

論文の内容の要旨

論文題目 肝細胞癌肝切除症例における末梢血液中 AFPmRNA 検出の意義

指導教官 幕内雅敏教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 伊地知正賢

【緒言】

診断および治療技術の進歩により肝細胞癌（HCC）の予後は改善してきたが、腫瘍を全て切除しえた症例においても術後の再発率は高く、この再発の有無が予後を左右することとなる。HCC の術後再発は、初発腫瘍の転移による再発と、新たなる多中心性発癌による再発が考えられるが、術後早期の再発は、前者、すなわち切除した腫瘍から流出した遺残癌細胞に由来する可能性が大きい。近年、癌に特異的な遺伝子を標的とした RT-PCR を行うことで、微量の癌細胞を検出することが可能となった。HCC においては、Alpha-fetoprotein (AFP) mRNA や albumin mRNA が、標的遺伝子として用いられ、その血液中の存在が癌進展度と強く関連することが報告されてきたが、その臨床的意義はまだ明らかとはされていない。今回著者は、HCC 治癒切除症例において、術前、術後に末梢血液中 AFPmRNA を検出することにより、術後の HCC 再発を予測できるか否かを prospective に検討した。

【対象と方法】

1997年12月から1999年8月の間に、東京大学肝胆膵外科学教室において治癒切除を行った肝細胞癌初発症例を対象とした。治癒切除は肉眼的に全ての病巣が切除された場合とし、遠隔転移例や多臓器癌合併例は除外した。これらの症例において術前、および術後1週目に末梢血液を採取して AFPmRNA の検出を行った。すなわち 5ml の血液より RNA を抽出、逆転写後 AFP を target とする 2 組のプライマーを用いて

nested PCR を行い、電気泳動後 ethidium bromide で染色することにより、AFPmRNA のバンドを確認した。患者を術前、術後の AFPmRNA 検出の有無により第 1 群（術前術後ともに陽性）、第 2 群（術前陰性、術後陽性）、第 3 群（術前陽性、術後陰性）、第 4 群（術前術後ともに陰性）に分け、肝切除後の再発をエンドポイントとし prospective に検討した。術後は定期的に腹部超音波検査を行い、2 つ以上の画像検査で新たに HCC と診断される腫瘍が認められた場合を再発とした。また、手術より 1 年以内の再発を早期再発と定義した。

1) 予備実験として、肝癌細胞株である HepG2 を健常人血液に混合することで希釈配列を作成し、AFP mRNA の検出感度を求めた。また、健常者 15 名から末梢血を採取し AFP mRNA の検出を試みた。

2) AFP mRNA の結果で分類した上記 4 群の再発率を比較した。また、早期再発、肝外再発、多発再発（4 個以上の結節を認める場合）につき検討した。

3) 全再発に対して、術前術後の AFPmRNA を含む 15 項目の臨床病理学的因子で単変量解析（log-rank test）を行った。次いで単変量解析で有意となった因子を用いて多変量解析（Cox 比例ハザードモデル）を行い、独立した再発予後因子を求めた。

4) 早期再発に対し、2) と同様に単変量、多変量解析を行い、独立予後因子を求めた。

5) AFPmRNA 検査の、HCC 術後再発に対する感度、特異度、陽性適中度、陰性適中度、精度をそれぞれ求めた。また、HCC 早期再発に対しても同様に求めた。

【結果】

適格症例は 87 例であり、年齢は中央値（範囲）で 63（21－82）歳、男性 65 例、女性 22 例であった。61 例（70%）が肝硬変、20 例（23%）が慢性肝炎を合併していた。末梢血液中 AFPmRNA は術前に 31 例（36%）、術後は 30 例（34%）に検出された。第 1 群 13 例、第 2 群 17 例、第 3 群 18 例、第 4 群 39 例であった。

術後観察期間 28（3－41）ヶ月で 46 例（53%）が再発し、再発までの期間は 13（2－30）ヶ月であった。早期再発は 21 例（24%）にみられた。再発部位は残肝再発が 42 例、残肝と肝外に同時に再発がみられたものが 3 例、肝外再発のみが 1 例であった。観察期間中に 10 例が死亡した（癌死：9 例、他病死：1 例）。

1) AFP mRNA の検出感度

HepG2 細胞 10 個/5ml まで AFP mRNA の検出が可能であった。また、健常者 15 名の血液からは AFP mRNA は検出されなかった。

2) 4 群の比較

観察期間中の再発率は、第 1 群 83%、第 2 群 53%、第 3 群 50%、第 4 群 44% であり、第 1 群と第 4 群との間に有意差を認めた ($P = 0.003$)。早期再発は第 1 群 (46%) および第 2 群 (47%) において高率に認められた。また、第 1 群に肝外再発や多発再発の多い傾向がみられた。

3) 全再発の予測因子

単変量解析では、門脈浸潤陽性 (病理組織学的に門脈侵襲あるいは微小肝内転移が存在)、多発腫瘍 (2 個以上)、術後 AFPmRNA 陽性が有意の因子であった。多変量解析においてこれらの 3 因子はいずれも独立した予測因子であった。各因子の再発に対する相対危険度 (95%信頼区間) は、門脈浸潤陽性 3.10 (1.69–5.69)、多発腫瘍 2.84 (1.51–5.36)、術後 AFPmRNA 陽性 2.33 (1.26–4.34) であった。

4) 早期再発の予測因子

単変量解析で有意の因子は、術後 AFPmRNA 陽性、門脈浸潤陽性、血清 AFP > 400 ng/ml、血漿 des- γ -carboxy prothrombin (DCP) > 40 AU/l、腫瘍径 > 50 mm の 5 因子であり、多変量解析の結果、術後 AFPmRNA 陽性と門脈浸潤陽性が早期再発の独立した予測因子であった。相対危険度 (95%信頼区間) はそれぞれ 4.40 (1.61–12.0)、3.97 (1.41–11.2) であった。

5) 術後 AFPmRNA 検査の HCC 再発に対する感度、特異度、陽性適中度、陰性適中度、精度は、43%、76%、67%、54%、59% であり、HCC 早期再発に対しては、それぞれ 67%、76%、47%、88%、74% であった。

【考察】

今回の prospective study では、患者末梢血液中の AFPmRNA の存在が、HCC の術後再発に強く関連することが示された。術後の AFPmRNA 陽性は HCC 再発の独立した危険因子であり、特に 1 年以内の術後早期再発に対しては最も高い相対危険度を示した。また、早期再発に対する術後 AFPmRNA 検査の精度 (accuracy) は 74% であった。

術後の AFPmRNA 陽性については、次の 2 通りの解釈が可能である。1) 切除された主病巣から流出した癌細胞が、血中を循環しながら生き残り検出された。あるいは、

2) 手術時に描出不可能であった微小な転移巣が術後も残存し、これより癌細胞が新たに流出した。いずれにしても癌細胞の遺残を示すものであり、これが転移性再発に強く関与したと考えられる。

一方、術前の AFPmRNA の有無は、HCC 再発と有意な相関を示さなかった。これは血中に流れた癌細胞の量に関係しているものと思われる。すなわち、術前から多量の癌細胞が流出し術後も血中に残るような症例では再発の可能性が高いが、血中に流出する癌細胞が非常に微量で宿主免疫系により速やかに排除されるような症例は、主病巣の完全切除により治癒が可能と考えられる。

術前 AFPmRNA が陰性で術後に陽性となった症例（第 2 群）に、早期再発が高率にみられた（47%）ことは注目に値する。手術操作による肝癌細胞の血中への流出が、術後再発に関与したことを示唆する結果である。

今回の多変量解析では、腫瘍数、門脈浸潤という既知の予後因子に加えて、術後 AFPmRNA 陽性が、肝細胞癌術後再発の新しい独立した予後因子であることが示された。特に、主病巣からの転移が主たる原因と考えられる術後早期再発に対しては、最も重要な危険因子であった。従来、肝細胞癌の肝内転移は、経門脈性進展が原因と考えられてきたが、今回の結果は、肝外に流出した肝癌細胞が末梢血液を循環し再び肝に戻ることで転移巣を形成するという新たな再発形式の可能性を強く支持するものである。

近年、いくつかの無作為化比較試験が行われ、肝切除後に補助療法を行うことにより HCC の再発率が有意に縮小されることが報告されている。HCC 術後再発の高危険群が特定できれば、これらの補助療法を行うべき症例を効率良く選択することができる。末梢血液中 AFPmRNA の検出は、HCC 術後補助療法の必要性を検討する上で有用な手段であると考えられる。

【結論】

HCC 術後の末梢血液中 AFPmRNA の検出は、遺残する癌細胞の存在を示唆するものであり、HCC 術後早期再発の重要な独立予後因子である。