

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591549

研究課題名（和文） 肝細胞癌多段階発癌の画像診断に関する臨床的・基礎的研究

研究課題名（英文） Imaging diagnosis of multi-step hepatocarcinogenesis: clinical and basic analysis

研究代表者

松井 修 (MATSUI OSAMU)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：10019961

研究成果の概要（和文）：肝癌の多段階発癌にともない流出血流が肝静脈から門脈に変化し、これらがダイナミック CT での悪性度診断に有用であることを明らかにした。また、肝癌における OATP8 の発現が Gd-EOB-DTPA 造影 MRI (EOB-MRI) 所見を規定すること、それが多段階発癌にともなって減少することを明らかにした。その結果 EOB-MRI が早期肝癌の診断に極めて有用であることを示した。また、EOB-MRI 肝細胞相で高信号を示す肝癌は悪性度の低い subtype であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In accordance with the progression of multi-step hepatocarcinogenesis, the drainage vessels from the tumor changed from hepatic vein to hepatic sinusoids, and then portal vein, and this can be diagnosed by dynamic CT. There was an intensely significant correlation between OATP8 expression and signal intensity on hepatobiliary phase of Gd-EOB-DTPA enhanced MRI. In addition, the expression of OATP8 was decreased from very early stage of hepatocarcinogenesis in accordance with the elevation of grade of malignancy of the tumors. Therefore, EOB-MRI was proved to be extremely useful in the diagnosis of early HCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：肝細胞癌、肝癌多段階発癌、Gd-EOB-DTPA 造影 MRI、早期肝癌、悪性度

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌（肝癌）はウイルス感染に起因するものが多く、特にB型、C型肝炎ウイルスの持続感染に由来するものが多い。我が国ではC型肝炎ウイルスに起因するものが80%以上を占めるが、世界的にもC型肝炎ウイルス感染

は急増しており、今後肝癌の発生は大幅に増加することが予想されている。我が国は肝癌の診断と治療に世界をリードする実績があり今後とも我が国の最先端の肝癌研究は世界的に重要な意義を有する。我が国を中心としたこれまでの多くの研究で肝癌の診断と

治療は著しく進歩したがいまだに多くの問題が残されておりその長期予後は依然として不良である。その大きな理由の1つは、ウイルス感染・慢性肝障害を基盤とした肝癌の多段階発癌・同時性あるいは異時性多中心発生である。この複雑な肝癌性状のために、早期肝細胞癌のピンポイントの診断が困難であること、肝癌の発生の病態や生物学的性状の解析が十分なされていない、などの問題点が残されており、これらに対する有効な対応が確立されていない。こうした点の解明には画像診断法と病理・病態の対比が重要である。

肝癌多段階発癌における画像の変化を我々はこれまでに明らかにしてきた。すなわち、典型的な多血性肝癌が、肝硬変結節に類似した結節内血行を示す乏血性結節（腺腫様過形成）から多段階的に進展することを門脈CTと肝動脈造影を用いて世界で初めて明らかにした(Matsui O, et al. Radiology 1991;178:493-7)。その後、肝動脈造影下CTも導入し、多数例で解析し、多段階発癌にもなる結節内血行動態の多段階的变化の概念を確立した(Hayashi M, Matsui O, et al. Am J Roentgenol. 1999;172:969-76. Ueda K, Nakanuma Y, Matsui O, et al. Hum Pathol. 1992;23:619-26)。いわゆる“早期肝細胞癌”では結節内門脈血流は周辺肝より減少し、動脈血流は周辺肝と類似することを明らかにした。この概念は現在世界中で広く知られ、肝癌野早期診断と治療法の開発に大きなインパクトを与えている。しかしながら、本法は侵襲的であり、非侵襲的診断法でかつ正確に肝癌多段階発癌過程を画像で診断することが臨床的に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、肝癌多段階発癌と結節内血行の変化やMRI信号強度変化について最新の診断機器・造影剤導入における多段階発癌の精度向上を検討するとともに、各種診断法の臨床的有効性を明らかにし、得られた画像所見のメカニズムを解明することを目的とする。この目的を達成するために以下の研究を行ったので、研究項目ごとに記載する。(1) **(研究1と研究の目的) 肝細胞癌および腺腫様過形成の流出血管：動脈造影下CT所見と病理像による検討**：肝癌からの流出血流は画像所見を様々に修飾する。流出血流が多段階発癌にもなって変化すれば結節の悪性度診断に有用である。本研究では、肝癌多段階発癌肝癌および腺腫様過形成の流出血管を動脈造影下CT所見と病理像との対比により解明し、多段階発癌における流出血管の変化について明らかにすることを目的とした。

(2) **(研究2と研究の目的) 肝細胞癌におけるGd-EOB-DTPAの取り込みおよび排泄に關与するトランスポーターの検索**：肝細胞特異性MRI造影剤Gd-EOB-DTPAを用いた造

影MRI(EOB-MRI)は早期肝癌の検出に優れることが明らかとなってきた。その造影メカニズムを明らかにすることは本造影剤による肝癌多段階発癌の画像診断における有用性を明らかにするために重要である。本研究では、肝細胞癌におけるGd-EOB-DTPAの輸送に關与するトランスポーターを分子病理学的に解明することを目的とした。

(3) **(研究3と研究の目的) 肝細胞癌の多段階発癌における肝細胞膜トランスポーターOATP8の発現変化：Gd-EOB-DTPA造影MRI所見との対比**：研究2からEOB-MRIにおける閑雅の信号強度を規定する因子として肝細胞膜取り込みトランスポーターOATP8が同定されたが、その発現が肝癌多段階発癌でどのように変化するか、そしてそれがどのように画像に反映されるかを明らかにすることは臨床的意義が大きい。本研究では、多段階発癌の過程での肝細胞膜トランスポーターOATP8の発現変化を評価し、EOB-MRI肝細胞造影相での増強効果との關連について明らかにすることを目的とした。

(4) **(研究4と研究の目的) EOB-MRI肝細胞造影相で高信号を呈する肝細胞癌：バイオマーカー発現を中心とする生物学的特徴の検討**：研究3から、肝癌の多段階発癌にもなってEOB-MRI肝細胞相所見が多段階的に変化することを明らかにしたが、一部の多血性肝癌はこの変化から逸脱して特異な信号強度を示すことが明らかとなった。こうした肝癌の画像的・生物学的背景を明らかにすることは肝癌多段階発癌の画像診断のみならず今後の個別化診断にも重要である。本研究では、多血性肝細胞癌の中でもEOB-MRI肝細胞造影相で高信号を呈する特殊なsubtypeについて、バイオマーカーの発現を中心にその生物学的特徴を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) **研究1の方法**：対象は外科的切除された肝細胞性腫瘍46例。画像所見によりこれらを3群に分類し、A群(n=18)はCTAPで等～低血流・CTHA早期相で低吸収・後期相でコロナ様濃染なし、B群(n=13)はCTAPで血流欠損・CTHA早期相で濃染・後期相で薄いコロナ様濃染、C群(n=15)は同様に厚いコロナ様濃染を呈するものとした。組織学的に各群における腫瘍分化度、発育様式、血管分布を比較検討した。また各群計4例で連続切片を作成し腫瘍境界部での血管の連続性を評価した。

(2) **研究2の方法**：外科的切除された肝細胞癌患者38症例40結節を対象とし、Gd-EOB-DTPA造影MRI肝細胞造影相で背景肝と比較して低信号を呈する群(n=32)と、高信号を呈する群(n=8)とに分類し、以下の項目について比較検討した。①RT-PCRによるトランスポーターの発現量の評価(凍結標本が

得られた22結節：低信号群n=17、高信号群n=5)。トランスポーターは取り込み側のorganic anion transporting polypeptide (OATP)-A,B,C,8、排泄側のmultidrug resistant protein (MRP)-1,2,3の計7種類を対象とした。② RT-PCRでのトランスポーターの発現量と肝細胞造影相での増強率との相関。③取り込み側トランスポーターOATP8の免疫染色による発現量の半定量的評価。④組織像(分化度、増殖様式、胆汁栓の有無)の評価。

(3) **研究3の方法**：組織学的検討では、外科的切除された肝細胞性結節153症例190結節[low grade dysplastic nodule (DN)(n=3)、high grade DN(n=18)、early HCC (n=6)、高分化型HCC(n=38)、中分化型HCC(n=99)、低分化型HCC(n=26)]を対象とした。切除標本に対しOATP8の免疫染色を行い、その発現を背景肝と比較して半定量的に評価した(発現なし：grade0、発現低下：grade1、等発現：grade2、発現増加：grade3)。これらの結節の分化度と免疫染色でのOATP8発現との相関について検討を行った。画像による検討では、外科的切除されたHCC62症例72結節[高分化型HCC(n=14)、中分化型HCC(n=44)、低分化型HCC(n=14)]を対象とした。EOB-MRI肝細胞造影相(造影20分後)での増強率 $[(1/\text{造影後T1値}-1/\text{造影前T1値})/(1/\text{造影前T1値})]$ を算出し、増強率と腫瘍分化度、OATP8発現との相関について検討を行った。

(4) **研究4の方法**：外科的切除された単発の多血性肝細胞癌180結節を対象とし、EOB-MRI肝細胞造影相で背景肝と比較して低信号を呈する群(n=158)と高信号を呈する群(n=22)とに分類し、以下の項目について比較検討した。①組織学的評価(肉眼型、分化度、増殖様式、脈管浸潤、被膜浸潤)。②血清AFP濃度、AFP-L3分画(%), PIVKA-II濃度。③免疫染色による各種マーカー：OATP8、AFP、PIVKA-II、EpCAM、NCAM、CK19、CK7、HepPar-1、Glypican-3、 β -cateninの発現の半定量的評価。④術後の再発率および生存率。

4. 研究成果

(1) **研究1の研究成果**：A群は腺腫様過形成または高分化型肝細胞癌からなり、B群では被膜のない中分化型肝細胞癌が80%を占めていた。C群では全例が中分化型肝細胞癌で、被膜を有するものが60%であった。発育様式はA群では全例が置換型、C群では全例が圧排型、B群では置換型と圧排型が同程度に見られた。背景肝からA群、B・C群となるにつれ病変内の動脈および血洞は増加しており、門脈と肝静脈は減少していた。同様の順に腫瘍周囲肝組織の動脈および門脈は増加、肝静脈は減少していた。連続切片での評価ではA群例では腫瘍内肝静脈-腫瘍外肝静脈および腫瘍内類洞-腫瘍外肝静脈の連続性が認めら

れた。B群例では腫瘍血洞-腫瘍外類洞の連続性が多数認められた。被膜のないC群例では腫瘍血洞から腫瘍外門脈に直接連続するもの、また腫瘍血洞から腫瘍隔壁内門脈を経て腫瘍外門脈につながるものが認められた。被膜を有するC群例では腫瘍血洞-被膜内門脈と思われる小静脈-被膜外門脈が連続していた。これらの血管の連続性は各群で複数箇所確認された。以上から肝細胞性腫瘍の分化度の低下、腫瘍内および周囲肝静脈の減少、置換性から圧排性発育への変化、線維性被膜形成といった要素により、主な流出血管は肝静脈から類洞、門脈へと変化することが示唆された。CTHA後期相でのコロナ様濃染の有無や形態の違いにより流出静脈の推測が可能と考えられた。この結果はダイナミックCTやMRI、造影超音波診断に応用が可能であり肝癌の悪性度推定に有用と考えられた。

(2) **研究2の研究成果**：RT-PCRでは、7種類のトランスポーターのうちOATP8およびMRP3で低信号群での発現減少、高信号群での発現増加が認められた($P<0.01$)。その他のトランスポーターの発現量は、両群間での有意差は認められなかった。OATP8の発現量は肝細胞造影相での増強率と正の相関を示した($P<0.01$, $R=0.84$)。免疫染色でもOATP8の低信号群での発現減少、高信号群での発現増加が認められた($P<0.01$)。組織学的には、高信号群では88%が中分化型肝細胞癌であり、低信号群と比較して偽腺管形成(75%)、胆汁栓(88%)の有意に高頻度に認められた($P<0.01$)。以上から、肝細胞癌では、取り込み側トランスポーターOATP8、類洞排泄側トランスポーターMRP3がGd-EOB-DTPAの輸送に関与している可能性が示唆された。OATP8の発現量は、EOB-MRI肝細胞造影相での増強率を規定しているものと考えられた。この発見は今後の肝癌画像診断に大きな意義を有するものと考えられる。

(3) **研究3の研究成果**：OATP8の免疫染色ではlow grade DNではその発現は保たれていたが、低分化型HCCではほとんど発現が認められず、腫瘍の分化度が低下するにつれて減少していた($P<0.0001$, $R=0.15$)。EOB-MRI肝細胞造影相での増強率は、腫瘍分化度の低下に伴い減少する傾向が認められた($P<0.0001$, $R=0.28$)。また免疫染色におけるOATP8発現とEOB-MRI肝細胞造影相での増強率との間には、正の相関が認められた($P<0.0001$, $R=0.81$)。以上から、OATP8の発現は肝癌の多段階発癌にもなって減少し、それに伴って信号強度(増強率)が減少することが明らかとなった。また早期肝癌の約80%ですでに発現の低下が認められ、したがってOATP8の発現減少は鋭敏な肝発癌初期のバイオマーカーであり、結果としてEOB-MRIは鋭敏な画像マーカーであることが明らかとなった。今後の肝癌早期診断に

極めて大きなインパクトのある研究成果と考えられた。

(4) **研究4の研究成果:**組織学的検討では、高信号群では分化度が高く(P=0.028)、門脈浸潤の頻度も有意に低かった(36.7% vs 13.6%, P=0.039)。血中腫瘍マーカー濃度は低信号群と比較して高信号群で有意に低く、AFPは1202.7ng/ml vs 17.9ng/ml (P=0.003)、L3分画は15.9% vs 3.8% (P=0.004)、血中PIVKA-IIは1697.9mAU/ml vs 190.6mAU/ml (P=0.032)であった。免疫染色では低信号群と比較して高信号群でOATP8、HepPar-1、 β -cateninの発現が有意に増加しており、一方AFP、PIVKA-II、EpCAM、Glypican-3の発現は有意に低下していた(P<0.05)。また低信号群と比較して高信号群では再発率が有意に低く(P=0.039)、有意差はないものの生存率も高い傾向が認められた(P=0.07)。以上から、EOB-MRI肝細胞造影相で高信号を呈する肝細胞癌はstem cellよりもmature hepatocyteに近い性質を示しており、生物学的悪性度が低く予後良好なsubtypeである可能性が示唆された。こうした性状や分子病理学的背景の解明は今後の肝癌の個別化診療に重要な示唆を与える成果と考えられた。

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 16 件)

1. Lee JM, Zech CJ, Bolondi L, Jonas E, Kim MJ, Matsui O, Merkle EM, Sakamoto M, Choi BI. Consensus report of the 4th International Forum for Gadolinium-Ethoxybenzyl-DiethylenetriaminePentaacetic Acid Magnetic Resonance Imaging. Korean J Radiol. 2011 Jul-Aug; 12(4): 403-415. (査読有)
2. Tsuda N, Matsui O. Signal profile on Gd-EOB-DTPA-enhanced MR imaging in non-alcoholic steatohepatitis and liver cirrhosis induced in rats: correlation with transporter expression. Eur Radiol. 2011 Dec;21(12):2542-2550. (査読有)
3. Kudo M, Izumi N, Kokudo N, Matsui O, Sakamoto M, Nakashima O, Kojiro M, Makuuchi M; HCC Expert Panel of Japan Society of Hepatology. Management of hepatocellular carcinoma in Japan: Consensus-Based Clinical Practice Guidelines proposed by the Japan Society of Hepatology (JSH) 2010 updated version. Dig Dis. 2011;29(3):339-364. (査読有)
4. Miyayama S, Matsui O, Zen Y, Yamashiro M, Hattori Y, Orito N, Matsui K, Tsuji K, Yoshida M, Sudo Y. Portal

blood supply to locally progressed hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization: Observation on CT during arterial portography. Hepatol Res. 2011 Sep;41(9): 853-866. (査読有)

DOI 10.1111/j.1872-034X.2011.00836.x.

5. Kudo M, Imanaka K, Chida N, Nakachi K, Tak WY, Takayama T, Yoon JH, Hori T, Kumada H, Hayashi N, Kaneko S, Tsubouchi H, Suh DJ, Furuse J, Okusaka T, Tanaka K, Matsui O, Wada M, Yamaguchi I, Ohya T, Meinhardt G, Okita K. Phase III study of sorafenib after transarterial chemoembolisation in Japanese and Korean patients with unresectable hepatocellular carcinoma. Eur J Cancer. 2011 Sep;47(14):2117-2127. (査読有)

6. Kitao A, Matsui O, Yoneda N, Kozaka K, Shinmura R, Koda W, Kobayashi S, Gabata T, Zen Y, Yamashita T, Kaneko S, Nakanuma Y. The uptake transporter OATP8 expression decreases during multistep hepatocarcinogenesis: correlation with gadoxetic acid enhanced MR imaging. Eur Radiol. 2011 Oct;21(10): 2056-2066. (査読有)

7. Kobayashi S, Matsui O, Gabata T, Koda W, Minami T, Ryu Y, Kawai K, Kozaka K. Gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriaminepentaacetic Acid-enhanced magnetic resonance imaging findings of borderline lesions at high risk for progression to hypervascular classic hepatocellular carcinoma. J Comput Assist Tomogr. 2011 Mar-Apr;35(2): 181-186. (査読有)

8. Tsuda N, Harada K, Matsui O. Effect of change in transporter expression on gadolinium-ethoxybenzyl-diethylenetriaminepentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging during hepatocarcinogenesis in rats. J Gastroenterol Hepatol. 2011 Mar;26(3): 568-576. (査読有)

DOI 10.1111/j.1440-1746.2010.06494.x.

9. Matsui O, Kobayashi S, Sanada J, Kouda W, Ryu Y, Kozaka K, Kitao A, Nakamura K, Gabata T. Hepatocellular nodules in liver cirrhosis: hemodynamic evaluation (angiography-assisted CT) with special reference to multi-step hepatocarcinogenesis. Abdom Imaging. 2011 Jun;36(3):264-272. Review. (査読有)
10. Yoneda N, Sato Y, Kitao A, Ikeda H, Sawada-Kitamura S, Miyakoshi M,

Harada K, Sasaki M, Matsui O, Nakanuma Y. Epidermal growth factor induces cytokeratin 19 expression accompanied by increased growth abilities in human hepatocellular carcinoma. Lab Invest. 2011 Feb;91(2):262-272. (査読有)

11. Pugacheva O, Matsui O, Kozaka K, Minami T, Ryu Y, Koda W, Kobayashi S, Gabata T. Detection of small hypervascular hepatocellular carcinomas by EASL criteria: comparison with double-phase CT during hepatic arteriography. Eur J Radiol. 2011 Dec;80(3):e201-206. (査読有)

12. Ozaki K, Matsui O, Kobayashi S, Sanada J, Koda W, Minami T, Kawai K, Gabata T. Selective atrophy of the middle hepatic venous drainage area in hepatitis C-related cirrhotic liver: morphometric study by using multidetector CT. Radiology. 2010 Dec; 257(3):705-714. (査読有)

13. Tsuda N, Matsui O. Cirrhotic rat liver: reference to transporter activity and morphologic changes in bile canaliculi--gadoxetic acid-enhanced MR imaging. Radiology. 2010 Sep;256(3): 767-773. (査読有)

14. Kitao A, Zen Y, Matsui O, Gabata T, Kobayashi S, Koda W, Kozaka K, Yoneda N, Yamashita T, Kaneko S, Nakanuma Y. Hepatocellular carcinoma: signal intensity at gadoxetic acid-enhanced MR Imaging--correlation with molecular transporters and histopathologic features. Radiology. 2010 Sep;256(3):817-826. (査読有)

15. Kitao A, Zen Y, Matsui O, Gabata T, Nakanuma Y. Hepatocarcinogenesis: multistep changes of drainage vessels at CT during arterial portography and hepatic arteriography--radiologic-pathologic correlation. Radiology. 2009 Aug;252(2):605-614. PubMed PMID: 19703890. (査読有)

16. Liu Y, Li H, Matsui O. The antiangiogenic effect of thalidomide on occult liver metastases: an in vivo study in mice. J Gastroenterol Hepatol. 2009 Jun;24(6):1077-81. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

① Matsui O: Evaluation of hepatocarcinogenesis with Gd-EOB-DTPA enhanced MRI: Correlation with histopathology and transporter expression. ACAR2011 May 12, 2011, China National Convention Center, China

② Matsui O: HCC: From diagnosis to

treatment. ESGAR2011 May 21, 2011, Venice Convention Centre, Italy

③ Matsui O: Diagnostic challenge of very early stage HCC: Evaluation of hepatocarcinogenesis with Gd-EOB-DTPA enhanced MRI: correlation with histopathology and transporter expression. 2nd Asia-Pacific Primary Liver Cancer Expert Meeting. July 1, 2011, ANA Gate Tower Hotel Osaka, Osaka

④ Matsui O: Diagnosis and management of HCC--role of primovist-enhanced MRI in guiding treatment strategy. 5th International Forum for Liver MRI. Sept. 16, 2011, Muenchen Arabellapark Hotel, Germany

⑤ Matsui O: Review of vascular anatomy collateral, variants and micro-circulation. Embolization Symposium and Technologies. May 6, 2010, The Westin Market Street Hotel, USA

⑥ Matsui O: Vascular abnormalities of the liver. ESGAR2010. June 2, 2010, Germany

⑦ Kitao A, Matsui O, et al: Hepatobiliary contrast agents: administration and uptake physiology. RSNA2010. Nov. 28, 2010, McCormick Place, USA

⑧ Kitao A, Zen Y, Matsui O, et al.: Organic anion transporting polypeptide8 expression correlates with the signal intensity of hepatocellular carcinoma on hepatobiliary phase of Gd-EOB-DTPA enhanced MRI. ACAR2009. June 5, 2009, Lotte Hotel, Korea

[図書] (計 1 件)

① 有井滋樹、松井 修: 肝細胞癌の早期診断: 画像と分子マーカー. アークメディア、東京、2012

[その他]

ホームページ等

<http://radiology.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 修 (MATSUI OSAMU)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 10019961