

博士(医学) 石村美樹

学位論文題名

肝細胞癌の制癌剤感受性試験

—特に薬剤耐性因子との関連について—

学位論文内容の要旨

I. 目的

有効な抗癌剤の選択のため、培養肝細胞株および、手術的に切除した肝細胞癌組織を用いて *in vitro* 制癌剤感受性試験を行い、その感受性と薬剤耐性遺伝子およびその産物の発現の関連について検討した。また、肝非癌部の *in vitro* 制癌剤感受性試験も合わせて行い、その知見も述べた。

II. 対象と方法

1. 対象：培養肝細胞癌株は PLC/PRF/5, HLE, HLF, HuH-7, 当科で樹立した HC-1, HC-4, HC-28, HC-32, HC-44, HC-59 の10株を用いた。切除肝細胞癌組織は清潔新鮮手術切除標本より癌部、非癌部の組織を採取して用いた。当科で1989年から1993年の4年間に行った肝切除症例のうち初回切除肝細胞癌122例を対象とした。年令は30～80歳才、平均57.5才であった。

2. 方法：制癌剤感受性試験として Succinic Dehydrogenase Inhibition Test (SDI Test) を用いた。48時間培養とし、対象の吸光度(O.D.値)が100以上を判定可能の基準とした。Inhibition Index (I.I.値) 50%以上を制癌剤に感受性ありとした。1) 培養肝細胞癌株： 3×10^5 cell/ml に調整した。HC-32株は RPMI1640培地では培養不良のため、MEM培地を使用した。2) 切除肝細胞癌、非癌部組織：制癌剤感受性試験として MTT assay を行った。肉眼的に癌部、非癌部(肝硬変部を含む)を採取し、検討した。3) 制癌剤と濃度：MMC; 10 μ g/ml, ADM; 5 μ g/ml, 5-FU; 100 μ g/ml, CDDP; 25 μ g/ml, IMF; 150 μ g/ml, VP-16; 200 μ g/ml, IFM は活性型を使用した。使用制癌剤濃度は常用量の最高血中濃度のほぼ10倍とした。

3. 免疫染色方法：P-Glycoprotein(P-gp), Glutathione-S-trasferase- π (GST- π), Metallothionein(MT), および Cytochrome P-450(P-450)の免疫染色をした。肝細胞癌株は培養後、アセトン固定した。切除組織では、P-gp は癌部、非癌部の新鮮凍結標本を用い、GST- π 、MT および P-450 はパラフィン固定の癌部、非癌部標本を用いた。免疫組織染色の評価は3段階で行い、培養肝細胞癌株では20%以上染色されたもの(+)、染色されないもの(-)、とした。切除例では肝細胞、肝細胞癌において一部でも染まっているもの、また一見して染まっていると判定できるものを(+)、Negative control と比較してかろうじて染まっているものを(±)、染まっていないものを(-)と判定した。4. MDR1_m RNA 解析：肝細胞癌10株では MDR1_m RNA 解析を行った。5. 組織学的検索：切除標本はすべてホルマリン固定し、パラフィン切片を作製し、組織型と分化度を検索した。6. 検定法：有意差検定は χ^2 検定によって行った。

III. 結語

1. 肝臓癌株の制癌剤感受性試験：有効例はMMC9株(90%)、ADM9株(90%)、5-FU 1株(10%)、CDDP 10株(100%)、IMF 10株(100%)、VP-16 9株(90%)であった。2. 切除肝細胞癌の制癌剤感受性試験：有効と判断されたものはMMC 3/44(6.8%)、ADM 2/25(8.0%)、5-FU 0/58(0.0%)、CDDP 12/61(19.7%)、IMF 21/57(36.8%)、VP-16 17/42(40.5%)であった。切除肝細胞癌の感受性に個体差を認めた。3. 臨床例における制癌剤感受性試験と組織学的検索：感受性有効例において組織型と感受性の間に関連をみとめなかった。4. 非癌部の制癌剤感受性試験：感受性有効例はMMC 0/46、ADM 0/24、5-FU 0/59、CDDP 1/64(1.6%)、IMF 33/60(55.0%)、VP-16 40/46(87.0%)であり、IMF、VP-16が非癌部での有効率すなわち障害率が50%以上であった。同一症例で、癌部と非癌部を同時に測定したものの内で、非癌部より癌部に高い感受性があったものはMMC 28/42(66.7%)、ADM 15/23(65.0%)、5-FU 33/53(62.3%)、CDDP 33/58(56.9%)、IMF 19/53(35.8%)、VP-16 9/40(22.5%)であった。5. 肝細胞癌株の免疫組織染色：肝細胞癌株の免疫組織染色ではP-gpの発現(+)は20%、(±)は70%、(-)は10%であった。GST- π の発現(+)は30%、MTの発現(+)は80%、P-450の発現(+)は30%、MDR1_mRNAの発現(+)は50%であった。6. 切除肝細胞癌、非癌部の免疫組織染色：切除標本による肝細胞癌のP-gpの発現は癌部で48/89(53.9%)、非癌部で74/92(80.4%)にみられ、有意差がみられた($p<0.0002$)。

IV. 考 察

制癌剤感受性試験の方法は種々あるが、今回はSDI testを選択した。また、正常間質細胞の混入を取り除いて処理するために培養肝細胞癌も用いた。その結果、培養肝細胞癌株では制癌剤感受性有効率はCDDP、IMFが100%であり、次にMMC、ADM、VP-16が90%、5-FUが10%の低値であった。しかし、切除肝細胞癌組織を用いた試験では、培養株細胞で感受性の多い薬剤は切除組織でも感受性が多い傾向はあったが、正常間質細胞のためか有効率が著しく低値であった。自験例ではVP-16ついで、IMFが最も高かった。制癌剤を使用すると実際には癌部のみならず肝非癌部も同時に暴露されることになるので、その制癌剤感受性を検討した。肝非癌部はMMC、ADM、5-FUに対して感受性が少なく、CDDPに対しては1.6%と低値であったが、IMFでは55.0%、VP-16では87.0%と高値であり、IMF、VP-16は残存肝に損傷を与える可能性が大きいと考えられた。免疫組織染色において、肝細胞癌株ではP-gpの発現はADMにおいて薬剤耐性に関与していることを示唆しているとも考えられたが、VP-16においては相違があり、薬剤によってP-gpの関与に差異があることを示しているとも思われた。MDR1_mRNA発現はP-gp発現との関連性は認められたが、ADMおよびVP-16での感受性との相関を認めなかった。GST- π の発現とADMの感受性との相関が示唆された。CDDPとGST- π の発現に一応の相関は認められた。一方、切除肝細胞癌の制癌剤感受性と免疫組織染色の関連においてGST- π はCDDP、IMF、VP-16と、MTはCDDP、IMFとP-450はIMF、VP-16とにおいて有意差を認めた($p<0.05$)。しかし、この結果はP-450以外、これまで報告された結果と異なっているが、これは正常間質細胞の混入によるものかもしれない。

V. まとめ

肝細胞癌の制癌剤感受性試験による薬剤耐性と各種薬剤耐性遺伝子および、その産物の発現について検討し、下の結果を得た。1. 肝細胞癌株において：1)制癌剤感受性試験において感受性第1はCDDP、IMF、次にMMC、ADM、VP-16であった。2)P-gpとMDR1_mRNAの発現には相関が認められた。3)P-gpとADMでの制癌剤感受性には相関の傾向があった。4)GST- π の発現株にADM、CDDPの制癌剤体制を認める傾向がある。2. 切除肝細胞癌において：1)制癌剤感受性有効例はMMC 3/44(6.8%)、ADM 2/25(8.0%)、5-FU 0/58(0.0%)、CDDP 12/61(19.7%)、IMF 21/57(36.8%)、VP-16 17/42(40.5%)であった。2)GST- π 、MT、P-450の発現と制癌剤感受性有効例に

は相関を認めた。3)VP-16, IMFでは非癌部肝細胞の感受性の高いものが多く、残存肝に損傷を与える可能性がある。以上から、非癌部のダメージも考えると肝細胞癌の治療制癌剤としてCDDPが一番適していると考えられるが、抗癌剤の選択にあたっては、癌部非癌部の感受性試験を行い、最も適合した抗癌剤を使用すべきと考えられた。

学位論文審査の要旨

主査 教授 内野純一
副査 教授 長嶋和郎
副査 教授 細川眞澄男

学位論文題名

肝細胞癌の制癌剤感受性試験

—特に薬剤耐性因子との関連について—

有効な化学療法を行うために抗癌剤の選択が重要であるが、培養肝細胞癌株および手術的に切除した肝細胞癌組織を用いて *in vitro* 制癌剤感受性試験を行い、その感受性と薬剤耐因子の発現の関連について検討した。また、肝非癌部の *in vitro* 制癌剤感受性試験とも合わせて行った。対象として培養肝細胞癌株は PLC/PRF/5, HLE, HLF, HuH-7、当科で樹立した HC-1, HC-4, HC-28, HC-32, HC-44, HC-59 の 10 株を用いた。切除肝細胞癌組織は清潔新鮮手術切除標本より癌部、非癌部の組織を採取して用いた。当科で 1989 年から 1993 年の 4 年間に行なった肝切除症例のうち初回切除肝細胞癌 122 例を対象とした。年令は 30 才～80 才、平均 57.5 才であった。制癌剤感受性試験として Succinic Dehydrogenase Inhibition Test (SDI test) を用いた。48 時間培養とし、対象の吸光度 (O.D. 値) が 100 以上を判定可能な基準とした。Inhibition Index (I.I. 値) 50% 以上を有効とした。制癌剤と濃度は MMC; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ADM; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5-FU; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CDDP; 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, IFM; 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, VP-16; 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を用いた。薬剤耐性因子である P-Glycoprotein (P-gp), Glutathione-S-transferase- π (GST- π), Metallothionein (MT), および Cytochrome P-450 (P-450) の免疫組織染色を行った。染色はアビジン・ビオチン (ABC) 法を用いた。肝細胞癌 10 株では MDR₁ mRNA 解析を行った。有意差検定は 検定によって行なった。

その結果、肝細胞癌株の制癌剤感受性試験での有効例は MMC 9 株 (90%), ADM 9 株 (90%), 5-FU 1 株 (10%), CDDP 10 株 (100%), IFM 10 株 (100%), VP-16 9 株 (90%) であり、感受性第 1 位は CDDP, IFM であった。切除肝細胞癌の制癌剤感受性試験で有効と判定されたものは MMC 3/44 (6.8%), ADM 2/25 (8.0%), 5-FU 0/58 (0.0%), CDDP 12/61 (19.7%), IFM 21/57 (36.8%), VP-16 17/42 (40.5%) であり、VP-16, IFM が感受性第 1, 2 位を占めた。また、切除肝細胞癌の感受性には個体差を認めた。非癌部の制癌剤感受性有効例は MMC 0/46, ADM 0/24, 5-FU 0/59, CDDP 1/64 (1.6%), IFM 33/60 (55.0%), VP-16 40/46 (87.0%) であり、IFM, VP-16 が非癌部での有効率すなわち障害率が 50% 以上であった。同一症例で、癌部と非癌部を同時に測定したものの中で、非癌部より癌部に高い感受性があったものは MMC 28/42 (66.7%), ADM 15/23 (65.0%), 5-FU 33/53 (62.3%), CDDP 33/58 (56.9%), IFM 19/53 (35.8%), VP-16 9/40 (22.5%) であり、VP-16, IFM は肝非癌部の方の感受性が高いもののが多かった。肝細胞癌株の免疫組織染色では P-gp の発現 (+) は 20%, (±) は 70%, (-) は 10% であった。GST- π の発現 (+) は 30%, MT の発現 (+) は 80%, P-450 の発現 (+) は 30%, MDR₁ mRNA の発現 (+) は 50% であった。切除肝細胞癌の P-gp の発現は癌部で 48/89 (53.9%), 非癌部で 74/92 (80.4%) にみられ、有意差があった ($P < 0.0002$)。P-gp 発現株と MDR₁ mRNA の発現、および ADM での制癌剤感受性に

は相関があった。また、GST- π の発現株にADM,CDDPの制癌剤耐性を認める傾向があった。しかし、臨床例では制癌剤感受性試験と薬剤耐性因子との関連は認められなかった。以上より非癌部のダメージを考えると、肝細胞癌の治療制癌剤としてCDDPが一番適していると考えられるが、癌部、非癌部の感受性試験を行い、最も適した制癌剤を使用すべきとした。これらの知見は今後の肝細胞癌の化学療法に新たな道を開くものであり、この方法を行うことによって肝細胞癌の治療成績が向上することが期待された。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、また、研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。