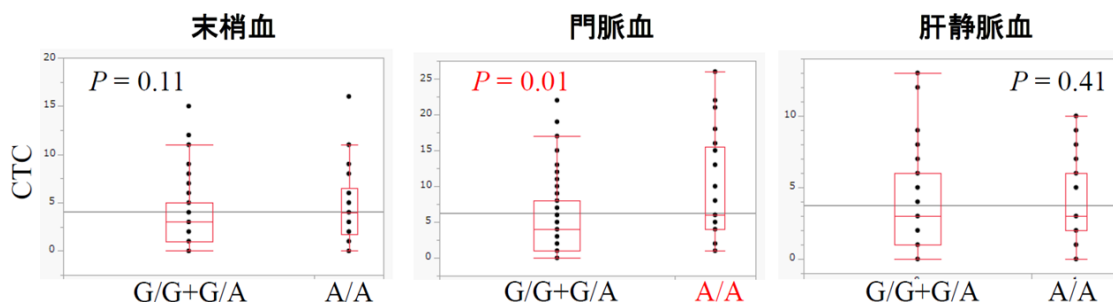


図5. IL-1 β SNP rs16944 A/A、 G/A+G/G と CTC の関連

(2) Hepa1-6 を脾注後に脾摘を行い、その後、肝切除モデルと肝壊死モデルの2つのモデルを作成した。2週間後に腫瘍の生着状況を確認したところ、肝腫瘍数および腫瘍占拠率は肝壊死モデルで有意に多かった。サイトカインの変化を day0 の 1、3、6 時間で q-PCR を用いて測定したが、IL-6、TGF- β は両者のモデルで差を認めなかった。

肝切除モデルと肝壊死モデルの残肝 RNA をそれぞれ day1/day3/day7 でマイクロアレイを用いて解析した。両群の RNA の違いは、day1 では 262 種類、day3 では 103 種類、day7 では 1440 種類であった。この 1440 種類に対してケモカイン・サイトカイン解析を行ったところ、IL-1 β ・TGF- β 1 といったサイトカインの他、腫瘍増殖や転移に関わるとされる CXCL13・CXCL9 をはじめとする多くのケモカインが発現していた。day7 における q-PCR および ELISA の結果、肝壊死モデルで CXCL13 とそのレセプターである CXCR5 の上昇を確認した。次にスクラッチアッセイで CXCL13 がある状況下では Hepa1-6 の増殖能が促進されることを確認した。

なお、各モデルにおいて CTC の検出を試みたが再現性がなく、マウスにおける CTC の解析は断念せざるを得なかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹井大祐
2. 発表標題 HCCにおける再発・予後とGlypican3陽性CTCとの関係
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 難波洋介
2. 発表標題 顕微鏡的門脈浸潤の予測因子：GPC3 を用いた末梢血循環腫瘍細胞測定の有用性
3. 学会等名 日本肝癌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹井大祐
2. 発表標題 肝細胞癌でのGlypican3陽性CTCのリキッドバイオプシーとしての意義
3. 学会等名 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 難波洋介
2. 発表標題 解剖学的肝切除の適応症例選択におけるGPC3を用いた末梢血循環腫瘍細胞測定の有用性
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2024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
---------	---------