

原 著

染色体解析が予後の予測に有用であった多発性筋炎/  
皮膚筋炎合併 B 型慢性肝炎に発症した肝臓切除例

出口 法子\*, 西村 貴文\*\*, 西田直生志\*\*\*, 柳田 敦子\*\*\*\*  
波多野悦郎\*\*\*\*, 羽賀 博典\*\*\*\*, 福田 善弘\*

Accumulation of Chromosomal Alterations Can Predict the Disease Aggressiveness  
and the Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma

Noriko DEGUCHI, Takafumi NISHIMURA\*, Naoshi NISHIDA\*\*, Atsuko YANAGIDA\*\*\*,  
Etsuro HATANO\*\*\*\*, Hironori HAGA\*\*\*\* and Yoshihiro FUKUDA

**Abstract:** It is well known that prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC) is not favorite compared to other types of human cancers and a bunch of genetic and epigenetic alterations are involved during development of this tumor. We present here about one HCC patient with chronic hepatitis B and polymyositis/dermatomyositis. Initially, he had a surgical resection for treatment of HCC because tumor was solitary and curable for its size, but showed an aggressive disease course thereafter. We analyzed the chromosomal alterations of this HCC tissue using polymerase chain reaction-based methods and found several chromosomal alterations including losses on 16q, 17p, which were reportedly associated with poor prognosis of this disease. He died one year after surgical treatment because of intrahepatic and lymphnode recurrence in spite of various treatments for HCC. This result suggested that accumulation of chromosomal alterations could be a useful predictor for disease aggressiveness and poor prognosis after curative treatment of HCC.

**Key words:** 肝細胞癌 (肝臓), B 型慢性肝炎, 多発性筋炎/皮膚筋炎, 染色体異常, 予後

はじめに

癌の発生, 進展には多くの遺伝子, 染色体の異常が蓄積し, 多段階的に成長していくことが明らかになっ

ている。我が国での肝細胞癌 (肝臓) の発生母地は B 型肝炎ウイルス, C 型肝炎ウイルスによる慢性肝炎および肝硬変が大部分を占めており, 我々を含めて多くの研究者が分子生物学的手法により, その機序の解明が試みられている<sup>1,2)</sup>。一方で, 肝臓の診断, 治療は目覚ましく進歩し, 2 cm 以下の小肝癌が多く発見されラジオ波焼灼療法や外科的切除が行われている。

しかし, 肝臓では治療後の局所再発, 転移再発や多中心性再発などがきわめて多く, 予後不良の癌の一つである。外科的根治術後の転移再発の予後因子として腫瘍の生物学的悪性度があげられるが, その評価方法は形態的診断のみならず, 分子生物学的診断に基づく必要がある。われわれは肝臓切除後あるいは肝移植後の術後再発を予知, 予後予測する目的で染色体解析を行っており<sup>3,4)</sup>, 多発性筋炎/皮膚筋炎合併 B 型慢性肝炎患者に単発の肝臓が発症し, 肝臓切除後急速に再発, 進展をみた症例を分子生物学的観点から検討を行った。

症 例

症例; 33歳, 男性 (1996年当時)  
主訴; 特になし (肝障害の精査)。

\* 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻医療検査展開学講座  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53  
Human Health Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine  
\*\* 京都大学医学部附属病院外来化学療法部  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54  
Outpatient Oncology Unit, Kyoto University Hospital  
\*\*\* 京都大学大学院医学研究科消化器内科学  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54  
Department of Gastroenterology and Hepatology, Kyoto University Graduate School of Medicine  
\*\*\*\* 京都大学大学院医学研究科肝胆膵・移植外科  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54  
Department of Surgery, Division of Hepato-pacreato-biliary Surgery and Transplantation, Kyoto University Graduate School of Medicine  
\*\*\*\*\* 京都大学医学部附属病院病理部  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54  
Department of Diagnostic Pathology, Kyoto University Hospital

受稿日 2007年10月15日  
受理日 2008年2月13日

表1 肝臓外来初診時所見

GOT	154 IU/l	HBs 抗原	(+)
GPT	486 IU/l	HBs 抗体	(-)
LDH	200 IU/l	HBe 抗原	(+)
ALP	196 IU/l	HBe 抗体	(-)
$\gamma$ GPT	84 IU/l	HBVDNA-P	4,420 c. p. m
Alb	4.3 g/dl	AFP	4.2 ng/ml
PT	11.3 sec	PIVKA II	<0.06 AU/ml
$\gamma$ Gl	1.3 g/dl		
(IgG)	1,630 mg/dl)	CPK	52 IU/l
WBC	$4.5 \times 10^9/l$	Aldolase	13.4 IU/l
RBC	$4.98 \times 10^{12}/l$	ANA	(+)
Hb	15.9 g/dl	Scl-70	(-)
PLT	$183 \times 10^9/l$		
超音波エコー, CT, MRI: 外側区に 30 mm 肝血管腫			

家族歴；母親がB型肝炎ウイルス (HBV) キャリアであった。

既往歴；1997年7月 (15歳時) 全身倦怠感, 肩が上がらない, シャがんだ後立ち上がれないなどの筋力低下により他院で多発性筋炎/皮膚筋炎 (polymyositis, PM/dermatomyositis, DM) と診断され, ステロイド治療 (プレドニゾロン 2.5 mg/日) が行われていた。

現病歴；1991年 (28歳時) に京都大学医学部附属病院免疫外来に紹介され, 4, 5年間 ALT はほぼ正常であったが, 1996年 (33歳時) にプレドニゾロンの増量, その後の減量中に肝障害がみられ肝臓外来に紹介された。

### 肝臓外来初診時

肝臓外来初診時の検査データを表1に示す。AST 154 IU/l, ALT 486 IU/l,  $\gamma$ GTP 84 IU/l と高値で, HBV マーカーでは HBs 抗原 (+), HBe 抗原 (+), HBVDNA-polymerase 4,420 c. p. m と高増殖状態であった。CPK 52 IU/l, Aldolase 13.4 IU/l と筋炎は比較的落ち着いた。 $\alpha$ フェトプロテイン (AFP), PIVKA II の腫瘍マーカーは陰性であった。超音波エコー, CT, MRI では外側区に 30 mm の肝血管腫をみとめた。

### 経 過

京大病院初診時の1991年から2003年の肝癌発生までの約12年間の経過を示す (図1)。肝障害出現後 PM/DM に対してプレドニゾロン 7.5 mg/日を継続投与されていたが, B型肝炎ウイルスの増殖, トランスアミナーゼの上昇を繰り返していた。その間 HBe 抗原から HBe 抗体へのセロコンバージョンが短期間みられた。そのためこのままセロコンバージョンに至るのではないかと期待し, またインターフェロン治療などは行わず経過観察とした。経過中 AFP はシューブ

の際に一過性に上昇がみられていたが, 2003年1月に持続的に AFP の上昇がみられ, CT にて血管腫以外に肝右葉前区域 (S5) に 20 mm 強の肝癌の存在が疑われた。単発であること, 胆嚢に接しているため, ラジオ波焼却術は困難と考えられ, 外科転科となり, 2003年4月14日に肝 S4, S5 部分切除術が施行された。

表2に術前データおよび最終病理診断を示す。

### 病理学的診断

中分化癌と充実性の増殖を示す低分化肝癌が被膜内に混在し, 出血を伴っていた。標本中 2~3 箇所まで被膜周囲の小血管に派管侵襲が疑われる部分を認めた。また, 被膜外浸潤もみられた。Grade 1~2 の中分化癌の部分と Grade 3 の低分化癌の部分が確認され, 全体として低分化型と診断された (図2, a, b, c)。

非癌部組織所見は A1F4 であった (図2, d)。

### 染色体解析方法

インフォームドコンセントに基づいて手術時に採取および凍結保存を行った肝癌組織について Phenol-Chloroform 法により DNA を抽出し, 22の常染色体およびX染色体を網羅する400のマイクロサテライトに対応する PCR プライマー (ABI PRISM Linkage Mapping Set Ver. 2. 5, Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて既報<sup>5)</sup>のように染色体異常の検索を行った。電気泳動には ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), データ取り込みには GeneScan 3. 1. 2 (Applied Biosystems) を用いた。アレル不均衡の判定には癌細胞の2種類の長さの PCR 産物のピーク面積比を非癌肝組織のピーク面積比で補正し 0.70 をカットオフ値とした。アレル不均衡が認められたマイクロサテライトは更に正常型を示すマイクロサテライトを内部基準とした比較二重 PCR を行い,

出口, 他: 染色体解析が予後の予測に有用であった多発性筋炎/皮膚筋炎合併 B 型慢性肝炎に発症した肝癌切除例

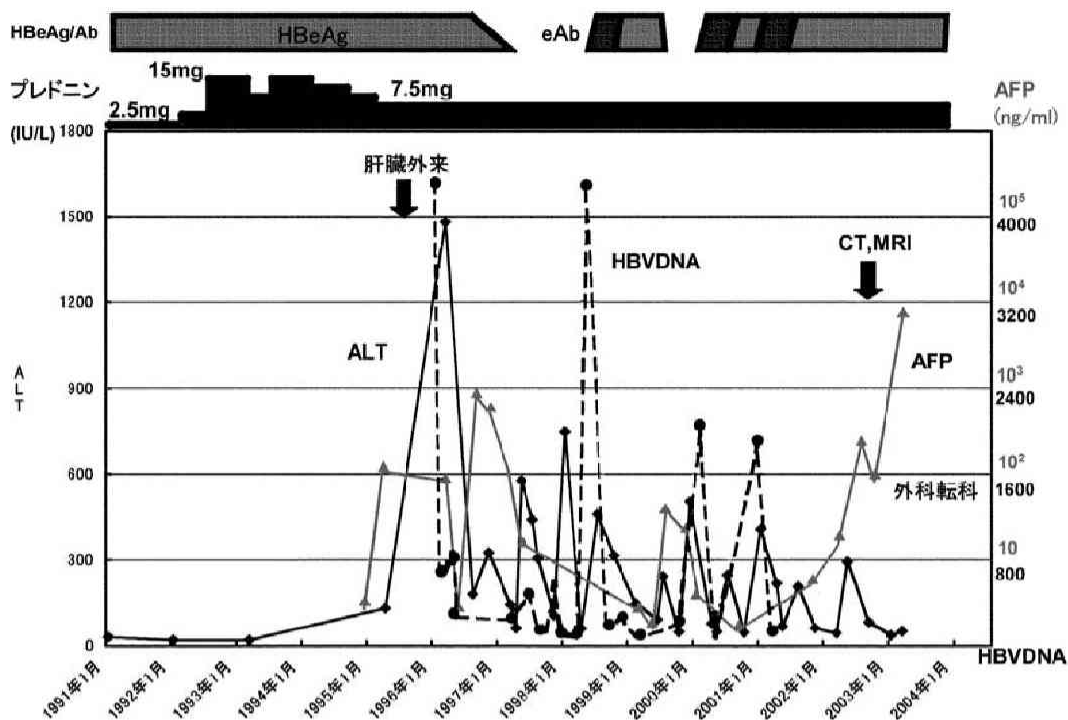


図 1 免疫外来初診時より肝癌発症までの経過

表 2 術前データおよび最終病理診断

Child Pugh 分類	A
Plt	11.4万/ $\mu$ l
AFP	3,488 ng/ml
HBe 抗原	陽性
HBe 抗体	陽性
術式	肝部分切除術 (S4, 5)
病理	Hepatocellular carcinoma, poorly differentiated, vp1, vv0, va0, b0, im0, sm-, lc (A1F4)
取扱規約	単純結節型, S5, Hs, 2.5×2.0×2.0 cm, S0, N0, Vp0, Vv0, Va0, B0, IM0, P0, SM0, LC T2N0M0 Stage II, Hr0 40 g, D-, Cur A2

染色体の欠失または重複を判定した<sup>5)</sup>。

染色体解析の結果は, (+: 重複, -: 欠失, p: 単腕, q: 長腕) +1p, -1p, +1q, +2, -3p, -4, -9p, -9q, -11p, -11q, -15q, -16, -17p, +19q と多くの染色体で重複, 欠失などの異常が認められた。

### 術後経過

本例の術後の AFP の推移と治療経過を図 3 に示す。術後約 2 ヶ月後には肝内再発があり, 肝動脈塞栓術 (TAE: transcatheter arterial embolization), 抗腫瘍剤持続肝動脈注入療法等を繰り返したが, 1 年後に死亡した。

### 考 察

B 型肝炎にみられる単発の肝癌に対して肝切除術の予後は良いと言われている。しかし, 今回の症例は, 単発かつ比較的小さな肝癌であったにもかかわらず,

術後 2 ヶ月で肝内再発がみられ, その後も各種治療にも関わらず急速に進展し術後 1 年で死亡するという極めて予後の悪い経過であり, この原因として肝癌の生物学的悪性度が考えられた。これまでは病理組織学的診断に基づくことが多かったが, 近年分子生物学的手法の進歩により遺伝子, 染色体の面から解析がすすめられている。肝癌で高頻度に異常がみられる染色体異常は -1p, +1q, -4q, -6q, -8p, +8q, -9p, -10q, -13q, -16p, -16q, -17p などが報告されている<sup>2)</sup>。このうち, Nishida らは特に 13q, 16q, 17p の欠失は肝癌の進展や転移に関わることを報告<sup>3)</sup>しており, 本例でも 16q, 17p の欠失が含まれており, 悪性度が高いものであったと考えられる。さらに染色体異常の合計数は肝癌根治術後の転移再発の予後因子である<sup>4)</sup>。

Nishimura ら<sup>5)</sup>は高分化肝細胞癌の切除例において本症例と同様の手法を用いて染色体異常を検討し, 腫瘍径が大きくなるほど異常染色体数が増加することを

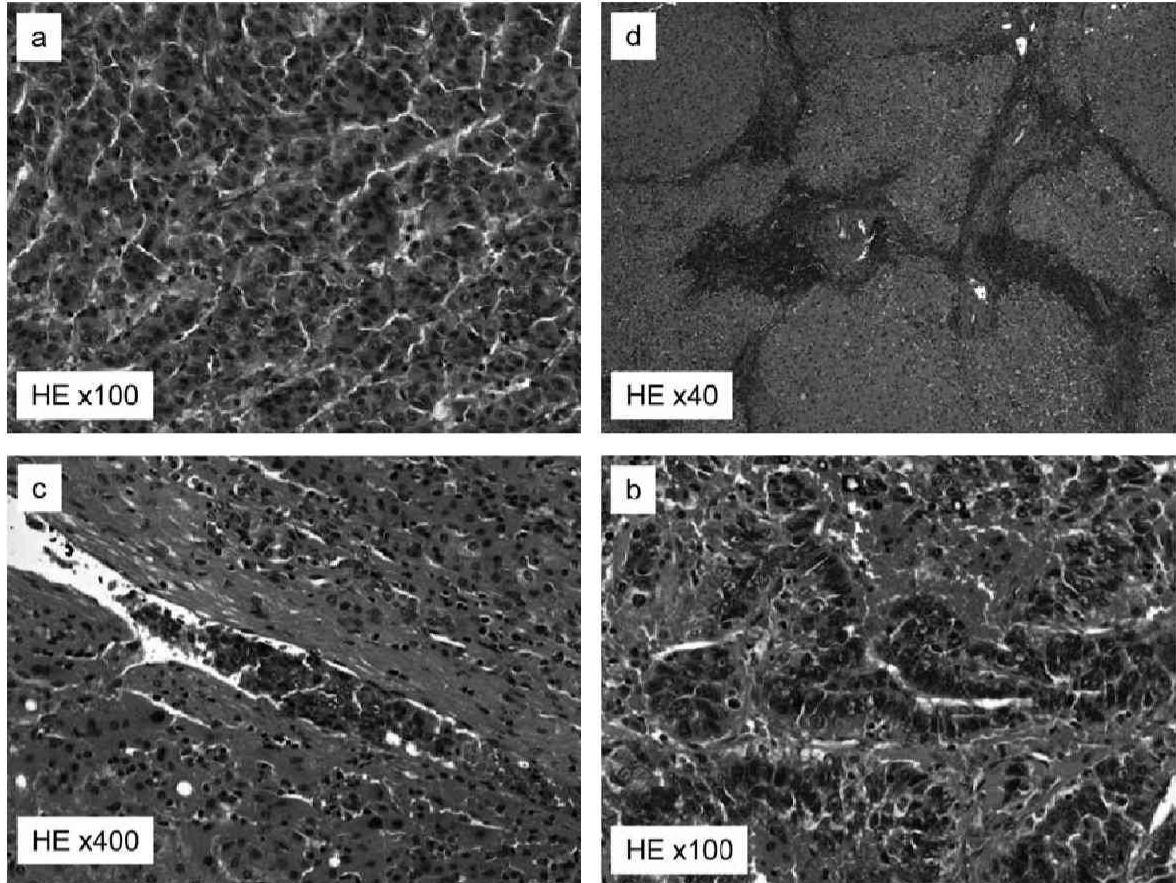


図2 病理組織像 a: 中分化腫瘍組織, b: 低分化腫瘍組織, c: 門脈侵襲, d: 非癌部組織

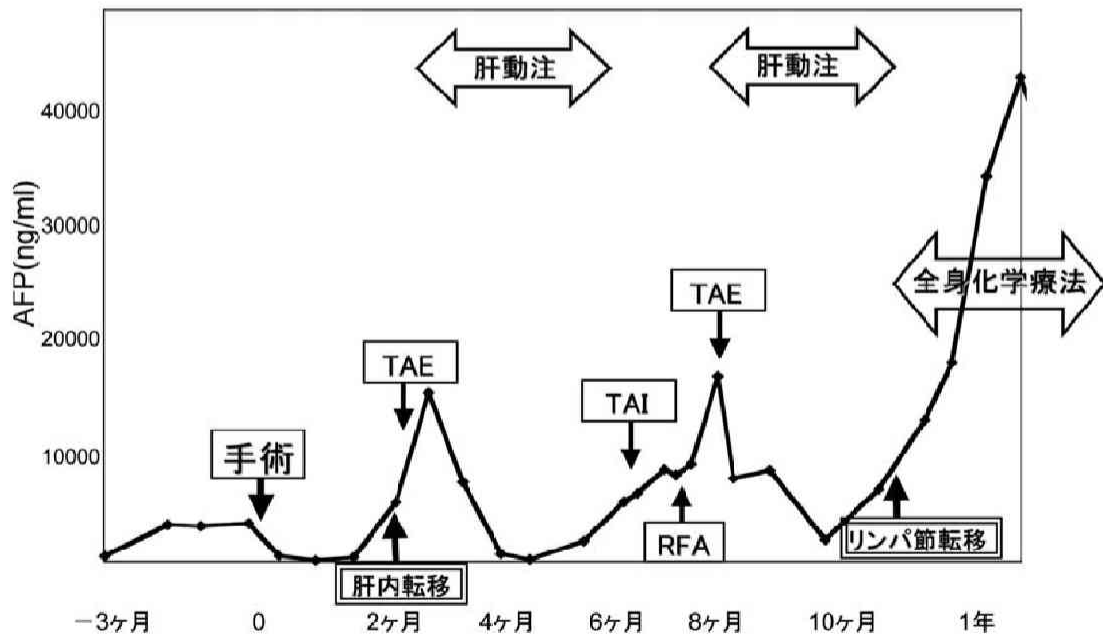


図3 肝癌手術から再発・死亡までの経過 術後再発に対して肝動脈塞栓術 (TAE), 肝動脈抗癌剤注入療法 (TAI), 抗癌剤持続肝動脈注入療法 (肝動注), ラジオ波焼灼術 (RFA: radio frequency ablation) を行ったが, 1年後に死亡。

見出した。各染色体でのそれぞれのマーカーの異常の合計数 (EACL: estimated aberrant chromosomal loci) と腫瘍径の関係をみてみると, サイズが大きくなるにつれて EACL 数も増加傾向を示している (図4)。本

例では 2.5 cm と腫瘍径が小さいにもかかわらず, EACL は158と高分化肝癌における予測値の4倍以上高く, このことから悪性度が高いことが示唆される。

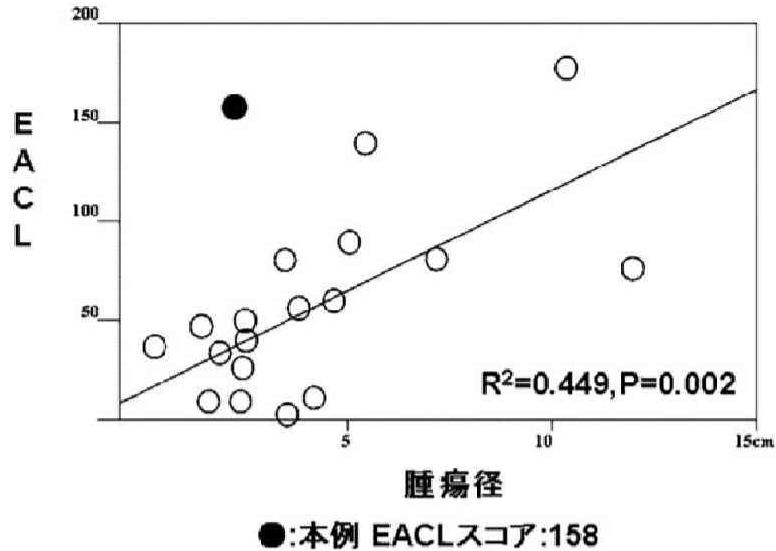


図4 EACLと腫瘍径 文献5)より引用し, 本例を加えた。EACL: 異常マーカーの合計数

末梢血中肝癌細胞の存在を AFPmRNA 検出により検討した Komeda ら<sup>6)</sup>の成績では AFPmRNA 陽性細胞が既にステージ I, II の早期の症例においても10%に検出されている。このことは早期の肝癌でありながら肝内, 肝外転移をきたす症例をこの方法で予測することができる可能性を示しており, 本例でもステージ II であったが術前に既に血中に肝癌細胞が存在していた可能性が示唆される。

今後このような染色体異常の解析や血中癌細胞の検出などを組み合わせた分子生物学的手法により, 肝癌の悪性度診断, 予後予測がより正確に行われ, 癌の個別化治療に応用されることが期待される。

#### 文 献

- 1) Thorgeirsson SS, Grisham JW: Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 2002; 31: 339-346
- 2) Nishida N, Nishimura T, Ito T, Komeda T, Fukuda Y, Nakao K: Chromosomal instability and human hepatocellular carcinoma. *Histol Histopathol*, 2003; 18: 897-909
- 3) Nishida N, Fukuda Y, Kokuryu H, Sadamoto T, Isowa G, Honda K, Yamaoka Y, Ikenaga M, Imura H, Ishizaki K: Accumulation of allelic loss or arms of chromosomes 13q, 16q and 17p in the advanced stages of human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 1992; 51: 862-868
- 4) Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Ito T, Nishimura T, Minata M, Kuno M, Katsuna H, Ikai I, Yamaoka Y, Nakao K: Prognostic impact of multiple allelic losses on metastatic recurrence in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Oncology*, 2002; 62: 141-148.
- 5) Nishimura T, Nishida N, Itoh T, Kuno M, Minata M, Komeda T, Fukuda Y, Ikai I, Yamaoka Y, Nakao K: Comprehensive allelotyping of well-differentiated human hepatocellular carcinoma with semiquantitative determination of chromosomal gain or loss. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002; 35: 329-339
- 6) Komeda T, Fukuda Y, Sando T, Kita R, Furukawa M, Nishida N, Amenomori M, Nakao K.: Sensitive detection of circulating hepatocellular carcinoma cells in peripheral venous blood. *Cancer*, 1995; 75: 2214-2219