

Title	The study for the clinical significance of detection and quantification of circulating cancer cells in hepatocellular carcinoma
Author(s)	宮本, 敦史
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43249">https://hdl.handle.net/11094/43249</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	宮本敦史
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16425 号
学位授与年月日	平成13年5月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	The study for the clinical significance of detection and quantification of circulating cancer cells in hepatocellular carcinoma (肝細胞癌症例における血中癌細胞の検出・定量と臨床的意義に関する研究)
	(1) Development of a multiple-marker RT-PCR assay for detection of micrometastases of hepatocellular carcinoma
	(2) Clinical application of quantitative analysis for detection of hematogeneous spread of hepatocellular carcinoma by real-time PCR
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人
	(副査) 教授 林 紀夫 教授 野口眞三郎

## 論文内容の要旨

## 【目的】

肝細胞癌は、他の消化器癌と異なり、病巣の完全切除を施行しえても高率に残肝再発を来すが、その進展形式の詳細については未だ十分に解明されていない。最近、分子生物学的手法の発展により、リンパ節や血液中の極少数の癌細胞の検出が可能になり、各種癌における high risk group の選別や予後因子としての意義が検討されている。肝細胞癌でも Albumin や  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) 遺伝子の発現検索による血中の肝細胞癌細胞の検出の報告はあるが、非担癌肝硬変症例や健常者の血中でも発現を認めること等の問題が指摘され、その方法論と臨床的意義については疑問視されているところである。従来の方法は定性的であり、この問題を解決するためには、最終 PCR 産物ではなく、検体中に存在する癌細胞数の定量化が不可欠である。

本研究においては、肝細胞癌症例における癌細胞の全身散布の可能性を検討するために、まず、切除症例において、AFP、上皮細胞特異的発現を示す遺伝子 (CK-20)、腫瘍特異的発現を示す遺伝子 (MAGE-I、MAGE-III) が遺伝子マーカーとなり得るかを検討し、さらには、リアルタイムモニタリングシステム (LightCycler™) を用いた RT-PCR 法により、末梢血中での発現の定量化を行った。そして、肝細胞癌切除症例の末梢血液中での、これらの遺伝子発現量と、再発時期、部位などの予後との関連について検討した。

## 【方法ならびに成績】

## 〈対象・方法〉

## (1) 遺伝子発現の検索

4 種類の肝細胞癌の細胞株 (HLE、HLF、HuH7、PLC/PRF5)、肝細胞癌切除症例21例 (24結節) の腫瘍部、健常者31例の末梢血より  $1\mu\text{g}$  の RNA を抽出し、逆転写の後、40サイクルの PCR を行い AFP、CK-20、MAGE-I および MAGE-III の発現の有無を調べた。

## (2) リアルタイムモニタリングシステム (LightCycler™) による遺伝子発現の定量

肝細胞癌切除症例23例の肝切除前・後の末梢血 (肝切除前: 16、肝切除後: 23、合計39検体) を対象とし、各検体から抽出した RNA  $1\mu\text{g}$  を用いて40サイクルの PCR を行った。この際、E.Coli から抽出した RNA に、肝細胞癌株 (HuH7 および HLE) から抽出した RNA を  $1\sim 1 \times 10^6 \mu\text{g}$  ずつ加えて total RNA:  $1\mu\text{g}$  に調整した希釈系列を standard とし、増幅される PCR 産物に特異的に結合する蛍光プローブを用いて、PCR の各サイクル毎に standard

および検体から放出される蛍光を検出し定量した。健常者31例、非担癌肝硬変症例10例、肝細胞癌以外の肝切除症例5例の末梢血（45検体）をコントロールとした。

#### 【成績】

##### (1)肝細胞癌細胞株および肝細胞癌切除症例の腫瘍部における各遺伝子の発現

HLE および PLC/PRF5 では全ての遺伝子の発現を認め、HLF では AFP 以外の 3 つの遺伝子の、HuH7 では MAGE- I 以外の 3 つの遺伝子の発現を認めた。腫瘍部における発現率は AFP : 83% (20/24)、CK-20 : 83% (20/24)、MAGE- I : 67% (16/24)、MAGE-III : 67% (16/24) であり、全例で少なくとも一つの遺伝子の発現を認めた。以上の検討より、これら 4 つの遺伝子は肝細胞癌細胞の遺伝子マーカーとなりうる可能性が示された。

##### (2)健常者の末梢血における各遺伝子の発現

健常者31例の末梢血では、MAGE- I および MAGE-III は全く発現を認めなかった。一方、AFP は 1 例、CK-20 は 8 例で発現を認めた。CK-20 は健常者の末梢血中においても発現を認める率が高いため、以下の検討は AFP、MAGE- I および MAGE-III について行った。

##### (3)リアルタイムモニタリングシステム (LightCycler™) を用いた遺伝子発現量の定量

コントロールである健常者、非担癌肝硬変症例および肝細胞癌以外の肝切除施行例の末梢血においては、いずれの遺伝子も発現は検出されなかった。肝細胞癌切除症例では、23例の39検体のうち10検体（肝切除前：2、肝切除後：8検体）で AFP 遺伝子の発現が検出された。発現量は  $4.0 \times 10^5$  から  $1.0 \times 10^6 \mu\text{g}$  の RNA 相当量であった。一方、MAGE- I および MAGE-III は全く検出されなかった。

##### (4)AFP 遺伝子発現量と臨床的因子との相関

肝切除後の検体に関してみると、23例中 8 例で発現が検出されたが、これら 8 例では発現が検出されなかった15例と比較して多発症例が有意に多かった。また、これら 8 例の中で、発現量の多い 3 例が術後早期に再発を来し、さらにこのうち 2 例は肺、骨などの肝外臓器にも転移再発を来していた。

#### 【総括】

以上よりリアルタイムモニタリングシステム (LightCycler™) を用いた定量的 PCR 法による AFP mRNA 定量は血中の極少数の癌細胞検出に対する有効な方法であるのみならず、さらには、発現量の多い症例が術後早期に再発を来していることから、術後再発に関する high risk group の選別など、臨床的に有意義な方法であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

肝細胞癌は、肝切除を含めた集学的治療を行っても高率に再発を来す特徴がある。再発の中でも、多中心性発生を除いた、いわゆる遺残再発や肝外再発の大部分は血行性に癌細胞が進展することに起因すると考えられている。それらを検出する方法として、AFP をターゲットとした nested PCR による検出法が報告されてきた。しかしながら、nested PCR により感度が向上した反面、偽陽性がみられること、および遺伝子発現を量的に評価できないことから、その臨床的意義に関しては結論には至っていない。

本研究においては、まず、MAGE 遺伝子が肝細胞癌において高率に発現しており、新たな遺伝子マーカーとなり得る可能性があることと、および MAGE を含めた複数の遺伝子発現を同時に検索することで、従来 AFP をターゲットとした nested PCR と同程度の感度が得られることを明らかにした。さらに、定量的 PCR 法を用いて、術後の末梢血中に AFP mRNA が検出された症例は有意に再発率が高く、それらの中でも、再発を認めた症例は mRNA 量が多い症例であることが明らかになった。

本研究は、肝細胞癌切除症例における血液中の癌細胞を分子生物学的手法を用いて、検出・定量することで、術後再発に対する high risk group を選別し得る可能性があること示し、今後、予後の予測や補助療法が必要な症例の選別という点において、臨床応用が期待される方法であることを示したものと評価でき、博士（医学）の学位に値するものと認める。