

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791410

研究課題名(和文)肝細胞癌肝移植後のエベロリムス(Everolimus)の再発予防効果の研究

研究課題名(英文)The suppressant effect of everolimus against HCC after liver transplantation

研究代表者

伊藤 孝司(Takashi, Ito)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：10378656

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌症例24例(ミラノ基準外4例)中1例は術後早期の感染症にて死亡し、23例を対象として研究を行った。23例中3例にエベロリムス(Ev)投与を行った。Ev投与群ではミラノ基準内1例、基準外2例であった。結果として、23例全例肝細胞癌の再発を認めることはなかった。また、血液学的所見では腫瘍マーカーも有意差を認めなかった。移植後の免疫細胞などでも有意差は認めず、免疫抑制効果も強くなると考えられなかった。たミラノ基準外症例が少なく再発には有意差を認めることはできなかった。ミラノ基準外症例にてEv投与を行っており、Ev効果があったことも考えられる。研究を今後も続行し再発の検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the liver transplantation recipient of hepatocellular carcinoma (HCC). We performed 24 cases between April 2012 and March 2015. One case was died due to sepsis after transplantation. Four cases were beyond Milan criteria, and the remnant case was in Milan criteria. All patients were not occurred recurrence of HCC for 2years. Three cases was received Everolimus as immunosuppressant after liver transplantation. These cases have no recurrence of HCC, and was beyond Milan criteria. Tumor makers and immunosuppress cells such as CD4/8/25 cells was not significantly difference between evelorimus group and other groups.

We could establish the new HCC recurrence model in SD rats using N1S1 hepatoma cells by adding IR injury and partial hepatectomy in our basic study. This new model can be easily and universally developed, so it could be a good model to investigate the mechanisms of HCC recurrence and to evaluate the effects of new therapeutic agents for HCC.

研究分野：肝臓移植、肝胆膵外科

キーワード：肝臓移植 肝臓癌 エベロリムス

1. 研究開始当初の背景

本邦では、特に成人症例が1999年以降急速に増加しており、特に欧米諸国同様、肝細胞癌症例、ウイルス性肝硬変症例が増加している。2009年末までの肝移植研究会の報告では成人症例は3628症例あり、そのうち肝細胞癌の肝移植症例は918例にまで増加している(1)。肝細胞癌の肝移植においてミラノ基準(2)を満たす症例では術後の肝細胞癌の再発率が低く、肝移植の妥当性が見いだされ、本邦においても2001年よりミラノ基準を満たす肝細胞癌症例に対し、脳死肝移植として登録可能となった。また2004年1月にはミラノ基準を満たす肝細胞癌に対して生体肝移植の保険適応が認められ、近年では成人症例の約7割近くが肝細胞癌症例、ウイルス性肝硬変症例となってきている。ミラノ基準適合した症例は限られており、欧米諸国においてもミラノ基準を逸脱した進行肝細胞癌に対する生体肝移植の需要が高まってきている。しかし、ミラノ基準を逸脱した肝細胞癌症例では再発の危険性もあり、議論のあるところである(3)。

2. 研究の目的

これまで当施設の研究から、成人症例における肝細胞癌に対する生体肝移植は、他の末期肝不全あるいは肝の非代償性機能欠損に対する肝移植成績とは同等の成績であることが明らかとなっている(3)。肝細胞癌に対する生体肝移植は肝細胞癌の除去とともに肝硬変の根治的治療となるという利点もあるが、手術合併症や生体ドナーの負担などの危険性もある。生体肝移植の場合、脳死肝移植とは異なり、特定の患者に対するドナーからの移植であり、ミラノ基準を越えた進行肝細胞癌への適応拡大も可能と考えられている。しかし、ミラノ基準を越えた肝細胞癌症例では、当施設での成績では術後の再発率が約34%であり、再発の危険性が高くなる(4)。また、肝細胞癌が再発した場合、生体肝移植の場合通常の肝細胞癌再発とは異なり、免疫抑制剤内服の影響により、腫瘍細胞の増大時間が異常に早く、またこれまでの肝細胞癌に対する抗癌化学療法では、ほとんどの治療が難治性であり、効果がある抗癌剤が無いに等しい状態である。このため、再発した場合には生命予後が不良となることが多い(5)。これまでの研究結果を踏まえ、肝細胞癌における再発リスクを抑える基準としてKyoto基準を提唱し(6)、再発リスクの軽減に努めているが、ミラノ基準内でも再発する症例を認め、再発予防が非常に重要と考えられる。本臨床研究は、これまでの成果に基づいて、肝細胞癌の転移形式、或いは血液中の微少癌細胞と移植肝の相関関係、免疫学的応答に対する癌細胞への影響を解明し、個々の病態に合わせた治療的介入へとさらに発展させることを目標とする。

3. 研究の方法

(1)肝細胞癌の肝移植後における再発時期は、これまでの我々の研究から2年以内に再発を認める症例が大多数を占める。このため、本研究では、肝移植後の術後早期からのエベロリムスの内服を開始し、エベロリムスの血中濃度をコントロールすることにより、移植後の拒絶反応を抑え、感染症に罹患しない至適濃度で行う。その後外来では3ヶ月ごとの頭部CT、胸腹部CT、骨シンチグラフィ等により再発の検索を行い、また血液学的所見ではAFP、AFP-L3分画、PIVKA-IIの腫瘍マーカーや、移植後のCD4、CD8、CD25陽性T細胞や、制御性T細胞、CD20陽性B細胞、CD56陽性NK細胞などを測定し、免疫学的アプローチを行う。また、エベロリムスの効果として、VEGF、mRNA発現や、下流域タンパクの発現等の測定を行い、評価を行うこととする。これらを術後2年間経過観察することにより、再発の抑制効果を判定するものと考えている。

(2)また、同時に臨床研究では、検証が不可能である肝移植における肝細胞癌の転移、再発モデルをラットにて作成し、肝細胞癌転移のメカニズム、エベロリムスにおける癌再発抑制の機序を解明することを目的として研究を行った。

4. 研究成果

(1)これまでの臨床研究において、肝細胞癌における肝移植後の再発時期は、2年以内に発症する症例が大多数を占めることが判明してきた。このため、肝移植後、早期の時期にエベロリムス内服を開始し、エベロリムスの血中濃度を3~5ng/μlでコントロールした。その他の免疫抑制剤はプログラフ、セルセプトで拒絶反応の抑制を使用し、術後2年までをCT検査や、腫瘍マーカーなどで再発の有無の評価を行った。

結果として、症例はH24年度、成人肝移植18例施行し、肝細胞癌症例6例、うちミラノ基準内6例、ミラノ基準外0例であった。H25年度は成人肝移植32例施行し、肝細胞癌7例、うちミラノ基準内5例、ミラノ基準外2例であった。H26年度は成人肝移植22例施行し、肝細胞癌11例、うちミラノ基準内9例、ミラノ基準外2例であった。

これらの肝細胞癌症例24例中1例は術後早期の感染症にて死亡し、23例を対象として研究を行った。23例中4例はミラノ基準外で症例であったが、Kyoto基準内症例(6)であった。23例中3例にエベロリムス投与を行った。エベロリムス投与群ではミラノ基準内1例、基準外2例であった。

再発結果として、23例全例肝細胞癌の再発を認めることはなかった。また、血液学的所見ではAFP、AFP-L3分画、PIVKA-IIの腫瘍マーカーなども全例で術後3、6、12、24ヶ月目でも正常範囲内であり、エベロリムス投与群、非投与群においても有意差を認める

ことはなかった。また、移植後の CD4、CD8、CD25 陽性 T 細胞や、制御性 T 細胞、CD20 陽性 B 細胞、CD56 陽性 NK 細胞などを測定したが、これらに関してもエベロリムス投与群、非投与群でも有意差は認めず、免疫抑制効果も強くなると考えられなかった。

ただ、議論として症例数は多かったが、ミラノ基準外症例が少なく、再発には有意差を認めることはできなかった。しかし、ミラノ基準外症例にてエベロリムスの投与を行っており、エベロリムスの効果があったことも考えられるが、不明である。エベロリムス投与にても特に副作用や、障害などなく安全に投与することもでき、今後も治療を続行していく予定である。また、再発の有無の検査も今後も続行し、再発の検討を行う予定である。

(2) ラットモデルの作成に関して、これまでの文献にて、ラット肝細胞癌モデルは存在していたが、容易な確立された方法が存在しない状況であった。そこで、我々の研究では、まず始めにラット肝細胞癌モデルの作成を行った。

方法として N1S1 hepatoma cell line (ATCC, CRL-1603, Manassas, VA, USA) の癌細胞を雄 SD rats に経門脈的に注入し、癌発生を目的とした。

結果として、何も行わず、通常の正常肝に癌細胞を注入しても癌発生ができない状態であった。また、70% 肝切除を行い、温阻血時間を変え、ischemic-reperfusion 障害を起こした場合に癌発生を容易に引き起こすことができることを証明できた。

肝切除% 温阻血	0%	40%	55%	70%
0min (症例)	0% (0/2)	0% (0/2)		0% (0/9)
5min (症例)	0% (0/2)	0% (0/2)		22.9% (2/9)
10min (症例)				50% (5/10)
15min (症例)	0% (0/9)	0% (0/10)	44.4% (4/9)	100% (12/12)

上記表にて、肝切除%と温阻血時間の変更での肝細胞癌発生の頻度示している。温阻血時間が長くなり、肝切除率が大きくなれば、肝細胞癌の発生頻度も上昇していることがわかる。これは、肝切除や温阻血などにより、肝細胞が障害を受け、血管内皮細胞が障害を受けた場合に、癌細胞の生着が有意に起こることを示している。

これらを受け、臨床での考察を行うと、肝臓移植は長時間の温阻血時間があり、生体肝移植の場合、グラフトサイズも小さいため、肝細胞癌の転移をきたしやすい可能性がアルのではないかと示唆された。また、エベロリムスの効果として、血管内皮細胞への癌細胞の生着を阻害する機序もあり、このため、

肝細胞癌での肝移植におけるエベロリムス効果が期待できる結果となった。今後は、肝移植モデルにてエベロリムス投与にて癌細胞の抑制効果の研究を行う予定である。

<引用文献>

- (1) 肝移植症例登録報告. 日本肝移植研究会. 移植, 45, 621-632, 2009.
- (2) Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. Mazzaferro V et al. N Engl J Med, 334, 693-699, 1996.
- (3) Living-donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. Kaihara S et al. Transplantation 75, S37-40, 2003.
- (4) Living donor liver transplantation as a second line therapeutic strategy for patients with hepatocellular carcinoma. Takada Y et al. Liver Transpl, 12, 912-919, 2006.
- (5) Living donor liver transplantation for patients with HCC exceeding Milan criteria: a proposal of extended criteria. Takada Y et al. Dig Dis, 25, 299-302, 2007.
- (6) Expansion of selection criteria for patients with hepatocellular carcinoma in living donor liver transplantation. Ito T et al. Liver Transpl, 13, 1637-1644, 2007.
- (7) mTOR inhibitors: an overview. Neuhaus P et al. Liver Transpl, 6, 473-484, 2001.
- (8) Personalized molecular targeted therapy in advanced, recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation: A proof of principle. Bhooi S et al. J of Hepatology, 52, 771-775, 2010.
- (9) Conversion to Everolimus in

maintenance liver transplant patients:
A multicenter, retrospective analysis.
Saliba F et al. Liver transpl, 17,
905-913, 2011.

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)

Kaido T, Ito T, et al. Usefulness of the
Kyoto criteria as expanded selection
criteria for liver transplantation for
hepatocellular carcinoma, Surgery,
査読有り, 154(5), 2013, 1053-1060,
DOI:10.1016/j.surg.2013.04.056.

〔学会発表〕(計 8 件)

海道利実、伊藤孝司、他。 再発予防の
観点から見た肝細胞癌集学的治療におけ
る肝移植の意義、第 98 回日本消化器病学
会、2012 年 4 月 20 日、東京

海道利実、伊藤孝司、他。 肝癌治療に
おける肝移植の意義、第 24 回日本肝胆膵
外科学会学術集会、2012 年 5 月 30 日、
大阪

海道利実、伊藤孝司、他。 肝細胞癌に対
する肝移植の現状と問題点、第 48 回日本
肝癌研究会、2012 年 7 月 21 日、金沢
海道利実、伊藤孝司、他。 LDLT for HCC:
Validation of our expanded criteria、
10th IHPBA、2012 年 6 月 4 日、フラ
ンス、パリ

海道利実、伊藤孝司、他。 肝細胞癌に対
する肝移植、バイオマーカーを組み入れ
た肝細胞癌移植適応の有用性、第 49 回日
本移植学会、2013 年 9 月 5 日、京都

海道利実、伊藤孝司、他。 肝癌に対する
各種治療の取り組み、肝癌に対する肝移
植の適応と長期成績、第 75 回日本臨床外
科学会、2013 年 11 月 21 日、名古屋

海道利実、伊藤孝司、他。 がんと臓器移
植、生物的悪性度を考慮した肝癌適応拡
大移植適応の有用性、第 51 回日本癌治療
学会、2013 年 10 月 24 日、京都

Ito T, et al. The efficacy and safety of
split liver transplantation in Kyoto
University Hospital. 19th ILTS annual
international congress, 2013 年 6 月 12
日、オーストラリア、シドニー

〔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: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 孝司 (ITO, Takashi)
京都大学医学部 肝胆膵移植外科学 非常
勤講師

研究者番号: 10378656

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号:

(4) 研究協力者

濱口 雄平 (HAMAGUCHI, Yuhei)

海道 利実 (KAIDO, Toshimi)

上本 伸二 (UEMOTO, Shinji)