
原 著 (第26回徳島医学会賞受賞論文)

肉眼的門脈侵襲陽性肝癌切除後の Systemic IFN+Low dose FP の有用性 —理論的根拠と臨床的効果—

居 村 暁, 花 岡 潤, 金 本 真 美, 森 大 樹, 池 本 哲 也,
森 根 裕 二, 宇 都 宮 徹, 島 田 光 生

徳島大学病院消化器・移植外科

(平成23年6月20日受付) (平成23年6月29日受理)

肉眼的脈管侵襲陽性肝細胞癌(肝癌)に対する IFN α 併用 Low dose FP 全身化学療法(IFP療法)の有用性につき基礎的および臨床的に検討した。基礎的検討として MH134マウス肝癌細胞株を用いて Peg-IFN α の増殖・浸潤・転移抑制効果を検討し, 臨床的検討として二次分枝以上の門脈内腫瘍栓を有する ($V_p \geq 2$) 進行肝癌症例30例を IFP 施行群14例, 非施行群16例に分けレトロスペクティブに生存率, 再発形式などを検討した。基礎的検討では, MH134細胞は Peg-IFN α 投与により増殖・浸潤能が抑制され (*in vitro*), 皮下腫瘍モデルにおいて増殖を抑制した。癌細胞脾注による肝転移モデルにおいて Peg-IFN α は肝転移個数減少(投与群6個 vs. 対照群19個)および転移巣における microvessel density が減少した (*in vivo*)。臨床的効果の検討では, 累積および無再発生存率において, IFP 施行群は非施行群と比較し, 有意に予後良好であった。無再発生存率においても IFP 施行群が非施行群と比較し, 有意に良好であった。 $V_p \geq 3$ (門脈一次分子内に腫瘍栓)症例で特に差を認めた。再発パターンは, 非施行群はほとんど全て残肝多発, 遠隔転移といった制御不能再発であったが, IFP 施行群は再発9例中4例が残肝単発再発であり局所治療にて制御可能であった。以上より, $V_p \geq 2$ 肝癌術後の IFP 療法は予後を改善する有用な治療法であると考えられた。

はじめに

肝細胞癌(肝癌)に対して根治的治療として肝切除を施行しても術後の再発率は2年で50-60%, 5年で80%と高く, 予後不良な癌の1つである。特に脈管侵襲を伴うものは再発の危険性が高い¹⁻³⁾。また, 門脈二次分枝より中枢側に腫瘍栓を有する ($V_p \geq 2$) 肉眼的門脈侵襲陽性肝癌は積極的に肝切除を施行しても術後早期に制御不能な再発をきたすことが多く非常に予後不良である。しかし, 現行の肝癌診療ガイドライン⁴⁾やコンセンサスマーケティングが提唱する治療アルゴリズム⁵⁾には進行肝癌に対する術後補助療法に関する規定はない。われわれは以前より肉眼的門脈侵襲陽性肝癌術後の再発防止を目的とした Systemic IFN α +Low dose FP (IFP) 療法を行ってきた。今回, 根拠となる基礎的研究を含め, IFP 療法が肉眼的門脈侵襲陽性肝癌術後の補助療法として有用であるという知見を報告する。

材料・対象と方法

(1) 基礎的検討

<*in vitro*>

MH134マウス肝癌細胞に対する IFN α の腫瘍細胞増殖抑制効果について MTT Assay (Chemicon International Inc.) を用いて, また浸潤抑制効果の検討は Cell Invasion Assay (Cultrex[®] 96 Well BME Cell Invasion Assay) を

用いて行った。さらに血管新生因子の発現を RT-PCR を用いて検討した。IFN α は Peg-IFN α (Pegylated IFN α 2b, Schering-Plough K. K. Osaka, Japan) を使用した。

<in vivo>

6 週齢の雄性マウス (C3H/HeN Crj) に MH134細胞を 1×10^5 個注入し皮下腫瘍モデルを作製し、接種後 1 週間で腫瘍径を測定する。Peg-IFN α は MH134接種24時間前に皮下投与し、皮下腫瘍モデルにおける Peg-IFN α の腫瘍増殖抑制効果につき検討した。

さらに MH134細胞 1×10^5 個を脾下極に注入して脾注肝転移モデルを作製した。Peg-IFN α は MH134脾注24時間前に皮下投与し、Peg-IFN α の肝転移抑制効果を検討した。

(2) 臨床的検討

1992年11月から2010年3月までの期間に肝切除を施行した肝癌のうち、二次分枝より中枢側に門脈内腫瘍栓を有する ($V_p \geq 2$) 進行肝癌症例30例を対象として、IFP療法施行群14例、非施行群16例に分け、レトロスペクティブに予後および再発形式を含む臨床病理学的検討を行った。また門脈一次分枝から本幹にかけて腫瘍栓を有する $V_p 3-4$ の症例についても検討した。

IFP療法は図1に示すプロトコルで術後できるだけ早期から行い、投与期間は4週間としている。

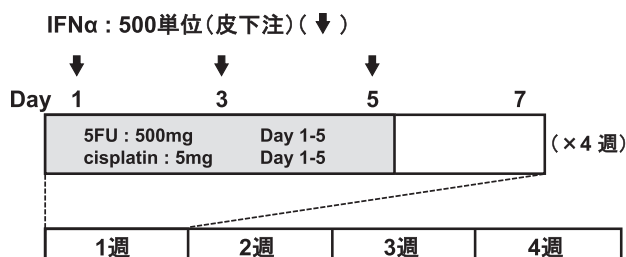


図1. IFP療法のプロトコル

IFN α は500万単位を週3回皮下投与、FP投与は5投2休で経静脈投与する (4週間投与)。

結 果

(1) 基礎的検討

<in vitro>

MTT Assay を用いた検討では、MH134細胞の増殖能は PegIFN α により濃度依存性に抑制された。Cell Invasion Assay を用いた腫瘍浸潤能の評価では、MH134細胞の浸潤能は PegIFN α により濃度依存性に抑制された (図2, 文献17より引用)。

<in vivo>

皮下腫瘍モデルにおいて、PegIFN α 投与群は対照群と比較し腫瘍径が有意に小さかった (図3, 文献17より引用)。また MH134細胞脾注による肝転移モデルでは、PegIFN α 投与により肝転移個数は有意に抑制された (PegIFN α 投与群6個 vs. 対照群19個, 図4, 文献17より引用)。

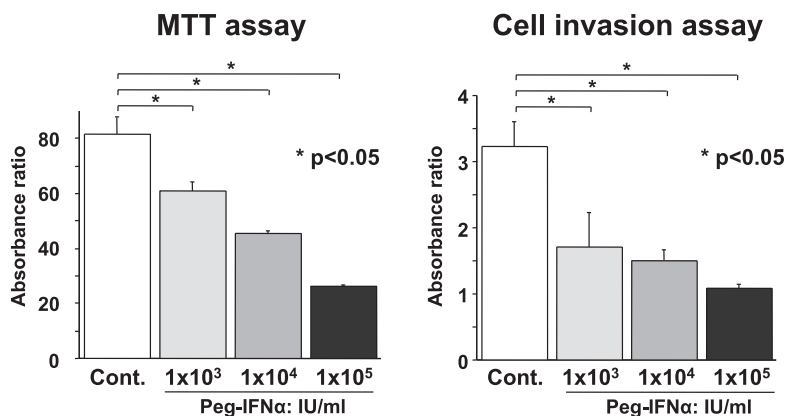


図2. MH134に対する PegIFN α の増殖・浸潤抑制効果

MH134細胞は PegIFN α により濃度依存性に増殖、浸潤能が抑制された。

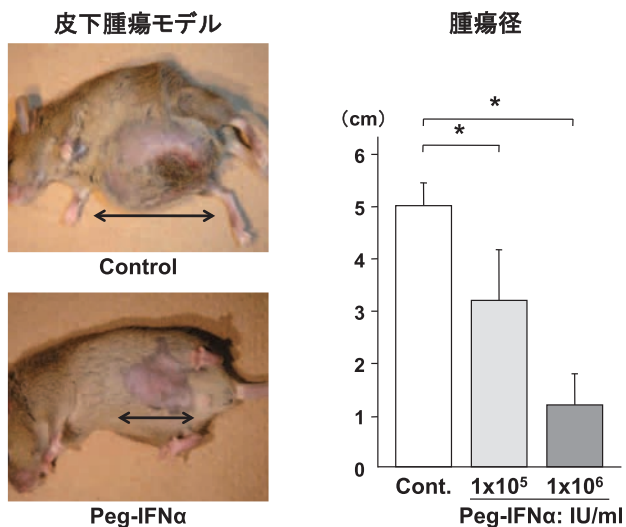


図3. 皮下腫瘍モデルにおける PegIFN α の抗腫瘍効果
皮下腫瘍モデルにおいて、PegIFN α 投与群は対照群と比較し腫瘍径が有意に小さかった。

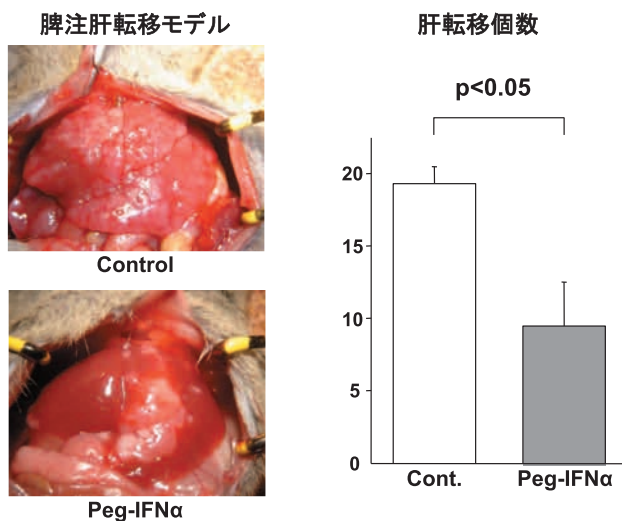


図4. 脾注肝転移モデルにおける PegIFN α の転移抑制効果
PegIFN α 投与により肝転移個数は有意に減少した (投与群 6 個 vs. 対照群19個)。

(2) 臨床的検討

IFP 施行群において、問題となる有害事象は認めなかった。患者背景では年齢、性別、肝炎ウイルス、肝機能、腫瘍因子において両群間で有意差は認めなかった (表1)。

IFP 群の累積生存率は1年100%、3年65%、5年54%であり、非施行群の1年38%、3年25%、5年19%と比較し有意に良好であった。無再発生存率でも IFP 施行群が非施行群と比較し有意に良好であったが、IFP 群においても術後早期に再発をきたす症例が多かった (図5, IFP 群: 1年36%、3年36%、非施行群: 1年25%、3年19%)。

表1. 臨床病理学的背景因子の比較

因子	IFP 群 (n=14)	非施行群 (n=16)
年齢 (歳)	56.0	57.5
男性/女性	12/2	12/4
HBV/HCV/NBNC	6/5/3	6/5/5
ICGR15 (%)	12.3	13.5
T-bil (mg/dl)	0.9	0.7
Alb (g/dl)	3.95	3.74
AFP (ng/ml)	2781	711
PIVKA-II (mAU/ml)	4050	5110
Child-Pugh (A/B)	14/0	15/1
腫瘍径 (cm)	8.6	8.2
分化度 (高/中/低)	0/11/3	1/10/5

全ての項目において有意差なし

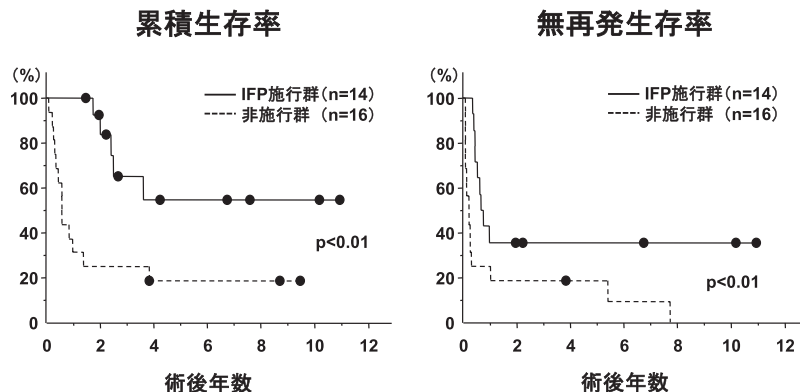


図5. V_p ≥ 2 症例における累積・無再発生存率
IFP 群の累積生存率は非施行群と比較し有意に良好であった。無再発生存率でも IFP 施行群が非施行群と比較し有意に良好であった。

再発パターンをみると IFP 非施行群ではほとんど全て残肝多発，遠隔転移再発といった制御不能な再発であったのに対して，IFP 施行群では再発 9 例中 4 例は残肝単発での再発であり，再発時に局所治療での病勢コントロールが可能であった（図 6）。同様に Vp 3 - 4 症例で

IFP 群	無再発生存	5 (全生存)
	再発	9 (生存 3)
	残肝単発	3
	残肝多発	3 (1例:3個)
	遠隔転移	3 (1例:腫瘍切除)
制御可能: 5 / 9		
非施行群	無再発生存	3
	再発	13
	残肝単発	1
	残肝多発	9
	遠隔転移	3
制御可能: 1 / 13		

図 6. IFP 群，非施行群における再発パターンの比較
非施行群では制御不能な再発がほとんどであったが，IFP 施行群では再発時に局所治療により病勢コントロールが可能な症例が多かった。

生存率を検討すると，累積生存率は IFP 施行群 (n=8) で 1 年 100%，3 年 86%，非施行群 (n=8) で 1 年 0%，無再発生存率は IFP 施行群で 1 年 50%，3 年 50%，非施行群で 1 年 0% と Vp 3 - 4 の高度進行例ではより大きな差を認めた（図 7）。

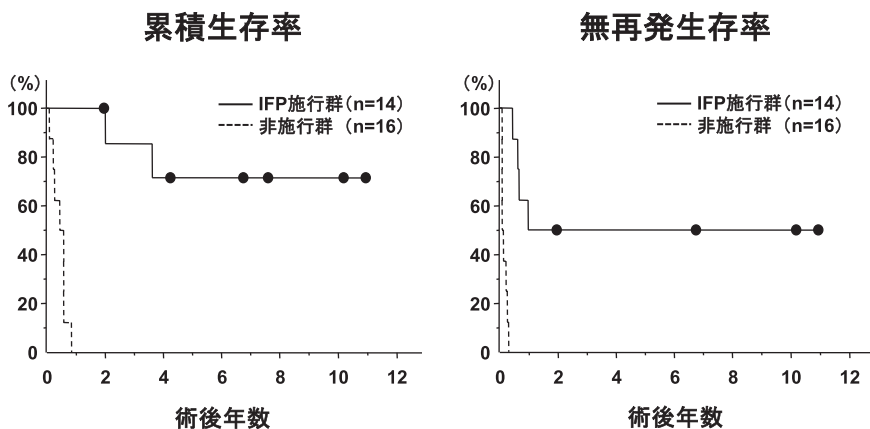


図 7. Vp ≥ 3 症例における累積・無再発生存率
Vp 3 - 4 の高度進行例における累積・無再発生存率とも IFP 施行群 (n=8) で有意に良好であった (累積生存率: IFP 施行群 1 年 100%，3 年 86%，非施行群 1 年 0%，無再発生存率: IFP 施行群 1 年 50%，3 年 50%，非施行群 1 年 0%)。

IFP 療法により長期無再発生存している高度門脈侵襲陽性肝癌症例

50代の男性，HCV 陽性。肝右葉を占拠する径 16cm の巨大腫瘍および右門脈から本幹さらには左門脈二次分枝まで伸びる腫瘍栓を認めた（図 8）。肝機能は良好であり，肝外病変もなかったことから拡大肝右葉切除術，門脈内腫瘍栓摘出術を施行した。術後 6 週間後より IFP 療法を 4 週間施行した。以後，外来通院で経過観察しているが術後 11 年経過した現在も無再発生存中である。

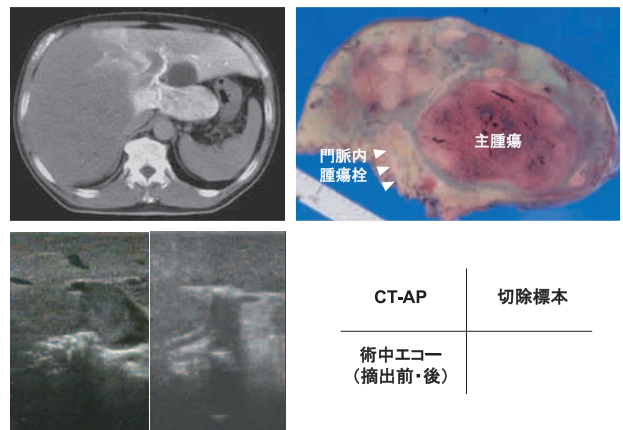


図 8. 長期無再発生存している高度門脈侵襲陽性肝癌 (Vp 4) 症例
肝右葉を占拠する巨大肝癌で，門脈左枝 (対側) まで腫瘍栓が進展していた。術後 IFP 療法 (4 週間) を施行し，術後 11 年経過し無再発生存中である。

考 察

近年の画像診断技術の進歩に伴い、肝癌は比較的早い段階で発見されることが多くなった⁶⁾。治療の面からも、肝切除・経皮的焼灼療法・肝動脈塞栓術等各種治療法の進歩、さらには肝移植治療の普及により、肝細胞癌の予後は全体として改善した⁷⁾。しかしながらその一方で、肉眼的門脈侵襲特に Vp 2 以上の進行肝癌となると、標準的かつ効果的な治療法はなく、その予後は未だ著しく不良である⁸⁾。「科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン」においても、肉眼的脈管侵襲を伴わない肝細胞癌に関しては、積極的治療が勧められている⁴⁾。すなわち、肝障害度 A/B かつ単発あるいは 3 cm、3 個以内の肝細胞癌に対しては、切除もしくは局所療法、肝障害度 C で 3 cm、3 個以内の肝細胞癌に対しては肝移植、良好な成績とともに推奨されている。しかしながら、脈管侵襲あるいは肝外転移を伴うものに関しては標準的かつ効果的な治療法は推奨されておらず、肝癌治療の中でそれら高度進行肝癌の治療のみが、いわば手つかずの状態である^{4,8)}。2009年度版の肝癌診療ガイドラインでは「インターフェロン併用化学療法は有用か?」という clinical question に対して、「インターフェロン併用化学療法は有用と考えられ、行うことを考慮してもよいが、十分な科学的根拠がない」(グレード C1)と記載されている。しかし、高度の門脈侵襲を伴う進行肝癌に対する IFN α 全身投与の併用療法は、門脈本幹に腫瘍栓を有する肝癌に対し、シスプラチン単独肝動注との比較試験 (RCT) でその有用性が証明されている⁹⁾。また、IFN α 併用シスプラチン全身投与では奏効率は13.3%であり、生存期間の延長もみられたという報告もある¹⁰⁾。

IFN/5FU 療法は高度進行肝癌に対する治療として、わが国を中心として行われてきた^{11,12)}。歴史的にはまず IFN のみの単独全身投与が行われたが、それらの成績は、奏効率10%以下と芳しくなかった^{13,14)}。また、全身化学療法と IFN の併用では、奏効率が10~25%と IFN 単独投与よりは高い傾向にあったが、まだ不十分な結果であった^{15,16)}。しかしながら、これら全身投与に使用された薬剤は、ほとんどが doxorubicin であった。その後、

肝動注療法と IFN との併用では、奏効率は30~50%と非常に良好な結果が報告された^{11,12)}。肝動注に使用された薬剤は殆どが cisplatin あるいは5FU 系薬剤であった。Ota ら¹¹⁾の報告では、Vp 4 あるいは多発肝内転移のため切除不能な症例に対して、IFN 併用5FU 肝動注療法による1年生存率は49%、CR 症例 (15%)に限ると1年生存率は83%と報告されている。Obi ら¹²⁾の報告でも、全症例の1年生存率は34%、CR 症例 (16%)の1年生存率は81%と報告されている。さらに興味深いことに、既に肝外転移をきたしている症例に関する IFN 併用5FU 肝動注療法の有効例はほとんど報告されておらず、PD 症例において1年以上の予後が得られた症例はほとんどみられない。すなわち、IFN/5FU 療法は、主腫瘍の進展の抑制のみならず、血液中癌細胞の着床・転移を抑制している可能性がある。そのような概念から、われわれは肉眼的門脈侵襲陽性肝癌に対する治療切除後の補助療法として、IFN 併用の Low-dose FP (5FU/CDDP) 経静脈的全身投与を行うことにした。

今回の検討では、IFP 施行群において累積および無再発生存率は、非施行群と比較して有意に良好であった。特に、Vp 3-4 症例16例では、8例に肝切除後 IFP 療法を、8例には肝切除のみを行ったが、IFP 施行群の1年生存率が100%であったのに対して、非施行群では全例1年以内に死亡していた。しかしながら、無再発生存率をみると、IFP 施行群は非施行群より良好ではあるが、多くは術後早期に再発をきたしていた。IFP 施行群における良好な累積生存率には、再発形式の違いが影響しているのではないかと考えている。実際、IFP 群の再発の多くは、残肝内への単発再発や制御可能 (局所治療が可能) な肺転移であったのに対し、非施行群は全て制御不能な再発であった。

IFN の抗腫瘍効果に関しては、マウス肝癌細胞を用いた実験で増殖抑制、浸潤抑制効果および脾注肝転移モデルでの肝転移抑制効果を証明した¹⁷⁾。臨床的には単独での抗主応効果は認めないため、5FU あるいは CDDP との組合せで、ある種の相乗効果をしめしているものと考えられる。Takaoka ら¹⁸⁾は、IFN が5FU による腫瘍細胞アポトーシスを増強させる p53 を誘導することを報告

した。また、Eguchiら¹⁹⁾は、細胞周期関連蛋白であるp27の発現増強を介してIFNの効果が発揮されることを報告している。5FUの中間代謝物質(FdMP)の細胞内農道上昇効果、あるいはthymidylate syntase阻害率の上昇などの報告もある^{20,21)}。また、IFN/5FUあるいはIFN/FP療法の臨床的効果からは、今回のわれわれの結果が示すように肝癌細胞の着床・転移抑制効果も推測され、今後のさらなる研究が期待される。

結 語

われわれが行っているIFP療法は、肉眼的門脈侵襲陽性肝癌術後の制御不能な再発を予防し、予後を改善する可能性がある有用な治療戦略と考えられる。

文 献

- 1) Imamura, H., Matsuyama, Y., Tanaka, E., Ohkubo, T., *et al.*: Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J. Hepatol.*, **38**: 200-207, 2003
- 2) Llovet, J. M., Fuster, J., Bruix, J.: Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology*, **30**: 1434-1440, 1999
- 3) Poon, R. T., Fan, S. T., Ng, I. O., Lo, C. M., *et al.*: Different risk factors and prognosis for early and late intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **89**: 500-507, 2000
- 4) 日本肝臓学会 編: 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン2009年度版. 金原出版.
- 5) Arii, S., Sata, M., Sakamoto, M., Shimada, M., *et al.*: Management of hepatocellular carcinoma: Report of Consensus Meeting in the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009). *Hepatol. Res.*, **40**(7): 667-685, 2010
- 6) Kanematsu, M., Hoshi, H., Yamada, T., Murakami, T., *et al.*: Small hepatic nodules in cirrhosis: ultrasonographic, CT, and MR imaging findings. *Abdom. Imaging*, **24**: 47-55, 1999
- 7) Poon, R. T., Fan, S. T., Tsang, F. H., Wong, J., Locoregional therapies for hepatocellular carcinoma: a critical review from the surgeon's perspective. *Ann. Surg.*, **235**: 466-486, 2002
- 8) Shimada, M., Yamashita, Y., Hamatsu, T., Rikimaru, T., *et al.*: Surgical indications for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, **47**: 1095-1099, 2000
- 9) Chung, Y. H., Song, I. H., Song, B. C., Lee, G. C., *et al.*: Combined therapy consisting of intraarterial cisplatin infusion and systemic interferon-alpha for hepatocellular carcinoma patients with major portal vein thrombosis or distant metastasis. *Cancer*, **88**(9): 1986-1891, 2000
- 10) Ji, S. K., Park, N. H., Choi, H. M., *et al.*: Combined cisplatin and alpha interferon therapy of advanced hepatocellular carcinoma. *Korean J. Intern. Med.*, **11**(1): 58-68, 1996
- 11) Ota, H., Nagano, H., Sakon, M., Eguchi, H., *et al.*: Treatment of hepatocellular carcinoma with major portal vein thrombosis by combined therapy with subcutaneous interferon-alpha and intra-arterial 5-fluorouracil; role of type 1 interferon receptor expression. *Br. J. Cancer*, **93**: 557-564, 2005
- 12) Obi, S., Yoshida, H., Toune, R., Unuma, T., *et al.*: Combination therapy of intraarterial 5-fluorouracil and systemic interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma with portal venous invasion. *Cancer*, **106**: 1990-1997, 2006
- 13) Llovet, J. M., Sala, M., Castells, L., Suarez, Y., *et al.*: Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **31**: 54-58, 2000
- 14) Sachs, E., Di Bisceglie, A. M., Dusheiko, G. M., Song, E., *et al.*: Treatment of hepatocellular carcinoma with recombinant leucocyte interferon: a pilot study. *Br.*

- J. Cancer, 52 : 105-109, 1985
- 15) Feun, L. G., Savaraj, N., Hung, S., Reddy, R., *et al.* : A phase II trial of recombinant leukocyte interferon plus doxorubicin in patients with hepatocellular carcinoma. Am. J. Clin. Oncol., 17 : 393-395, 1994
- 16) Colleoni, M., Buzzoni, R., Bajetta, E., Bochicchio, A. M., *et al.* : A phase II study of mitoxantrone combined with beta-interferon in unresectable hepatocellular carcinoma. Cancer, 72 : 3196-3201, 1993
- 17) Arakawa, Y., Shimada, M., Utsunomiya, T., Imura, S., *et al.* : Effects of pegylated interferon $\alpha 2b$ on metastasis of hepatocellular carcinoma. J. Surg. Res, (in press)
- 18) Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., *et al.* : Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. Nature, 424 : 516-523, 2003
- 19) Eguchi, H., Nagano, H., Yamamoto, H., Miyamoto, A., *et al.* : Augmentation of antitumor activity of 5-fluorouracil by interferon alpha is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. Clin. Cancer Res., 6 : 2881-2890, 2000
- 20) Schwartz, E. L., Hoffman, M., O'Connor, C. J., Wadler, S. : Stimulation of 5-fluorouracil metabolic activation by interferon-alpha in human colon carcinoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 182 : 1232-1239, 1992
- 21) Wadler, S., Schwartz, E. L. : Antineoplastic activity of the combination of interferon and cytotoxic agents against experimental and human malignancies : a review. Cancer Res., 50 : 3473-3486, 1990

Hepatic resection followed by systemic IFN plus low-dose FP for advanced HCC with macroscopic portal invasion : basic background and clinical outcome

Satoru Imura, Jun Hanaoka, Mami Kanamoto, Hiroki Mori, Tetsuya Ikemoto, Yuji Morine, Tohru Utsunomiya, and Mitsuo Shimada

Department of Digestive Surgery and Transplantation, Tokushima University Hospital, Tokushima, Japan

SUMMARY

Background and Aims : Despite a recent progress of treatment for hepatocellular carcinoma (HCC), the prognosis of advanced HCC with macroscopic vascular invasion remains unsatisfactory. We investigated anti-tumor effect of IFN α using experimental model and show the outcome of our systemic adjuvant therapy consisting of IFN α , 5FU and cisplatin (IFP) after hepatectomy on advanced HCC with macroscopic portal invasion. Methods : [Basic study] Anti-tumor effects such as inhibition of invasion, proliferation of pegylated IFN α 2b (PegIFN α) was evaluated using MH134 mouse HCC cells, *in vitro* and *in vivo*. [Clinical study] : Thirty patients who had HCC with Vp2 or more of macroscopic portal invasion (Vp2 ; portal vein tumor thrombus in its 2nd order branch) were included. Those patients were retrospectively divided into two groups : the systemic IFN α , 5FU and cisplatin group (n=14, IFP group) ; and the no adjuvant therapy group (n=16, control). Clinicopathological variables were compared between the two groups, including patient survival and disease-free survival. Results : [Basic] *In vitro*, the proliferation was significantly suppressed by Peg-IFN α , and invasion potential was also inhibited. *In vivo*, tumor growth was significantly suppressed compared to control (0.5 vs. 5.0cm, p<0.05), and liver metastases was decreased (number : 19 vs. 6, p<0.05). [Clinical] The overall and disease-free survival rate in IFP group was significantly higher than in control group (1y : 100% vs 38%, 3y : 65% vs 25%, P<0.01, 1y : 36% vs 25%, 3y : 36% vs 19%, P<0.01). Regarding the recurrent patterns, 5 of 9 patients in IFP group had controllable tumors in the remnant liver, although 12 of 13 patients in control group had distant metastasis or multiple recurrences in the residual liver. Conclusion : Our new adjuvant regimen of systemic IFP may be a promising strategy after radical resection for HCC with macroscopic portal invasion.

Key words : hepatocellular carcinoma, portal vein tumor thrombus, interferon, chemotherapy