

## 学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	三浦 智也
論文審査担当者	主査 渡邊 守 副査 河野 辰幸、立石 宇貴秀
論文題目	Distinct clinicopathological phenotype of hepatocellular carcinoma with ethoxybenzyl-magnetic resonance imaging hyperintensity: association with gene expression signature
<p style="text-align: center;">(論文内容の要旨)</p> <p><b>【要旨】</b></p> <p>肝細胞癌は Gd-EOB-DTPA を用いた造影 MRI (EOBMRI) の肝細胞造影相で典型的に低信号となるが、高信号になる腫瘍(HighHCC)もある。本研究ではこの HighHCC の臨床病理学的特徴と遺伝子発現の特徴について研究した。対象は術前未治療の根治切除となった肝細胞癌の症例で、術前 EOBMRI で背景肝に対する腫瘍の信号値の比が 1.0 以上の腫瘍を HighHCC とし、1.0 未満の腫瘍 (LowHCC) と比較した臨床病理学的解析、網羅的遺伝子解析を行った。結果は患者 77 人中 14 人が HighHCC で HighHCC は PIVKAI1 が低く、高分化であった。また 3 年間の無再発生存率は HighHCC が 90%と LowHCC が 54%で有意差を認めた。網羅的遺伝子解析では SLC01B3 が発現亢進していた。以上より結語として HighHCC は LowHCC と比較して悪性度が低く、SLC01B3 が EOBMRI にて HighHCC となる重要な遺伝子ということが判明した。</p> <p><b>【緒言】</b></p> <p>肝細胞癌は世界で 6 番目多く、死亡率は第 3 位と言われる。癌の悪性度を正しく評価し、より効果的な治療方針を定める必要がある。その評価法として EOBMRI は肝細胞癌の診断に有用で近年注目されている。</p> <p>Gd-EOB-DTPA は静脈投与後、一定時間経過後に肝細胞に特異的に取り込まれ胆汁排泄される。その際に肝細胞造影相として撮像することで、肝臓内の占拠性病変や瀰漫性肝疾患の診断能が向上した。</p> <p>肝細胞癌は典型的に EOBMRI 肝細胞造影相で低信号域として描出される。しかし 6-15%に等～高信号の肝細胞癌を認める。Gd-EOB-DTPA の癌細胞への取り込みや排出に関わる transporter の発現の違いにより信号強度に変化が見られると考えられている。このように高信号となる肝細胞癌について幾つか報告があるが、網羅的遺伝子解析を行った報告はない。本研究では EOBMRI 肝細胞造影相で高信号となる肝細胞癌の生物学的特徴について臨床病理学的解析と microarray を用いた網羅的遺伝子解析を行った。</p>	

## 【対象と方法】

治療歴のない単発肝細胞癌に対する手術を施行した患者のうち、同意を得た 2009 年 1 月~2013 年 12 月の間に EOBMRI を施行された患者 77 人を対象とした後ろ向き研究を行った。切除検体の回収は切除直後に壊死組織を含まない部分を採取し液体窒素凍結し-80℃で保存した。

### 画像解析

EOBMRI は同じ protocol で術前平均 30.1 日前に施行した。肝細胞造影相は Gd-EOB-DTPA を静注 20 分後撮像した。すべての画像は少なくとも 2 人以上の放射線科医が診断し肝細胞癌と診断した。肝細胞造影相で高信号となる肝細胞癌 (HighHCC) を背景肝と比較し高信号の腫瘍と定義した。信号値の測定は The Centricity Enterprise™ Web version (GE Healthcare Pty Ltd., Piscataway, NJ) picture archiving and communication system. を用いた。

まず腫瘍が最大径となる高さの画面において背景肝と腫瘍内部の信号値を測定した。背景肝は脈管を避けた径 1 cm の範囲の信号値を測定し腫瘍内部の信号値の背景肝に対する信号値の比を計測した。その比率が 1 以上であれば High-HCC と定義し、1 未満であれば Low-HCC と定義した。このカットオフ値はこれまでの報告を参考にした。この画像解析は 3 人の肝臓専門家が個別に評価した。

### 臨床病理学的解析

HighHCC と LowHCC は採血 data、ChildPughScore、病理組織型、分化度、脈管侵襲、TNM 分類を比較した。予後解析は手術日を基準として無再発生存率と生存率を比較した。術後検査は毎月の腫瘍マーカーの測定と 3 ヶ月後との CT 検査と EOBMRI を行った。

### 遺伝子解析

肝細胞癌の癌組織から RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて TotalRNA を抽出した。RNA の RIN は 5 以上とした。the 3' IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) を用い 100ng の TotalRNA から cRNA を合成し、HG133 Plus2.0 arrays (Affymetrix) を用いて Hybridization と signal detection を行った。計 18 個の microarray の data は R statistical software version 2.12.0 (R Development Core Team, 2010) の the robust multi-array average method を用いて解析した。microarray data から HighHCC と LowHCC で遺伝子発現が有意に異なる probe set を抽出した。

### 遺伝子発現機能解析

HighHCC に発現亢進していた遺伝子群から HighHCC で亢進している生物学的な機能を DAVID Bioinformatics Resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いて解析した。遺伝子群は the Gene Ontology terms (GOTERM\_BP\_FAT) と the KEGG pathway database (KEGG\_PATHWAY) を用いた。

### 免疫組織学的解析

SLC01B3 (OATP2/8) (1:500; Cell Signaling Technology; Beverly, MA)を用いて免疫染色を行った。免疫染色の評価は400倍で無作為に観察した3か所から2人の観測者で行った。SLC01B3陽性細胞の数を測定し0-1%を(-)、1-10%を(±)10%以上を(+)とした。陽性細胞の評価は cellSens Digital Imaging Software (Olympus, Tokyo, Japan). を用いた。

### 統計解析

統計解析は SPSS v. 21 (SPSS Inc., Chicago, IL) を解析 soft として用いた。data は平均±標準偏差で表記した。data は正規分布ではなかったため The Mann-Whitney *U* test で解析。予後解析は Kaplan-Meier analysis を用いた。P 値 0.05 以下を有意差とした。

### **【研究結果】**

77人の対象のうち HighHCC は14人、63人が LowHCC であった (Figure1)。この2群間の臨床病理解析結果は table1 に示した。Clinicalfeature、年齢性別、肝機能に関連する採血 data、背景肝疾患は有意な差を認めなかった。AFP は2群間で有意な差は認めなかったが、PIVKA-II は HighHCC が有意に低値を示していた。病理解析では HighHCC が LowHCC と比較して高率に高分化肝細胞癌が多いということが解った。また有意差はなかったが脈管浸潤が HighHCC は脈管侵襲が14%であるのに対し、LowHCC は29%であった。

予後の検討は2群間の経過観察期間は平均で782.3日であった。HighHCC の平均観察期間は508.8日で LowHCC の平均観察期間は466日で有意差は認めなかった。この観察期間で HighHCC は死亡がなく、全員が無再発生存状態であった。一方で両群の3年間生存率は HighHCC と LowHCC がそれぞれ90%と43%で無再発生存率は HighHCC の方が有意に良かった。(P=0.035) (Figure2)

### HighHCC と LowHCC の遺伝子発現解析

Gd-EOB-DTPA の取り込みに関連する肝細胞癌の遺伝子について DNAmicroarray を行ったところ、53個の発現亢進した遺伝子 probe set と発現抑制された71個遺伝子 probe set を特定した (Figure3)。

ADH1B, 4, 6 や CYP450family など肝代謝に関する遺伝子が HighHCC で有意に発現亢進していた。興味深い結果として SLC01B3 などの胆汁酸や bilirubin 輸送に重要な役割を果たす膜蛋白に関連する遺伝子発現も発現亢進していた。一方 CDK1, MST4, ASNS, CD24 などの apoptosis 関連遺伝子は HighHCC において発現抑制があった。

### EOB 取り込みに関連する遺伝子機能解析

HighHCC と LowHCC で有意に異なる遺伝子機能解析を行った。DAVID を用いて機能解析を行ったところ、酸化還元、薬剤代謝、ethanol 分解など、いくつか肝代謝経路に関連する遺伝子が HighHCC に発現亢進があった。この結果は Gene Ontology terms と KEGG pathway database の両方の解析で矛盾が無かった (table2)。さらに、organic anion transport and acidic amino acid transport などの anion transport 活性に関する遺伝子群の発現が亢進していた。

## 免疫組織学的解析

遺伝子解析の検証実験とし免疫組織学的解析を行った。SLC01B3 は organic anion transporter family の肝臓特有の protein のうちの一つであり、Gd-EOB-DTPA の取り込みに関連が強い可能性があるため SLC01B3 について解析を行った。HighHCC の 14 症例のうちすべてが強陽性であった。LowHCC も 2 例は陽性であったが、他のすべての蛋白発現は陽性~陰性であった。SLC01B3 の蛋白発現は有意に HighHCC に亢進していた (figure4)。

### 【考察】

本研究では HighHCC が PIVKA-II が低く高分化であることが解った。HighHCC と LowHCC は TNM 分類では同様の集団だが、無再発生存率は HighHCC が有意に良好であった。生存期間に関しても HighHCC が良好であったが統計的有意差はなかった。観察期間を延長し母集団を増やせば有意差が出ると考えている。さらに網羅的遺伝子解析において HighHCC がいくつか肝代謝機能や膜輸送に関連する遺伝子の発現が亢進していた。正常の肝機能に必要な蛋白質を code する遺伝子の発現が亢進しており HighHCC が高分化であり低悪性度な subtype であることが示唆された。このように EOBMRI 肝細胞造影相の信号値が悪性度を示すのであれば、生検などの侵襲的な検査を行わずに術前に肝細胞癌の悪性度を予測し得るようになる。また肝予備能が悪い肝細胞癌患者が HighHCC であった場合、縮小手術が許容され根治的治療ができる可能性がある。

これまでの他の報告でも HighHCC が LowHCC より低悪性であることが証明されている。また脈管侵襲が少なく、予後が良いという報告もある。しかし HighHCC の蛋白発現や遺伝子発現について述べた報告は少なく、網羅的遺伝子解析を行った報告は未だ無い。これまでの研究では SLC01B3、MRP2、MRP3 などの transporter や AFP、PIVKAII などの腫瘍マーカーや EpCAM などの肝幹細胞のマーカーや肝細胞癌の分化度のマーカーである glypican-3 蛋白発現や遺伝子発現と HighHCC との関連を解析した報告がある。これらは恣意的に選んだマーカーの解析であり HighHCC の特徴に最も重要な遺伝子とは主張できない。それに対し我々の網羅的遺伝子解析では HighHCC と関連するほぼすべての遺伝子や機能的遺伝子群について解析を行い、*ADH1B*, *ADH4*, *ADH6*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *CYP8B1*, *SLC01B3* など正常肝細胞で発現する遺伝子が LowHCC と比較して HighHCC に有意に発現していたこと証明した。それにより High-HCC が正常肝細胞の機能を保持し分化度が高く LowHCC よりも悪性度が低いことを証明した。遺伝子解析にて予後に関連する結論は得られなかったが、MRI 画像の違いによる遺伝子発現の差異について評価することができた。SLC01B3 は OrganicAnionTransporter の一つであり HighHCC で発現が亢進していた。一方で CDK1、や MST4、ASNS、CD24 などの apoptosis に関連する遺伝子に関して発現が低下していた。この結果も HighHCC の悪性度が低いことと関連があると考えている。

SLC01B3 は肝細胞に特異的な transporter を制御する遺伝子で、今回の研究にて SLC01B3 が HighHCC において発現が亢進していることがわかった。この網羅的遺伝子解析結果については validation study として RTPCR を行うべきであったが、十分な検体量がなく適正な解析ができなかった。そのため免疫組織学的解析で検証を行った。

近年、SLC01B3 の発現と EOBMRI 肝細胞造影相の造影効果に関連することが注目されている。SLC01B3 や MRP2、MRP3 は正常肝細胞の膜輸送蛋白で胆汁の取り込みや排出に関連し、Gd-EOB-DTPA

の代謝もこれらの transporter が関連すると考えられている。成田らは SLC01B3 と Gd-EOB-DTPA の取り込みの関連を免疫組織学的に証明した。さらに北野らは SLC01B3 以外に MRP3 も Gd-EOB-DTPA の取り込みと関連していると主張している。坪山らも MRP2 が Gd-EOB-DTPA の排泄を担っていると報告している。本研究の網羅的遺伝子解析では EOBMRI の造影効果と MRP2, MRP3 の関連性は低かった。一方で SLC01B3 は EOBMRI の肝細胞造影相の高信号と最も普遍的で重要な因子であることがわかった。

本研究の課題として、SLC01B3 以外の網羅的遺伝子解析結果について検証試験を行う必要がある。しかし本研究の最も重要な目的は HighHCC の悪性度を評価することであるため、Gene Ontology や KEGG pathway による解析結果は評価に十分な data と考える。

#### **【結語】**

本研究の臨床病理学的解析と網羅的遺伝子解析において HighHCC は LowHCC に対して悪性度が低いということ明らかになった。また胆汁酸や bilirubin 輸送に重要な役割を果たす SLC01B3 が HighHCC において発現亢進していたことが解った。

# 論文審査の要旨および担当者

報告番号	甲第 4889 号	三浦 智也
論文審査担当者	主査 渡邊 守 副査 河野 辰幸、立石 宇貴秀	
(論文審査の要旨)		
<b>1. 論文内容</b>		
<p>本論文は、肝細胞癌の評価法として有用性の高い Gd-EOB-DTPA を用いた造影 MRI (EOBMRI) に関して、肝細胞造影相で高信号となる特殊な肝細胞癌の臨床病理学的、遺伝子発現の特徴について検討し、新たな知見を得た論文である。</p>		
<b>2. 論文審査</b>		
<u>1) 研究目的の先駆性・独創性</u>		
<p>典型的な肝細胞癌は EOBMRI 肝細胞造影相で低信号域として描出されるが、6-15%に等～高信号の肝細胞癌を認め、Gd-EOB-DTPA の癌細胞への取り込みや排出に関わる transporter 発現の違いにより信号強度に変化が生ずると考えられている。申請者らは EOBMRI 肝細胞造影相で高信号となる肝細胞癌の生物学的特徴について検討したその着眼点は評価に値するものである。</p>		
<u>2) 社会的意義</u>		
<p>本研究で得られた主な結果は以下の通りである。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. 術前未治療の肝細胞癌根治的切除77例とし、77人中14人がHighHCCで、HighHCCではPIVKAI1が低く、高分化であったのを見出した事。</li><li>2. 3年間の無再発生存率はHighHCCが90%と、LowHCCの54%との間に有意の差を認めた事。</li><li>3. 網羅的遺伝子解析ではSLC01B3 が発現亢進していた事。</li></ol> <p>以上のように申請者は、臨床病理学的解析と網羅的遺伝子解析により、HighHCC はLowHCC に比して悪性度が低いということ明らかとし、また胆汁酸や bilirubin 輸送に重要な役割を果たす SLC01B3 が HighHCC において発現亢進しており、重要な遺伝子であると事も明らかとした。これは臨床的にも、基礎的にも極めて有用な研究成果であると言える。</p>		
<u>3) 研究方法・倫理観</u>		
<p>研究には申請者らの研究室の術前未治療の肝細胞癌根治的切除症例77例を用いた、臨床病理学的、遺伝子発現解析であり、申請者の研究に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。</p>		
<u>4) 考察・今後の発展性</u>		
<p>さらに申請者は肝細胞癌患者の Gd-EOB-DTPA による造影効果という MRI で取得可能ないろいろなパラメーターの一つのファクターにのみを検討して得られたものであり、先駆的ではあるがま</p>		

だ発展途上の領域であると十分理解しており、今後の研究にて、さらに発展することが期待される。

### 3. その他

特になし

### 4. 審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。