

# In vivo analysis of the effect of antiangiogenic drug on hepatocarcinogenesis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-12-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Matsui, Osamu メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00049402">https://doi.org/10.24517/00049402</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



---

血管新生阻害剤の肝癌多段階発癌への影響の  
インビボ解析：画像診断と塞栓療法への応用

---

18591332

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成20年4月

研究代表者 松 井 修

金沢大学附属図書館



1300-04649-X

大学院医学系研究科教授

---

血管新生阻害剤の肝癌多段階発癌への影響の  
インビボ解析：画像診断と塞栓療法への応用

---

18591332

平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

金沢大学附属図書館



1300-04649-X

平成 20 年 4 月

研究代表者 松 井 修

金沢大学大学院医学系研究科教授

著 者 寄 贈

## はしがき

肝細胞癌（肝癌）は肝硬変を基盤として多段階的に発生することが多い。この過程での血管新生阻害剤による血管新生抑制は肝癌の発生や進展を抑制することが期待される。こうした新しい治療法を開発することを目的として、血管新生のメカニズムについて基礎的・臨床的研究を行った。最終的には、現在臨床の現場で行われている画像診断と肝動脈塞栓療法への応用を目標とする。

## 研究組織

研究代表者 : 松井 修 (金沢大学大学院医学系研究科教授)

(研究協力者 : 新村理絵子、中村功一、刘 屹)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	1,800,000	0	1,800,000
平成19年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

## 研究発表

### (1) 雑誌論文

1. Okumura E, Sanada S, Suzuki M, Matsui O. A computer-aided temporal and dynamic subtraction technique of the liver for detection of small hepatocellular carcinomas on abdominal CT images. *Phys Med Biol.* 51(19):4759-4771, 2006.
2. Miyayama S, Matsui O, Zen Y, Yamashiro M, Ryu Y, Minami T, Notsumata K, Tanaka N. Focal hepatic lesions mimicking cavernous hemangioma supplied by the portal vein. *Hepatol Res.* 36(1):70-73, 2006.
3. Iannaccone R, Federle MP, Brancatelli G, Matsui O, Fishman EK, Narra VR, Grazioli L, McCarthy SM, Piacentini F, Maruzzelli L, Passariello R, Vilgrain V. Peliosis hepatis: spectrum of imaging findings. *Am J Roentgenol.* 187(1):W43-52, 2006.
4. Terayama N, Sanada J, Matsui O, Kobayashi S, Kawashima H, Yamashiro M, Takanaka T, Kumano T, Yoshizaki T, Furukawa M. Feeding artery of laryngeal and hypopharyngeal cancers: role of the superior thyroid artery in superselective intraarterial chemotherapy. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 29(4):536-543, 2006.
5. Miyayama S, Matsui O, Taki K, Minami T, Ryu Y, Ito C, Nakamura K, Inoue D, Notsumata K, Toya D, Tanaka N, Mitsui T. Extrahepatic blood supply to hepatocellular carcinoma: angiographic demonstration and transcatheter arterial chemoembolization. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 29(1):39-48, 2006.
6. Kusanagi M, Matsui O, Sanada J, Ogi T, Takamatsu S, Zhong H, Kimura Y, Tabata Y. Hydrogel-mediated release of basic fibroblast growth factor

- from a stent-graft accelerates biological fixation with the aortic wall in a porcine model. *J Endovasc Ther.* 14:785-793, 2006.
7. Kobayashi S, Matsui O, Kamura T, Yamamoto S, Yoneda N, Gabata T, Terayama N, Sanada J. Imaging of benign hypervascular hepatocellular nodules in alcoholic liver cirrhosis: differentiation from hypervascular hepatocellular carcinoma. *J Comput Assist Tomogr.* 31:557-563, 2007.
  8. Matsui O, Gabata T, Kobayashi S, Terayama N, Sanada J, Kouda W, Kawashima H. Imaging of multistep human hepatocarcinogenesis. *Hepatol Res.* 37 Suppl 2: S200-205, 2007.
  9. Miyayama S, Matsui O, Yamashiro M, Ryu Y, Takata H, Takeda T, Aburano H, Shigenari N. Visualization of hepatic lymphatic vessels during transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol.* 18:1111-1117, 2007.
  10. Kobayashi S, Matsui O, Gabata T, Sanada J, Koda W, Minami T, Kobayashi T. Hemodynamics of small sclerosing hepatocellular carcinoma without fibrous capsule: evaluation with single-level dynamic CT during hepatic arteriography. *Abdom Imaging.* 2007:27; [Epub ahead of print]
  11. Nakamura K, Zen Y, Sato Y, Kozaka K, Matsui O, Harada K, Nakanuma Y. Vascular endothelial growth factor, its receptor Flk-1, and hypoxia inducible factor-1alpha are involved in malignant transformation in dysplastic nodules of the liver. *Hum Pathol.* 38:1532-1546, 2007.
  12. Efremidis SC, Hytiroglou P, Matsui O. Enhancement patterns and signal-intensity characteristics of small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: pathologic basis and diagnostic challenges. *Eur Radiol.* 17:2969-2982, 2007.

13. Gabata T, Matsui O, Terayama N, Kobayashi S, Sanada J. Imaging diagnosis of hepatic metastases of pancreatic carcinomas: significance of transient wedge-shaped contrast enhancement mimicking arterioportal shunt. *Abdom Imaging*. 2007 Jul 4; [Epub ahead of print]
14. Kozaka K, Sasaki M, Fujii T, Harada K, Zen Y, Sato Y, Sawada S, Minato H, Matsui O, Nakanuma Y. A subgroup of intrahepatic cholangiocarcinoma with an infiltrating replacement growth pattern and a resemblance to reactive proliferating bile ductules: 'bile ductular carcinoma'. *Histopathology*. 51:390-400, 2007.
15. Sato Y, Sawada S, Kozaka K, Harada K, Sasaki M, Matsui O, Nakanuma Y. Significance of enhanced expression of nitric oxide synthases in splenic sinus lining cells in altered portal hemodynamics of idiopathic portal hypertension. *Dig Dis Sci*. 52:1987-1994, 2007.
16. Miyayama S, Matsui O, Yamashiro M, Ryu Y, Kaito K, Ozaki K, Takeda T, Yoneda N, Notsumata K, Toya D, Tanaka N, Mitsui T. Ultraselective transcatheter arterial chemoembolization with a 2-f tip microcatheter for small hepatocellular carcinomas: relationship between local tumor recurrence and visualization of the portal vein with iodized oil. *J Vasc Interv Radiol*. 18:365-376, 2007.
17. Liu Y, Matsui O. Changes of intratumoral microvessels and blood perfusion during establishment of hepatic metastases in mice. *Radiology*. 243(2):386-395, 2007.
18. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Tsuji H, Sakai Y, Kitahara M, Arai K, Yamashita T, Yokoyama K, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S. Combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with intratumoral

- dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma: clinical safety. *Clin Exp Immunol.* 147:296-305, 2007.
19. Gabata T, Terayama N, Kobayashi S, Sanada J, Kadoya M, Matsui O. MR imaging of hepatocellular carcinomas with biliary tumor thrombi. *Abdom Imaging.* 32:470-474, 2007.
  20. Okumura E, Sanada S, Suzuki M, Takemura A, Matsui O. Improvement of temporal and dynamic subtraction images on abdominal CT using 3D global image matching and nonlinear image warping techniques. *Phys Med Biol.* 52(21):6461-6474, 2007.
  21. Terayama N, Matsui O, Kobayashi S, Sanada J, Gabata T, Koda W, Minami T. Portosystemic shunt on CT during arterial portography: prevalence in patients with and without liver cirrhosis. *Abdom Imaging.* 33(1):80-86, 2008.
  22. Shinmura R, Matsui O, Kadoya M, Kobayashi S, Terayama N, Sanada J, Demachi H, Gabata T. Detection of hypervascular malignant foci in borderline lesions of hepatocellular carcinoma: comparison of dynamic multi-detector row CT, dynamic MR imaging and superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging. *Eur Radiol.* 2008 Apr 2; [Epub ahead of print]
  23. Miyayama S, Matsui O, Yamashiro M, Ryu Y, Takata H, Takeda T, Aburano H, Shigenari N. Detection of hepatocellular carcinoma by CT during arterial portography using a cone-beam CT technology: comparison with conventional CTAP. *Abdom Imaging.* 2008 Mar 29; [Epub ahead of print]



## (2) 学会発表

1. 川井恵一、香田 渉、松井 修：肝細胞癌の血流動態に基づく RFA 効果判定の提案：動注 CT を基準とした三次元回転補正合成画像作成。（第 65 回日本医学放射線学会学術発表会、2006. 4. 7-9、横浜）
2. 新村理絵子、松井 修、蒲田敏文、他：肝細胞性結節性病変の結節内血行支配と SPI0 造影 MRI 所見の比較。（第 65 回日本医学放射線学会学術発表会、2006. 4. 7-9、横浜）
3. 眞田順一郎、松井 修、寺山 昇、他：B 型大動脈解離に対する MK ステントグラフトの応用。（第 35 回日本 IVR 学会総会、2006. 5. 18-20、大阪）
4. 中村功一、全 陽、松井 修、他：肝細胞癌発癌過程における類洞毛細血管化と VEGF 発見に関する病理学的検討。（第 42 回日本肝臓学会総会、2006. 5. 25-26、京都）
5. Matsui O: Third inflow into the liver: its implication for focal parenchymal changes and imaging. (29<sup>th</sup> Scientific Assembly and Annual Meeting of the Korean Society of Abdominal Radiology, June 3, 2006, Korea)
6. 松井 修：教育講演 解剖と臨床「胃静脈の流入変異：画像と流入域の肝実質性変化」（第 10 回臨床解剖研究会、2006. 6. 17、東京）
7. Matsui O: Hepatocellular carcinoma: imaging update. (ESGAR 2006, June 19-23. 2006, Greece)
8. 草薙実穂、眞田順一郎、松井 修、他：胸部下行大動脈破裂に対する緊急ステントグラフト内挿術。（第 12 回日本血管内治療学会総会、2006. 6. 30-7. 1、三重）
9. 新村理絵子、松井 修、小林 聡、他：肝動脈造影下 CT (CTHA) における多血性偽病変の SPI0 造影 MRI 像。（第 42 回日本肝臓学会、2006. 7. 6-7、東京）

10. Matsui O: Blood supply of hepatic tumors: to perform interventional therapy more effectively. (The 7<sup>th</sup> Congress of Chinese Society of Interventional Radiology, July 12-17, 2006, China)
11. Matsui O: Hemodynamics of the liver and hepatic tumours as a basis for imaging diagnosis and intervention. (11<sup>th</sup> Asian Oceanian Congress of Radiology, August 6-9, 2006, Hong Kong)
12. Matsui O: Endovascular therapy for thoracic aortic aneurysms with custom-made nitinol stentgraft. (11<sup>th</sup> Asian Oceanian Congress of Radiology, August 6-9, 2006, Hong Kong)
13. Liu Y, Matsui O: Stepwise changes of intratumoral microvessels and blood perfusion during the establishment of hepatic metastases in mice. (11<sup>th</sup> Asian Oceanian Congress of Radiology, August 6-9, 2006, Hong Kong)
14. Minami T, Miyayama S, Matsui O, et al: Clinical results of balloon-occluded retrograde transvenous obliteration of gastric and duodenal varices. (CIRSE 2006, Sept. 9-13, 2006, Rome, Italy)
15. 松井 修: 基調講演「肝血流画像の潮流」 (第13回肝血流動態イメージ研究会、2007. 1. 27-28, 横浜)
16. Kobayashi S, Matsui O, Gabata T, et al: Prevalence and background liver conditions of focal hepatic lesion with increased portal blood flow. (Annual Meeting of European Congress of Radiology, ECR 2007, March 9-13, 2007, Vienna)
17. Kobayashi S, Matsui O, Gabata T, et al: Pictorial review of hepatic parenchymal changes observed with various types of hepatic hemodynamic abnormalities. (Annual Meeting of European Congress of Radiology, ECR 2007, March 9-13, 2007, Vienna)

18. Matsui O: Subsegmental TACE & CT/DSA. (17<sup>th</sup> APASL Conference, March 27-30, 2007, Kyoto)
19. 小林 聡、松井 修、蒲田敏文、他：門脈血行異常による求肝性門脈血流減少が肝実質濃染に及ぼす影響について。(第 66 回日本医学放射線学会学術発表会、2007. 4. 13-15, 横浜)
20. Matsui O: Intrahepatic dynamics of lipiodol its importance in TACE for HCC. (GEST 2007, Apr. 25-27, 2007, Barcelona, Spain)
21. 奥田実穂、眞田順一郎、松井 修、他：線維芽細胞増殖因子溶出型ステントグラフト開発における基礎的検討 (第 36 回日本 IVR 学会総会、2007. 5. 24-26、金沢市)
22. 鐘、紅珊、奥田実穂、松井 修、他：Transgene delivery of plasmid DNA to smooth muscle cells based on cationized gelatin hydrogels coated stent grafts. (第 36 回日本 IVR 学会総会、2007. 5. 24-26、金沢市)
23. 南 哲弥、蒲田敏文、松井 修、他：好酸球性膀胱炎の 1 例。(第 21 回腹部放射線研究会、2007. 6. 1-2, 宮崎市)
24. Kobayashi S, Matsui O, Kamura T, et al: Imaging of benign hypervascular hepatocellular nodules in alcoholic liver cirrhosis. (1<sup>st</sup> Asian Congress of Abdominal Radiology, 2007. 6. 1-2, Miyazaki)
25. Kobayashi S, Matsui O, Gabata T, et al: Multi-step hepatocarcinogenesis: correlation with intranodular blood supply evaluated by angiography-assisted CT and angiogenesis. (1<sup>st</sup> Asian Congress of Abdominal Radiology, 2007. 6. 1-2, Miyazaki)
26. Matsui O: Hemodynamics of normal and diseased liver: observations from angiography-assisted CT. (ESGAR 2007, June 12-15, 2007, Lisbon, Portugal )

27. 小林 聡、松井 修、蒲田敏文、他：小型の限局性肝リンパ増殖性病変の動注CT所見。（第43回日本肝癌研究会、2007. 6. 21-22, 東京都）
28. 扇 尚弘、小林 聡、松井 修、他：TAE併用RFA後の焼却範囲外へのリピオドール流出についての検討（第43回日本肝癌研究会、2007. 6. 21-22, 東京都）
29. 南 哲弥、井上 大、松井 修、他：4Frシステムと細径マイクロカテーテルを用いた頭頸部腫瘍に対する動注化学療法の実験（第142回日本医学放射線学会中部地方会、2007, 6. 30-7. 1, 金沢市）
30. 望月健太郎、蒲田敏文、松井 修、他：上腸間膜静脈の圧排と主膵管閉塞をきたした漿液性嚢胞腺種の1例。（第47回日本消化器画像診断研究会、2007. 9. 7-8, 久留米市）
31. 植田文明、松井 修、鈴木正行、他：ADEMにおける軟膜増強効果の検討。（第35回日本磁気共鳴医学会大会、2007. 9. 27-29, 神戸市）
32. Kobayashi S, Shinmura R, Matsui O, et al: Detection of hypervascular foci in hypovascular borderline lesion upon cirrhotic liver: comparison of dynamic contrast enhanced multi-detector row CT, dynamic gadolinium-enhanced MR, and SPI-enhanced MR imaging. (ILCA's First Annual Conference, Oct. 5-7, 2007, Barcelona, Spain)
33. Kobayashi S, Matsui O, Gabata T, et al: Haemodynamic analysis of small hepatic lymphoid tumours with angiography assisted CT. (ILCA's First Annual Conference, Oct. 5-7, 2007, Barcelona, Spain)
34. Matsui O, Kobayashi S, Kamura T, et al: Imaging of benign hypervascular hepatocellular nodules in alcoholic liver cirrhosis: differentiation from hypervascular hepatocellular carcinoma. (ILCA's First Annual Conference, Oct. 5-7, 2007, Barcelona, Spain)
35. 松井 修：特別講演「肝腫瘍性病変の画像診断」（JDDW2007、2007. 10. 18-

21、神戸市)

36. 望月健太郎、眞田順一郎、松井 修：当院の副腎静脈サンプリングの現況と成功率向上へ向けた工夫。(第43回日本医学放射線学会秋季臨床大会、2007. 10. 25-27, 名古屋市)
37. 松井 修：特別講演「肝血流画像と病理・病態」(第51回肝臓クリニカルセミナー、2007. 11. 16、福岡市)
38. Ozaki K, Matsui O, Suzuki M, et al.: Is retained placenta really Enhanced on dynamic MR imaging? (RSNA, Nov. 30-Dec. 5, 2007, Chicago )
39. 小林 聡、松井 修、蒲田敏文、他：門脈血行異常による求肝性門脈血流減少が肝実質濃染に及ぼす影響について。(第37回日本肝臓学会西部会、2007. 12. 7-8, 長崎)
40. 小林 聡、松井 修、蒲田敏文、他：動注CTを中心とした肝細胞性結節性病変の悪性度診断。(第14回肝血流動態イメージ研究会、2008. 1. 26-27, 横浜)
41. Kobayashi S, Matsui O, Gabata T, et al: Blood supply of intrahepatic bile duct: histopathological findings of peribiliary plexus and its significance on hepatic imaging. (ECR 2008, March 7-11, 2008, Vienna)

### (3) 図書

1. 小林 聡、松井 修：図解消化器内科学テキスト。血管造影, P152-158, 2006, 中外医学社, 東京.
2. 南麻紀子、松井 修、蒲田敏文、他：新しい診断と治療のABC50. 消化器7 肝癌 画像診断 (2) CT・MRI, P72-80, 2007, 最新医学社, 東京.

研究成果による産業財産権の出願・取得状況

なし

## 研究の背景

肝細胞癌（肝癌）はC型およびB型肝炎ウイルスによる慢性肝炎・肝硬変を基盤として発生する場合が大半を占め、これらを基盤とした多段階発癌が見られることを画像診断の立場から明らかにしてきた。すなわち腺腫様過形成から高分化肝癌、中～低分化肝癌への多段階発癌である。我々は、動脈造影下CT（動注CT）と組織学的検討から、多段階発癌に伴って結節内の門脈血行が次第に低下し、一方、肝動脈血行は発癌過程の初期で一時低下しその後次第に増加することを明らかとしてきた(Matsui O, et al. *Radiology* 178: 493-497, 1991., Ueda K, Matsui O, et al. *Human Pathology* 23: 619-626, 1992., Hayashi M, Matsui O, et al. *AJR* 172: 969-976, 1999)。さらに、多血性古典的肝癌では動脈からの腫瘍血流は周辺肝類洞へ還流することを明らかにした (Ueda K, Matsui O, et al. *Radiology* 206: 161-166, 1998)。また、この結節内血行動態と結節の古典的肝癌への進展に強い相関がみられ予後の推定や治療法の選択に極めて重要であることを報告した(Hayashi M, Matsui O, et al. *Radiology* 225: 143-149, 2002)。この事実は早期肝癌の診断と治療に大きな進歩をもたらした。さらに、その背景としての腫瘍内血管新生と血行動態および周辺肝類洞との関連をミクロレベルで実験的に明らかにする目的で、マウス実験的転移性肝癌とラットDAB肝細胞癌を対象として、発癌過程での血管新生と腫瘍内血行動態を生体顕微鏡で *in vivo* で明らかにするとともに免疫組織学的検討で解析してきた (Liu Y, Matsui O, under submission)。その結果、転移性肝癌では肝類洞から連続性腫瘍内血管が誘導され成長とともにそれらが増加・拡張し、当初は栄養血管として周辺肝類洞から腫瘍内血管に向かう血流が、成長とともに動脈性血管増生とともに同一の経路で逆流し肝類洞へと還流することを明らかにした。さらに、ラット実験肝癌における多段階発癌でも境界病変から肝癌への進展過程で同様の変化がみられることを明らかにした。これらの一連の研究から、肝癌の発癌あるいは着床の初期に肝類洞から誘導される腫瘍血管を

阻害することの有効性が示唆された。したがって、今後発展が期待される血管新生阻害剤治療のメカニズムの解明や画像による治療効果判定法の開発・血流動態に基づいた投与方法の開発は必須である。

## 研究の目的

こうした観点から、発癌初期に血管新生阻害剤を投与することによりこうした腫瘍血管新生・腫瘍発育・血行動態がどのように変化するかを、これまで行ってきた蛍光生体顕微鏡で *in vivo* で観察することが有用と考えられた。この目的で、血管新生阻害剤投与による腫瘍血管とその微小血行動態 (micro-circulation) の変化を、蛍光実体顕微鏡を用いて *in vivo* で明らかにする。また、これらの観察で抗腫瘍効果が確認された場合は、特に、放射線医学 (IVR) の立場から阻害剤動注あるいは動脈塞栓物質との混和による新しい有効な肝癌治療法の開発を最終的な目的とした。同時に臨床例における肝癌多段階発癌と血管新生とその画像診断を検討した。

## 研究 1：実験的転移性肝癌に対するサリドマイドによる抗血管新生効果についての生体顕微鏡による *in vivo* 研究 (添付論文 1)

微小な転移性肝癌の発育時におけるサリドマイドによる腫瘍血管の形態学的変化を検討した。20 匹の female BALB/c mice (aged 8 weeks about 20g) を使用した。転移性肝癌は colon-26 adenocarcinoma cancer cells の脾臓への注入で作成した。これらが無作為にサリドマイド投与群と非投与群の 2 群に分けた。投与群にはサリドマイド水溶液 (200mg/kg) を一日に一回腹腔内注入した。非投与群には生理的食塩水を注入した。投与は細胞を注入した当日から 14 日間行った。癌細胞の脾臓内注入後 15 日目に生体蛍光顕微鏡による観察を *in vivo* で行った。両群から同じ大きさの転移性肝癌を選択し比較した (投与群 26 結節、非投与群 27 結節)。腫瘍の大きさ、intratumoral microvessel density (MVD) (単

位面積あたりの腫瘍血管面積), intratumoral branch density (BD) (単位面積あたりの腫瘍血管分枝数) を検討した。生体顕微鏡観察後肝臓を摘出し、組織学的検索を行った (投与群 52 結節、非投与群 57 結節)。HE 染色、組織化学的染色 (CD34) で血管新生を評価した。the intratumoral CD34 positive microvessel density (MVD-CD34) を検討した。非投与群では、MVD, MVD-CD34 とともに 400  $\mu$ m 以上の大きな腫瘍群でより小さな腫瘍群に比べ多く ( $18.1 \pm 3.5$  Vs  $13 \pm 3.2\%$ ,  $22.9 \pm 2.8$  Vs  $12.8 \pm 2.5$  vessels per field,  $P < 0.01$ )、BD は類似していた ( $110 \pm 20.5$  Vs  $99.7 \pm 17.3$  branches/ $\text{mm}^2$ ,  $P > 0.05$ )。一方、投与群では、大きな腫瘍群の MVD-CD34 は小さな腫瘍群より多かったが ( $17.4 \pm 2.3$  Vs  $11.5 \pm 2.5$  vessels per field,  $P < 0.01$ ) MVD と BD は類似していた ( $14.7 \pm 3.5$  Vs  $13 \pm 3.2\%$ ,  $95.3 \pm 18.3$  Vs  $97.1 \pm 21$  branches/ $\text{mm}^2$ ,  $P > 0.05$ )。投与群、非投与群間では小さな腫瘍群の MVD, BD, MVD-CD34 は同等であった ( $P > 0.05$ )。しかしながら、大きな腫瘍群では、投与群で非投与群にくらべ有意にこれらは少なかった ( $P < 0.01$ )。

サリドマイドは微小な肝転移形成期に腫瘍血管新生を阻害しその発達を抑制することが *in vivo* で確認されが、腫瘍血管の形態や抑制時期は腫瘍の発育段階でことなることが示唆された。

## 研究 2 : VEGF とその関連分子の発現 (angiogenesis) と肝細胞癌の前癌病変の悪性転化の関連 (添付論文 2)

Dysplastic nodule (DN) は肝細胞癌 (HCC) の前癌病変と考えられている。肝細胞癌の多段階発癌における血行動態の変化は DN や HCC の類洞の毛細血管化と異常筋性血管の出現に反映されると考えられる。しかしながらこうした血管の変化のメカニズムや重要性は依然として解明されていない。本研究では癌化に伴う血管の変化を vascular endothelial growth factor (VEGF) とその受容体 (Flt-1, Flk-1)、hypoxia inducible factor-1、CD34、 $\alpha$ -SMA に関して、外



科的に切除された 20 例の DN と 36 例の HCC を用いて検討した。

まずこれら分子の発現を免疫組織化学的に検討した。CD34 により特徴付けられる類洞の毛細血管化は HCC においてびまん性に見られたのに対し、DN では主に門脈域周囲に見られた。DN における門脈域周囲を中心とした領域の毛細血管化はその範囲から A; 限局性分布群 (門脈域や線維性隔壁に限局した領域に散在性の類洞毛細血管化がある群) (6 例)、B; 帯状分布群 (いくつかの近接した門脈域周囲を中心に類洞毛細血管化が領域を形成する群) (7 例)、C; 広範囲分布群 (結節内に広範な類洞毛細血管化がある群) (7 例) に分類され、こうした毛細血管化した領域はしばしば異常筋性血管、腫瘍性肝細胞の門脈域への浸潤、そして鍍銀線維の消失に関連しており、特に B 群や C 群では A 群に比べて有意に間質浸潤、鍍銀線維の消失に強い相関が見られた。VEGF は DN や HCC における腫瘍性肝細胞においてびまん性に発現しており、DN よりも HCC でその発現レベルが高い傾向にあったが有意差はなかった。DN におけるほとんどの症例では、Flk-1 と HIF-1 $\alpha$  がそれぞれ、門脈域周囲の毛細血管化した領域における内皮細胞と腫瘍性肝細胞に発現していた。毛細血管化した類洞の内皮細胞における DN と HCC の Flk-1 の発現レベルは有意に HCC で高く、腫瘍性肝細胞における Flk-1 の発現には両者に有意差は見られなかった。Flt-1 の発現は DN、HCC いずれにおいても確認することはできなかった。HIF-1 $\alpha$  の腫瘍性肝細胞における発現レベルは DN よりも有意に HCC で高かった。DN の A~C 群間においては VEGF、VEGF receptor、HIF-1 $\alpha$  の発現に有意差はなかった。次に RT-PCR、real-time PCR、In-situ hybridization 法によって mRNA レベルでの各分子の発現を、凍結切片として入手可能であった 8 例の HCC 外科切除標本から抽出した RNA を用いて検討した。RT-PCR では HCC にお

ける VEGF、Flk-1、HIF-1 $\alpha$  の発現を全例で確認することができ、また Flt-1 は非常に弱い発現がわずかに 2 例に見られるのみであった。全例でその発現を確認することができた VEGF、Flk-1、HIF-1 $\alpha$  に関して real-time PCR を施行しその mRNA 発現レベルの定量を行なった結果、全ての分子マーカーにおいてコントロール群（正常肝 2 例、HCC の非癌部背景肝 8 例）と比較して有意に高い mRNA 発現レベルを確認することができた。また In-situ hybridization 法でも VEGF と HIF-1 $\alpha$  のシグナルを腫瘍性肝細胞に、Flk-1 のシグナルを腫瘍性肝細胞と毛細血管化した類洞の内皮細胞に一致して確認することができた。

結論として、DN における毛細血管化した領域と異常筋性血管の増加は、DN の早期の悪性転化を表すものであると考えられ、これらの領域において VEGF、Flk-1、HIF-1 $\alpha$  の発現レベルが上昇することが、類洞毛細血管化や異常筋性血管数の増加に関与していると考えられた。

### 研究 3 : bFGF 肝注入による肝内脈管新生誘導

近年、生理的活性物質である様々な細胞増殖因子が注目されこれらを利用した血管新生療法の開発、研究がなされている。これら細胞増殖因子のうち強力な血管新生作用を有する basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) を肝に直接注入することで肝内脈管（動脈、門脈）の新生・誘導がocこりうるかどうかを検討した。なお、bFGF 単体では生体内での半減期は通常数分以内と非常に短いため効果に限界がある。局所に高濃度に持続的に作用させる担体として京都大学再生医学研究所の田畑らが開発したゼラチンハイドロゲル粒子（Gelatin Hydrogel Microspheres; GHMs）を用いた。Gelatin (isoelectric point 4.9, Nitta gelatin) を熱架橋して作製した Gelatin Hydrogel を、平均径 300 $\mu$ m、徐放期間 1 週（含水率 98%）の粒子として調製し使用した。実験動物は rat

(Sprague-Dawley 体重 200-250g male) を用いた。human recombinant bFGF (trafermin, Kaken Pharmaceutical) を  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調製、これを GHMs 5mg に対し  $250\mu\text{l}$  滴下、 $37^{\circ}\text{C}/1\text{hour}$  湯せんにて含浸させた。この粒子を開腹した rat の肝実質に 18G 注射針にて注入した。それぞれの rat を注入より 7 日後に屠殺、肝葉を摘出し組織学的に評価した。結果は肝実質への注射針の刺入および粒子の注入によって引き起こされた肝実質の変化が想像以上に大きく、これを払拭することが技術的に困難であり、bFGF によって引き起こされたであろう微細な変化の評価は不可能であった。今後担体を改良し研究をすすめる予定である。

#### **研究 4. 肝細胞癌境界病変内の多血性肝細胞癌巣の画像診断による描出能の研究 (添付論文 3)**

血管新生が肝細胞癌境界病変の肝癌への進展に深く関与していることが研究 2 で明らかにされた。画像診断ではこの過程がどのように捉えられるか、また治療効果はどのように評価できるか、を知ることは臨床的に重要である。この目的で乏血性境界病変内に発生する微小な多血性巣 (明らかな肝癌) の早期診断法を検討した。その結果、multi-detector row CT による dynamic CT と dynamic MRI がこの目的で有用であることが示された。