

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461805

研究課題名(和文)肝細胞癌の分子病理学的バイオマーカーと画像所見の関連に関する研究

研究課題名(英文)Correlation between molecular biomarker and imaging findings in hepatocellular carcinoma

研究代表者

松井 修 (Matsui, Osamu)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任教授

研究者番号：10019961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌のGd-EOB-DTPA造影MRI肝細胞相における信号増強率は肝癌細胞におけるOATP1B3発現量に比例して有意に増加することを明らかにし、癌細胞におけるOATP1B3発現の間接的な分子イメージングであることを示した。また、OATP1B3の発現は転写因子HNF4aやb-cateninによって制御されている可能性が高いことを明らかにした。この結果から、肝癌のsubtypeを画像所見で認定することが可能となり、臨床の現場での個別化医療に貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：The significant positive correlation between grades of OATP1B3 expression and enhancement ratio on hepatobiliary phase of Gd-EOB-DTPA enhanced MR imaging in hepatocellular carcinoma (HCC) was verified in this study. In addition, the highly significant correlation between HNF4a, b-catenin and OATP1B3 expression in HCC cells was also revealed. These results made it possible to sub-classify HCCs, resulting in possible application for future personalized medicine in the patients with HCCs easily in daily practice.

研究分野：放射線医学

キーワード：肝細胞癌 Gd-EOB-DTPA造影MRI OATP1B3 b-catenin mutation HNF4a 個別化医療

1. 研究開始当初の背景

肝癌は世界では5番目に多い癌でありまた年間630万人前後の新しい患者の発生が見られている。わが国ではC型肝炎ウイルスに由来する肝癌が約80%を占めるがその発生ピークは越えたものと推定されているが、しかしながら欧米では急速な増加傾向がみられ、今後とも世界におけるもっとも重要な制圧すべき悪性腫瘍である。肝細胞癌(肝癌)は遺伝子学的あるいは分子病理学的に多彩であり、またそれに伴って様々な生物学的特徴を有することが近年明らかになりつつあった。

一般臨床における各種画像所見(MRI, CTなど)も分子病理学的なメカニズムで規定されていることが明らかとなりつつあり、したがって、分子バイオマーカーと画像所見の対比からバイオマーカーを推定できる可能性が大きい(画像バイオマーカー)と考えられた。しかしながら肝癌においてはその分子病理学的背景と画像所見の関連に関する研究はほとんどなされていなかった。

我々は本研究の開始時まで、2008年に我が国に導入されたMRI肝細胞性造影剤であるGd-EOB-DTPAの肝癌への取り込には肝細胞トランスポーターOATP8(OATP1B3)が関与し、一方、排泄系トランスポーターとしてはMRP3が重要な役割を担っていることを世界で初めて明らかにした(Kitao A, Matsui O, et al. Radiology. 2010;256:817-26)。さらにこのOATP8発現は肝癌の多段階発癌とともに減少することを分子免疫組織学的に明らかにし(Kitao A, Matsui O. et al. Eur Radiol. 2011;21:2056-66)、Gd-EOB-DTPA造影MRI肝細胞相における肝癌の信号強度が肝癌の多段階発癌尾の有用なバイオマーカーとなりうる可能性を示した。さらに、肝癌におけるCK19発現と悪性度および画像との関連を検討した(Yoneda N, Matsui O et al. Lab Invest.

2011 ;91:262-72)。これらの研究を継続しさらに他の重要な肝癌の分子マーカー発現との関連を検討することは今後の肝癌画像診断に新しい展開(ブレイクスルー)をもたらすものと考えられた。

こうした肝癌に対する個別化医療の重要性の認識とそのための画像と分子病理学的背景の研究の必要性の高まりに加えて、我々のこうした領域の研究におけるこれまでの実績から、以下の研究を行うことが必要と考えられた。

2. 研究の目的

(1) **(研究1と研究の目的) Gd-EOB-DTPA 造影MRI 肝細胞相で高信号を示す肝細胞癌(高信号肝癌)の分子病理学的背景の検討**: 我々は高信号肝癌は生物学的に浸潤性が弱くAFPを産生しない肝細胞癌の亜型であることを見出し報告した(Kitao A, Matsui O, Yoneda N, et al. Radiology. 2012;265:780-9)。その分子病理学的背景を明らかにすることを目的とした。

(2) **(研究2と研究の目的) Beta-catenin の変異を伴う肝細胞癌(beta-catenin HCC)の画像と病理学的特徴に関する研究**: Beta-catenin 高発現肝癌は比較的頻度の高い肝細胞癌における遺伝子変異型であり、その画像的・病理的特徴を明らかにすることを目的とした。

(3) **(研究3と研究の目的) OATP1B3高発現肝癌(高信号肝癌)の分子・遺伝子学的背景に関する研究**: 我々は肝細胞癌のGd-EOB-DTPA造影MRI肝細胞相における造影の度合い(enhancement ratio)(OATP1B3の発現の度合い)が肝細胞癌の分子病理学的亜型と相関することを予測した。そこで、肝細胞癌の遺伝子プロファイル・分子病理学的背景とOATP1B3高発現の関連を検討することを目的とした。またその結果を臨床における予後と比較し検証することを目的とした。

(4) **(研究4と研究の目的) 肝細胞癌における**

HNF4a発現とOATP1B3発現およびGd-EOB-DTPA造影MRI肝細胞相の信号強度の関連に関する研究

上記の研究から、HNF4aは肝細胞膜トランスポーターOATP1B3の発現を制御に關与する転写因子であり、肝細胞の恒常性の維持や癌抑制遺伝子としての働きも有すると考えられたため、肝細胞癌におけるHNF4Aの発現とEOB-MRI肝細胞相での所見との相関について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) (研究1の方法)

89例の外科切除で確認された肝細胞癌と対象とした。これらを、Gd-EOB-DTPA肝細胞相の所見で周辺肝より高信号を示すもの(高信号肝癌 n=18)と低信号を示すもの(低信号肝癌 n=71)の二群に分類した。各症例で、OATP1B3, AFP, PIVKA-II, hepatic stem cell Markers; epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), cytokeratin 19 (CK19), neural cell adhesion molecule (NCAM); biliary marker: CK7; hepatocyte marker: hepatocyte paraffin 1 (HepPar1); markers of HCC differentiation: glypican-3; signaling: beta-cateninの発現を免疫組織学的に検討し、これらの発現の差異を二群間で比較検討した。

(2) (研究2の方法)

138例の肝細胞癌切除例を対象として検討を行った。免疫組織学的にbeta-cateninとそのtranscriptional productであるglutamine synthetase (GS)の発現程度から三群に分類した。すなわち、the b-cateninとGSがともに高発現を示すb-catenin変異(高発現)肝癌、b-catenin低発現GS高発現肝癌(中間型肝癌)と両方が低発現の肝癌に分類した。これらの三群間で臨床的、病理学的、画像的差異を比較検討した。比較した画像所見は、ダイナミックCT、Gd-EOB-DTPA造影MRI (T1-weighted, T2-weighted, diffusion-weighted, and

hepatobiliary phase imaging)である。免疫組織学的なOATP1B3発現との関連も検討した。

(3) (研究3の方法)

238例の肝癌マイクロアレイデータを用いてOATP1B3の遺伝子発現に關わる転写因子、パスウェイ解析を行った。金沢大学で外科切除を受けた70例の肝癌のEOB造影MRI (EOB-MRI)と遺伝子、蛋白発現を解析した。また新鮮切除標本から細胞を調整しレトロウイルスを用いて遺伝子発現を制御、マウスに移植しEOB-MRI所見との関連について解析した。全国多施設共同研究でEOB-MRI所見が解析できるBCLCステージ0およびAの肝癌外科切除例102例について予後を解析した。

(4) (研究4の方法)

対象は外科的に切除された肝細胞癌135結節。肝細胞癌および背景肝における免疫染色でのHNF4A発現の程度を発現なし、弱発現、中等度発現、高発現と半定量的に評価した。OATP1B3発現についても、背景肝と比較して発現なし、低発現、等発現、高発現と半定量的に評価した。肝細胞癌におけるHNF4A発現とOATP1B3発現、EOB-MRI肝細胞相における増強率:(造影後SI-造影前SI)/造影前SI、腫瘍の分化度(高分化、中分化、低分化)、背景肝におけるHNF4A発現との相関について検討した。

4. 研究成果

(1) (研究1の成果)

Gd-EOB-DTPA造影MRI肝細胞相で高信号を示す肝細胞癌は成熟肝細胞(mature hepatocyte)の性状に類似した特徴を有する亜型と考えられた。また、AFPや高悪性度の指標である他のバイオマーカー発現の弱い肝癌であることも示された[7]。

(2) (研究2の成果)

b-catenin mutation型肝細胞癌(n=27)は拡散強調像で有意に低信号、有意に高いADC値、有意に高い肝細胞相での信号強度を示すことが明らかとなった[3]。

(3) (研究3の成果)

肝癌の約15%でOATP1B3は背景肝と同程度もしくはそれ以上に発現が認められ(OATP1B3陽性群)、胆汁酸制御パスウェイの亢進、肝細胞マーカーの発現亢進、肝細胞機能維持に関わる転写因子HNF4Aの活性化が認められた。マウス移植モデルでEOB-MRI所見を検討、HNF4A遺伝子発現抑制はOATP1B3陽性肝癌細胞のOATP1B3の発現低下、EOB-MRI取り込みの低下、腫瘍増殖能の亢進を誘導した。独立した2つのコホート(金沢大学、全国多施設)において、OATP1B3陽性群、AFP低値群、AFP高値群の順に切除後の全生存率低下が認められた。EOB-MRIとAFPにより肝癌を切除前に3つのサブタイプに分類することが可能であり、転写因子HNF4AおよびFOXO1の活性を反映した転写プログラム、悪性度の違いによると思われる全生存率の違いが認められた[5]。

(4) (研究4の成果)

肝細胞癌のHNF4A発現とOATP1B3の発現、肝細胞相における増強率との間には正の相関が認められた。腫瘍の分化度が低下するにつれてHNF4Aの発現低下が認められた[論文作成中]。

(5) 研究成果の総括

我々は、肝癌のGd-EOB-DTPA造影MRI肝細胞相における信号増強率は肝癌細胞におけるOATP1B3発現量に比例して有意に増加することを明らかにした。すなわち、Gd-EOB-DTPA造影MRI肝細胞相の癌細胞におけるOATP1B3発現の間接的な分子イメージングと考えられる。さらに、OATP1B3-high肝癌とOATP1B3-lowでAFP値が100以上の肝癌の間で遺伝子発現に有意の差異があり、OATP1B3-lowでAFP値100以下の肝癌はこれらの中間の遺伝子発現を示すことが明らかとなった。OATP1B3-high肝癌(EOB-MRI肝細胞相で高信号肝癌に相当)ではALB、CYP3A4などの肝細胞機能遺伝子の高発現が見られ、

胆汁代謝など肝細胞機能の維持に関わるような経路が活性化され、また、OATP1B3の発現は転写因子HNF4 α によって制御されている可能性が高いことが示唆された。我々は、Gd-EOB-DTPA造影MRI肝細胞相における高信号肝癌(OATP1B3高発現肝癌)は低信号肝癌に比べて生物学的より低侵襲性で予後良好であることを報告したが、これに合致する所見であった。これらの知見に基づき、EOB-MRI肝細胞相での信号強度と血清AFPの値により肝癌は遺伝子学・分子病理学的に3群のsubtypeに分類(A:EOB-MRI高信号、血清AFP低値、B:EOB-MRI低信号、血清AFP低値、C:EOB-MRI低信号、血清AFP高値)し、3群で生存率を比較すると、A,B,Cの順に生存率が有意に低下することが明らかになった。以上の結果から、一般臨床で容易に肝癌の背景分子メカニズムの推測、予後予測を行える方法として、EOB-MRIと血清AFP値による分類を提唱した。遺伝子学的にA群はmature hepatocyte系の、C群はstem-cell系の肝癌と考えられた。HNF4 α は肝細胞におけるOATPグループの発現制御機能などに加えて、その減少は肝発癌の重要なイニシエーターの一つであり多段階発癌の進行とともにさらに減少すること、実験肝癌の発育を抑制すること[5]やWnt/ β -catenin系による上皮間葉移行(epithelial mesenchymal transition; EMT)発現を抑制すること、などが知られている。こうした知見は、高信号肝癌におけるOATP1B3高発現、肝癌における高率な低信号化や高信号肝癌の低悪性度などとよく合致する。HNF4 α はさらに多くの分子機構と関連し、今後EOB-MRI所見からより多くの分子機構が推定できる可能性がある(radiogenomics)。

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39件)

Yoneda N, Matsui O, Ikeno H, Inoue D, Yoshida K, Kitao A, Kozaka K, Kobayashi S, Gabata T, Ikeda H, Nakamura K, Ohta T. Correlation between Gd-EOB-DTPA-enhanced MR imaging findings and OATP1B3 expression in chemotherapy-associated sinusoidal obstruction syndrome. 査読あり. *Abdom Imaging*. 2015;40:3099-103. doi: 10.1007/s00261-015-0503-z.

Wu Z, Matsui O, Kitao A, Kozaka K, Koda W, Kobayashi S, Ryu Y, Minami T, Sanada J, Gabata T. Hepatitis C related chronic liver cirrhosis: feasibility of texture analysis of MR images for classification of fibrosis stage and necroinflammatory activity grade. *PLoS One*. 2015 5;10:e0118297. doi: 10.1371/journal.pone.0118297. 査読あり

Kitao A, Matsui O, Yoneda N, Kozaka K, Kobayashi S, Sanada J, Koda W, Minami T, Inoue D, Yoshida K, Yamashita T, Yamashita T, Kaneko S, Takamura H, Ohta T, Ikeda H, Nakanuma Y, Kita R, Gabata T. Hepatocellular Carcinoma with β -Catenin Mutation: Imaging and Pathologic Characteristics. *Radiology*. 査読あり. 2015 ;275:708-17. doi: 10.1148/radiol.14141315.

Sasaki M, Yoneda N, Sawai Y, Imai Y, Kondo F, Fukusato T, Yoshikawa S, Kobayashi S, Sato Y, Matsui O, Nakanuma Y. Clinicopathological characteristics of serum amyloid A-positive hepatocellular

neoplasms/nodules arising in alcoholic cirrhosis. *Histopathology*. 査読あり. 2015;66:836-45. doi: 10.1111/his.12588.

Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang X, Kaneko S. Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 査読あり. 2014;60:1674-85. doi: 10.1002/hep.27093.

Endo T, Kozaka K, Kobayashi S, Sanada J, Koda W, Minami T, Kitao A, Yoneda N, Nakanuma Y, Gabata T, Matsui O. Hemodynamics and progression of a hypervascular focus in a borderline lesion of hepatocellular carcinoma: analysis by angiography-assisted CT and histopathology. *Jpn J Radiol*. 査読あり. 2014;32:69-79. doi: 10.1007/s11604-013-0268-7.

Yoneda N, Matsui O, Kitao A, Kita R, Kozaka K, Koda W, Kobayashi S, Gabata T, Ikeda H, Nakanuma Y. Hypervascular hepatocellular carcinomas showing hyperintensity on hepatobiliary phase of gadoteric acid-enhanced magnetic resonance imaging: a possible subtype with mature hepatocyte nature. *Jpn J Radiol*. 査読あり. 2013;31:480-90. doi: 10.1007/s11604-013-0224-6.

Sasaki M, Kondo F, Sawai Y, Imai Y, Kadowaki S, Sano K, Fukusato T,

Matsui O, Nakanuma Y. Serum amyloid A-positive hepatocellular neoplasms in the resected livers from 3 patients with alcoholic cirrhosis. *Histol Histopathol.* 査読あり.

2013;28:1499-505.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23690168>

Kudo M, Matsui O, Sakamoto M, Kitao A, Kim T, Ariizumi S, Ichikawa T, Kobayashi S, Imai Y, Izumi N, Fujinaga Y, Aii S. Role of gadolinium-ethoxybenzyl-diethylene triamine pentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging in the management of hepatocellular carcinoma: consensus at the Symposium of the 48th Annual Meeting of the Liver Cancer Study Group of Japan. *Oncology.* 査読あり. 2013;84 Suppl 1:21-7.

doi: 10.1159/000345885.

Wu Z, Matsui O, Kitao A, Kozaka K, Koda W, Kobayashi S, Ryu Y, Minami T, Sanada J, Gabata T. Usefulness of Gd-EOB-DTPA-enhanced MR imaging in the evaluation of simple steatosis and nonalcoholic steatohepatitis. *J Magn Reson Imaging.* 査読あり.

2013;37:1137-43.

doi: 10.1002/jmri.23921.

[学会発表](計50件)

Osamu Matsui. Molecular/genetic mechanism of Gd-EOB-DTPA enhanced MRI for hepatocellular carcinoma: From early diagnosis to personalized medicine. 5th Asian Congress of Abdominal Radiology (ACAR 2015). 2015年6月20日. アクトシティ浜松(浜松).
Osamu Matsui. Advances in imaging

modalities for HCC. ewalt

(Eastern&Western Association Liver Tumors). 2015年1月22日. ミラン(イタリア).

Osamu Matsui. Gd-EOB-DTPA enhanced MRI for hepatocellular carcinoma: Correlation with molecular and genetic pathology. APPLE2014. 2014年7月11日. 台北.(台湾).

[図書](計3件)

松井 修. 医学書院.

肝動脈化学塞栓療法(TACE). 2015年. 238.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

松井 修(MATSUI, Osamu)

金沢大学・大学院医薬保健学総合研究科・特任教授

研究者番号: 10019961

(2)研究分担者

小林 聡(KOBAYASHI, Satoshi)

金沢大学・大学院医薬保健学総合研究科・教授

研究者番号: 30313638

(3)研究分担者

小坂 一斗(Kozaka Kazuto)

金沢大学・大学院医薬保健学総合研究科・助教

研究者番号: 80547175