

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

新規肝がん関連遺伝子の網羅的探索と
DNA チップを用いた遺伝子の相互関連性に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 油 谷 浩 幸

平成 16 (2004) 年 3 月

目 次

I	構成員名簿	1
II	平成 15 年度総括研究報告書	5
III	平成 15 年度分担研究報告書	
	肝細胞癌の遺伝子発現プロファイル解析に関する研究	13
	東京大学国際・産学共同研究センター教授 油谷 浩幸	
	早期肝細胞癌の血清マーカーとしての可溶性アミノ末端 グリピカン 3 (sGPC3) の同定	19
	東京大学国際・産学共同研究センター教授 油谷 浩幸	
	肝がん関連遺伝子の分子病理学的解析	25
	東京大学大学院医学系研究科教授 深山 正久	
	臨床検体の収集・臨床疫学的解析	31
	東京大学医学部肝胆膵外科・移植外科教授 幕内 雅敏	
	知的統合によるがん関連遺伝子相互作用の推定と可視化の研究	37
	東京大学先端科学技術研究センター教授 井原 茂男	
IV	研究成果の刊行に関する一覧表	43

構成員名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	油谷 浩幸	東京大学国際・産学共同研究センター	教授
分担研究者	深山 正久	東京大学大学院医学系研究科	教授
分担研究者	幕内 雅敏	東京大学医学部肝胆膵外科・移植外科	教授
分担研究者	井原 茂男	東京大学先端科学技術研究センター	教授

(事務局) 経理事務連絡担当責任者 安田 道義
東京大学生産技術研究所 経理課長
〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1
電話 : 03-5452-6041 (直通) FAX : 03-5452-6075

E-mail: haburata-ky@umin.ac.jp (油谷) / myasuda@iis.u-tokyo.ac.jp (安田)

Ⅱ 平成 15 年度総括研究報告書

新規肝がん関連遺伝子の網羅的探索と
DNA チップを用いた遺伝子の相互関連性に関する研究

代表研究者 油谷浩幸 東京大学国際・産学共同研究センター教授

研究要旨

肝細胞の癌化機構の包括的な解明のためには、発現プロファイル解析に加えて発癌関連遺伝子の変異、ヘテロ接合性の消失や染色体異常、エピジェネティクス、蛋白発現など生体内試料から得られる種々の情報を統合した解析が必要であり、臨床情報、文献情報などの既存の情報を他の生命情報と統合して総合的に解析するシステムの開発が求められる。本年度は発現プロファイルデータにゲノム領域による偏りが見られることを見出し、ゲノム解析を並行して行うことの重要性を示唆した。診断あるいは治療の新規標的分子候補として分泌蛋白質あるいは膜蛋白質を探索した結果、選出された GPC3 分子について詳細な構造解析を行い、sGPC3 血清測定系の樹立を行い、新規肝癌腫瘍マーカー-sGPC3 の有用性を再確認できた。免疫組織化学的手法により肝細胞癌の組織診断マーカーとして日常診断に貢献し得ることが示された。

分担研究者

油谷浩幸 東京大学国際・産学共同研究センター・教授
深山正史 東京大学医学部病理学・教授
幕内雅敏 東京大学医学部肝胆膵外科・教授
井原茂男 東京大学先端科学技術研究センター・教授

た莫大な実験情報の統合と分析をする上で、従来の数理学的手法は有用ではなく新たな作業仮説の構築が求められるが、それには臨床情報、文献情報などの既存の情報を他の生命情報と統合して総合的に解析するシステムの開発がまず必要である。臨床医学、病理学、情報研究者との連携において本年度は下記の研究項目を実施した。

A. 研究目的

肝細胞癌は本邦における悪性新生物による死亡率（男性）の第3位であり、その発症・悪性化に関連する分子の同定およびメカニズムの解明は重要な課題である。ゲノム計画の成果により遺伝子発現レベルを網羅的に探索することが可能となったが、発癌関連遺伝子の変異、ヘテロ接合性の消失（LOH, loss of heterozygosity）や染色体異常、エピジェネティクス、蛋白発現、など生体内試料から得られる種々の情報を統合した解析により、初めて肝細胞の癌化機構の包括的な解明が可能になる。こうし

- 1) 肝がんの網羅的遺伝子発現プロファイルリング解析
- 2) 遺伝子変異及びメチル化による遺伝子不活化に関する解析
- 3) 新規肝細胞癌マーカーとしての sGPC3 の開発
- 4) がん関連遺伝子相互作用の推定と可視化

発現プロファイル解析により肝細胞癌組織において高発現する遺伝子群を同定し、診断あるいは治療の新規標的分子候補として分泌蛋白質あるいは膜蛋白質を探索した結果、選出された GPC3 分子について詳細な

構造解析を行い、血清測定系の樹立を試みた（項目3）。分担研究者の幕内らにおいては sGPC3 血清値の測定、深山らには肝腫瘍における GPC3 の免疫組織染色についての詳細な検討を中心に進めていただいた。

B. 研究方法

発現プロファイル解析 高分化、中分化、低分化の肝細胞癌それぞれ 10,13,8 例および肝硬変または肝炎の肝組織 19 例の計 50 例サンプルについて、U95A アレイ

（Affymetrix）を用いて 12000 遺伝子の発現プロファイルを取得した。主成分分析やクラスタ解析は定法による。

EIM 解析 遺伝子について LocusLink 情報からそれぞれヒトゲノム配列上の位置を取得し、ゲノム上に沿った表示を行うようにした。非癌部肝組織の遺伝子発現情報から背景となる肝における発現の平均と標準偏差から有意に発現の異なっている遺伝子群を取得し、同様にゲノム上にマッピングした。この際に単純に遺伝子を一つの点として表示するのではなく、遺伝子の集合を超幾何分布で有意性を考慮するようにした。計算は図 1 のように、全ての遺伝子の並びを考慮し、背景肝と異なる発現を示す遺伝子が有意に集合する部分で領域として明るく表示されるようにした。また、ゲノムの領域に沿って有意に発現の異なる部分については、ゲノムからのリアルタイム PCR を施行し、ゲノムコピー数の変化を検証した。

可溶性アミノ末端グリピカン 3 (sGPC3) の同定 1) 組み換え GPC3 蛋白の精製は GPC3 の C 端の GPI アンカードメインを欠いた GPC3_GPI (1 から 563 番目のアミノ酸) およびさらにヘパラン硫酸を欠いた GPC3_GPI_HS (⁴⁹⁵Ser と ⁵⁰⁹Ser を Ala に改変) に FLAG タグを C 端に付加した融合蛋白を CHO 細胞で安定発現株を樹立し、その培養上清より GPC3_GPI-FLAG および GPC3_GPI_HS-FLAG をアフィニティー精製した。2) モノクロナル抗体作成は GPC3_GPI

を抗原としてマウスを免疫し、定法に従いハイブリドーマを得た。エピトープマップ用に GPC3 (アミノ酸 25 から 358) と GST の融合蛋白を大腸菌の系で発現させて特異性を確認した。3) サンドイッチ ELISA による sGPC3 測定系は anti-GPC3 抗体 A1836A を 96 穴プレートに固相化し、ビオチン化した anti-GPC3 抗体 M18D04 と M19B11 に HRP-で発色させ、450nm の吸光度を測定した。スタンダードには精製した GPC3_GPI を用いた。4) アミノ酸配列決定には精製した GPC3_GPI と GPC3_GPI_HS を SDS-PAGE で分離後 PVDF 膜に転写、CBB R-染色を行い、40kDa と 30kDa に相当するバンドの切り出しを行った。40kDa のバンドの N 末端の配列決定を試みたが、何らかの修飾を受けていたため、トリプトファンの C 末端側で切断を行い、断片化したペプチドに対して再度アミノ酸配列の決定を行った。FASTS というアルゴリズムを用いて配列の並びかえおよび検索を行った。

ELISA を用いた患者血清測定 凍結保存血清を用いて血中 sGPC3 濃度の測定を 66 例の肝癌、38 例の肝硬変、96 例の健常者の血清に対しておこなった。

免疫組織化学的解析 対象は、肝細胞癌 56 例(高分化型 18 例、中分化型 29 例、低分化型 9 例)、胆管細胞癌 16 例、肝カルチノイド腫瘍 1 例、転移性肝癌 23 例、肝細胞腺腫 7 例、異形成結節(低異型度 8 例、高異型度 8 例)である。

知的統合によるがん関連遺伝子相互作用の推定と可視化 発現プロファイルデータに対し、情報解析するためのデータベースを中心とする情報処理基盤を構築し、さらには肝炎のデータを解析するために有効な以下の具体的な情報処理解析ツールを作成しつつ、技術開発を行ない、検証を行なった。遺伝子相互作用抽出に絞り、2 項関係の抽出から全体の相互作用を構築するアプローチを採用した。ここでは、従来の自然言語処理を用いた文書集合からの蛋白質名

抽出による辞書の構築に加え、様々な形で蛋白質のデータを持つデータ集合から機械学習の手法を用いて蛋白質名をより効率的に抽出する手法を確立することにした。

(倫理面への配慮)

3省庁合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文科省、厚労省・経済省告示第一号）」に従い東京大学医学部附属病院肝胆膵外科において採取する際に研究に用いることへのインフォームドコンセント取得済みの検体を用いている。

C. 研究結果

肝細胞癌の発現プロファイル解析 EIMの解析結果画面では、それぞれの列は個々の症例についての表示であり、右側に肝と比較しての発現上昇、左側に発現低下の解析結果が表示されている。明るく表示される部分は有意に発現の異なる遺伝子が集中する領域（Expression Imbalance Region, EIR）である。全肝細胞癌サンプルの20%で3Mbp以上に渡って共通に認められた領域を抽出すると、1q,8q,12q,17q,20qにおいて発現上昇、4q,8p,13q,17pにおいて発現低下するEIRが認められた。これらのEIR領域について100kbpを最小単位としてまとめると12q,17q,20,4qの部位のEIRは分化型に関連して存在していた。さらに、1q21-23領域に存在する遺伝子座CCT3およびPSMB4の部位で同一症例のゲノムDNAからリアルタイムPCRでゲノムの量を測定すると、EIRの有意な部位ではゲノムの増幅が認められた。

GPC3のN端断片は³⁵⁸Argと³⁵⁹Serの間の切断により生成する GPC3の抗原を精製する過程で、我々は全長の66kDaに加えて40kDaのバンドが検出された。40kDaバンドを回収、断片化、アミノ酸配列を決定したところ、トリプトファン(W)に続いてVRY, EPX, YES, ITY, LPX, QSVという配列が得

られた。FASTA アルゴリズムを用いて整列させたところ、(W)VPETPV (アミノ酸51-57), (W)YCSYQ (アミノ酸261-267) および (W)REYILS (アミノ酸296-302)とGPC3の部分配列と一致したため、この断片を可溶型(soluble)という意味のsGPC3と名付けた。さらに詳細にsGPC3を解析するためにC端側の断片の切断点を同定しようとしたが、この断片は糖鎖が付加されスミア状になるため、まず糖鎖付加部位のセリンをアラニンに置換してGPC3_GPI_HSを作成したところ予想通り30kDaのバンドが認められた。アミノ酸配列を決定したところ、SAYYPEDLFでありGPC3の359から367番目までのアミノ酸に一致した。すなわち³⁵⁸Argと³⁵⁹Serの間に切断されることが証明され、予想分子量は38.1kDaとなりSDS-PAGE上の40kDaとほぼ一致した。

sGPC3は肝癌患者血清中に検出される主要なGPC3の断片である GPC3に対する特異的なモノクロナル抗体を作成し、エピトープとしてsGPC3を含むかどうかでN-mAbsとC-mAbsとに分類された。イムノブロットングではコア蛋白(66kDa)と糖鎖修飾型(スミア)がN-mAbsとC-mAbsの両方により検出されたが、sGPC3(40kDa)はN-mAbsのみにより検出されたが、sGPC3は培養上清中でのみN-mAbsにより検出された。これらの結果からGPC3のコア蛋白ではなくsGPC3がHCC患者血清中に存在する主要なGPC3である可能性が想定された。免疫沈降後にイムノブロットングを行ったところ、予想通りsGPC3のみが肝癌患者特異的に検出された。

sGPC3測定系の構築 sGPC3に対するサンドイッチELISA測定系の特異性を確認するために、sGPC3レベルが4.0から55.0ng/mlの肝癌患者血清10例と0.1mg/ml以下の正常人3例について免疫沈降を行ったところ、肝癌患者特異的に、定量性も持った形でsGPC3のバンドが検出された。この測定系を用いて分担研究者の幕内らにより肝

癌・肝硬変患者の血清を多数測定し、その早期診断における有用性を示した。

肝癌、肝硬変、健常者での血清 sGPC3 測定 血中 GPC3 濃度の測定を 69 例の肝癌、38 例の肝硬変、96 例の健常者の血清に対しておこなったところ、sGPC3 (平均値±標準偏差) は健常者では 0.65 ± 0.32 、肝硬変では 1.09 ± 0.74 、肝癌では 4.84 ± 8.91 であり、正常肝、肝硬変に対して肝癌で高発現だった (それぞれ $P < 0.0001$ 、 $P < 0.01$ 、Student's *t*-test)。また、早期の患者がより多く含まれる外科手術症例では 2.61 ± 2.69 だったのに対して、進行癌・多発例が多く含まれる TAE (肝動脈塞栓術) 症例では 8.36 ± 13.3 であり、癌の進展に伴い上昇していく傾向を示した。肝癌と肝硬変の患者のデータを用いて ROC (Receiver Operating Characteristic) curve を作成したところ、肝癌全体では AFP の方がやや有用なマーカーであったものの両者間には相関が認められず ($r=0.13$)、組み合わせて測定した場合に感度が 72% まで増加し、sGPC3 は AFP を補完するマーカーとして有用と考えられた。高分化・中分化型肝癌における sGPC3 についての役割を検討すべく、手術後の病理診断で高分化・中分化型と診断された 32 例のみについて解析した。ROC curve を作成したところ、曲線の囲む面積で AFP 0.710 に対して sGPC3 は 0.726 と sGPC3 がより有用だった。

免疫組織化学的解析 GPC3 は臨床検体において肝細胞癌症例の 84% に強陽性であったが、胆管細胞癌、カルチノイド腫瘍、肝細胞腺腫には全例陰性であった。転移性肝癌は 1 例のみ部分的陽性像を示した他は全例陰性であった。また、前癌病変的病変と考えられている異形成結節では、一部の症例 (低異型度症例の 25%、高異型度症例の 75%) に部分的弱陽性像を認めた。

知的統合によるがん関連遺伝子相互作用の推定と可視化 遺伝子、蛋白質、化合物などの生物医学関係の多くの情報が文献情報

として電子化、データベース化されているなかで特に重要なのが PubMed である。PubMed から専門家が査読した情報のデータベースの信頼性は高いには違いないが、膨大なデータの増加に対応するのが困難になりつつある。そこで PubMed を利用できるようなシステムを構築した。入手可能なデータベースから辞書に必要な用語を抽出した。次に、文献から必要な情報を信頼度高く抽出し、分かりやすい形で表示する自然言語処理技術を応用した文献検索システムの構築を PC クラスタ 11 台 (LINUX) で行なった。さらに、信頼できる結果が得られるように脊椎動物に対して蛋白質・遺伝子名辞書の用語の数を 20 万件にまで拡大した。さらに相互作用を表す動詞を整備することにより、2 対の蛋白質・遺伝子名の相互作用を文献から抽出した。クエリーの蛋白質に対して、多数の相互作用を半機械的に表示することができるようになった。正答率と網羅性とは相反するが、データ抽出のパラメータをチューニングし、ある程度の網羅性を保ったまま、正答率を平均 85% 以上にすることができた。一方、極めて多数の遺伝子から構成されるネットワークから特定のネットワークを抽出することが重要である。その機能を持つインターフェースを開発した。そのシステムを利用し、癌など様々な病態で出現してくる NFκB-TNF-IκB 周りのパスウェイをクエリーとして、システム文献から得られる大規模なパスウェイからの特定を試みた。

D. 考察

我々の開発した Expression Imbalance Map 法を肝細胞癌の臨床検体の解析に適用した。これにより、肝細胞癌ではゲノム部位に相関して遺伝子発現量に変化している領域が認められた。すなわち、発現変化が有意な部位ではゲノムの量に変化していることを示唆する結果となった。EIR 部位は分化型との相関を示す一方で、確率的に起きてい

る部分も認められる。このため、単純な遺伝子発現プロファイルのクラスター解析に加えて、このような領域を考慮した解析を行う必要があると考えられた。ゲノムアレイを用いて LOH 解析を含めての高解像度のゲノムコピー数解析法を開発中であり、コピー数と発現量の関係をさらに明らかにできるものと期待される。

GPC3 はヘパラン硫酸プロテオグリカンであるグリピカンのファミリーに属し、構造上の共通の特徴として分子量約 60kDa のコア蛋白、GPI アンカーを介する膜への結合、C 端側に存在する Ser-Gly に対する糖鎖の付加、保存された 14 個の Cys 残基などがあげられる。GPC3 はもともと胎生期の腸管に時期特異的に発現する遺伝子として同定され、その変異が Simpson-Golabi-Behmel 症候群という臓器肥大を呈する先天性疾患をきたすことから、アポトーシス作用を有することが知られ、実際多くの癌では発現が抑制されている。我々を含む複数のグループから肝癌における GPC3 の転写レベルの亢進が報告されているが、その意味はあまり明らかでない。我々は蛋白レベルでも肝癌における GPC3 の発現亢進を昨年世界に先駆けて報告したが、その際用いた抗体は C 末を認識するものだったため、sGPC3 の発見にはいたらなかった。

今回、測定系を構築するために複数の抗体が必要となりあらためて免疫原を作成する過程で、sGPC3 の存在を見出し、その切断点も同定した。さらに、診断の標的として sGPC3 のみが主要な血清中 GPC3 であり、全長の GPC3 は過去の報告にもあるように膜に結合しているか、GPI アンカーがはずれていても膜に存在している可能性が高いと考えられる。我々はさらに測定系を構築し、実際に早期の肝癌で有用であることを明らかにした。AFP との相補性も含め、早期肝癌の検出率向上に役立つと考えられるが、切断された膜上の GPC3 も治療の標的として有望と考えられ、GPC3 は肝癌の診

断および治療におけるテーラーメイド医療の中心的な分子になる可能性もあると思われる。今後のさらなる研究が望まれる。

肝癌の早期診断に高感度の腫瘍マーカーは必須だが、40 年前から現在まで広く使用されている AFP は、陰性のうちに超音波検査で先に肝癌が発見されることが近年多くなり、他の新規マーカーの開発が急務であった。今回血清を測定した sGPC3 は AFP を補完するのみでなく、分化度が比較的高い症例でも早期に陽性例となる場合が多いと考えられ、血清マーカーとして有望であると考えられる。mRNA レベルでの AFP に対する顕著な優位性は現時点の血清測定系においては達成されていないが、膜蛋白と分泌蛋白の違いによるものなのか、蛋白の安定性によるものなのか不明である。ただし、今後測定系の高感度化により、感度および特異性が上がることも予想され、将来的には標準的なマーカーになる可能性も示唆される。

GPC3 は臨床肝腫瘍検体において、肝細胞癌特異的に免疫組織化学的強陽性像を高率に示した。更に、肝細胞癌の分化度やサイズとの間に有意差は見られなかった。よって、日常診断上困難な、非常に高分化な肝細胞癌やサイズの小さな肝細胞癌の診断にも GPC3 の免疫組織化学的検索が有用であると考えられる。また、胆管細胞癌や転移性肝癌との鑑別困難な症例や、混合型肝癌などにおいても、GPC3 の蛋白レベルの発現パターンを検索することが日常組織診断の助けとなると考えられる。

がん関連遺伝子相互作用の推定と可視化システムについては、ユーザビリティの向上を考慮して文献情報処理技術を開発・改良した。相互作用の抽出のための技術として相互作用を記述する文章の鋳型を用いた抽出方法と、統計的分析に基づく抽出法を組み合わせて使い、さらに文章の鋳型を用いた抽出方法において、DIPRE アルゴリズムを応用することにより自動化を図った。

さらに相互作用を表す単語のオントロジーの導入により相互作用の分類を可能とした。これらの技術を用いているが、正答率は、85%にとどまった。これは、本技術開発が網羅性に主体をおいたことにもよるが、もともとの人間が記述する文章におけるシノニムが混乱しているためであると考えられる。これらの問題の克服には、さらなる情報処理技術の開発と同時に、ユーザである実験者と協力して様々な機能を開発すると同時に、シノニムの問題を協力して解決していくことが重要である。そのためには文献検索などによって既存の知識を統合化し、遺伝子の相互関連性を得るなど、次年度以降開発したツールを実際の解析に役立てることが必須である。

E. 結論

発現プロファイル解析データには変異の生じたゲノム領域に基づいたバイアスが存在しており、ゲノム領域の変異をパラメータとすることにより分化度分類との相関がよくなることが認められた。

GPC3 分子はヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、構造解析を行ったところ、主に可溶性アミノ末端グリピカン 3 (sGPC3) として血清中に存在することが明らかとなった。多数のモノクロナル抗体を作成し ELISA 測定系を樹立し、肝疾患患者において測定を行ったところ、有意に高値を示した。多数の患者血清を用いて改良型血清測

定系において新規肝癌腫瘍マーカー sGPC3 の有用性を再確認できたので、今後さらに大規模な臨床試験の実施が望まれる。モノクロナル抗体を用いた免疫組織化学的手法によって、肝細胞癌の組織診断マーカーとして日常診断に貢献し得ることが示された。

F. 健康危険情報

肝硬変患者の中で発癌リスクの高い群、術後の再発についての経過観察に有用な測定系が樹立された。組織診断マーカーとしても有効性が認められた。

G. 研究発表

1. 論文発表

(省略)

2. 学会発表

(省略)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

「癌高発現遺伝子」特願 2003- 290704、
2003.8.8

「GPC3 高感度測定法」特願 2004-036467

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ 平成 15 年度分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝細胞癌の遺伝子発現プロファイル解析に関する研究

分担研究者 油谷浩幸 東京大学国際・産学共同研究センター教授

研究要旨

遺伝子発現の変化がゲノム配列上の位置に相関して変化している領域に着目した解析法である Expression Imbalance Map (EIM) 解析を肝細胞癌の発現プロファイルデータの解析に応用した。コピー数に変異の生じたゲノム領域に基づいたバイアスが存在しており、ゲノム領域の変異をパラメータとすることにより分化度分類との相関がよくなることが認められた。

A. 研究目的

肝細胞癌の遺伝子発現プロファイルの解析において、教師なしのクラスター解析では分化型、ウイルス感染などの臨床情報との相関が認められない。そこで、遺伝子発現の変化がゲノムの位置に相関して変化している領域に着目した解析法である Expression Imbalance Map (EIM) 解析を行った。

B. 研究方法

高分化、中分化、低分化の肝細胞癌それぞれ 10, 13, 8 例および肝硬変または肝炎の肝組織 19 例の計 50 例サンプルについて、Affymetrix U95A アレイを用いて 12000 遺伝子の発現プロファイルを取得した。主成分分析やクラスター解析は定法によった。EIM 解析においては遺伝子について LocusLink 情報からそれぞれヒトゲノム配列上の位置を取得し、ゲノム上に沿った表示を行うようにした。非癌部肝組織の遺伝子発現情報から背景となる肝における発現の平均と標準偏差から有意に発現の異なっている遺伝子群を取得し、同様にゲノム上にマッピングした。この際に単純に遺伝子を一つの点として表示するのではなく、遺伝子の集合を超幾何分布で有意性を考慮するようにし

た。計算は図 1 のように、全ての遺伝子の並びを考慮し、背景肝と異なる発現を示す遺伝子が有意に集合する部分で領域として明るく表示されるようにした。また、ゲノムの領域に沿って有意に発現の異なる部分については、ゲノムからのリアルタイム PCR を施行し、ゲノムコピー数の変化を検証した。

(倫理面への配慮)

東京大学医学部附属病院肝胆膵外科においてインフォームドコンセントの下に腫瘍切除標本の一部を医学研究用に採取したものである。なお、本研究においてはジェノタイプ解析は含まない。

C. 研究結果

例として 1 番染色体の解析結果を示す (図 2)。それぞれの列は個々の症例についての表示であり、31 例が表示されている。右側に肝と比較しての発現上昇、左側に発現低下の解析結果が表示されている。明るく表示される部分は有意に発現の異なる遺伝子が集中する場所 (Expression Imbalance Region, EIR) である。全肝細胞癌サンプルの 20% で 3Mbp 以上に渡って共通に認められた領域を抽出すると、1q, 8q, 12q, 17q, 20q

において発現上昇、4q, 8p, 13q, 17p において発現低下する EIR が認められた。

これらの EIR 領域について 100kbp を最小単位としてまとめると図 2b となる。12q, 17q, 20, 4q の部位の EIR は分化型に相関して存在していた。さらに、1q21-23 の部位に存在する遺伝子座 *CCT3* および *PSMB4* の部位で同一症例のゲノム DNA からリアルタイム PCR でゲノムの量を測定すると、EIR の有意な部位ではゲノムの増幅が認められた。

D. 考察

我々の開発した Expression Imbalance Map 法を肝細胞癌の臨床検体の解析に適用した。これにより、肝細胞癌ではゲノム部位に相関して遺伝子発現量が増加している領域が認められた。すなわち、発現変化が有意な部位ではゲノムの量が増加していることを示唆する結果となった。EIR 部位は分化型との相関を示す一方で、確率的に起きている部分も認められる。このため、単純な遺伝子発現プロファイルのクラスター解析に加えて、このような領域を考慮した解析を行う必要があると考えられた。ゲノムアレイを用いて LOH 解析を含めての高解像度のゲノムコピー数解析法を開発中であり、コピー数と発現量の関係をさらに明らかにできるものと期待される。

E. 結論

発現プロファイル解析データには変異の生じたゲノム領域に基づいたバイアスが存在しており、ゲノム領域の変異をパラメータとすることにより分化度分類との相関がよくなることが認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A,

Midorikawa Y, Yamamoto S, Ihara S, Tokita S, Iwanari H, Ito Y, Nakano K, Nezu J, Tsunoda H, Yoshino T, Ohizumi I, Tsuchiya M, Ohnishi S, Makuuchi M, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H. Identification of Soluble Amino Terminal Fragment of Glypican-3 as a Serological Marker for Early Stage Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Research** in press

2) Ge X, Tsustumi S, Aburatani H, Iwata S. Reducing false positives in molecular pattern recognition. **Genome Informatics** 14:34-43, 2003

3) Jiang S, Tanaka T, Iwanari H, Hotta H, Yamashita H, Kumakura J, Watanabe Y, Uchiyama Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T, Naito M. Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4a (HNF4a) isoforms in human and rats. **Nuclear Receptor** 2003, 1:5

4) Sekoguchi E, Sato N, Yasui A, Fukada S, Nimura Y, Aburatani H, Ikeda K, Matsuura A. A novel mitochondrial carnitine-acylcarnitine translocase induced by partial hepatectomy and fasting. **J Biol Chem.** 278: 38796 - 38802, 2003

5) Shimizu H, Taniguchi H, Hippo Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Ishikawa T. Characterization of the mouse *Abcc12* gene and its transcript encoding an ATP-binding cassette transporter, an orthologue of human *ABCC12*. **Gene.** 310:17-28. 2003

6) Kano M, Nishimura K, Ishikawa S, Tsutsumi S, Hirota K, Hirose M, Aburatani H. Expression Imbalance Map: A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions. **Physiol Genomics.** 13: 31-46, 2003

2. 学会発表

1) Cold Spring Harbor Meeting 2004 3/4-3/7/2004 Systems Biology: Genomic Approaches to Transcriptional Regulation Effect of gene dosage on transcriptome analysis of cancer 油谷、石川、堤

2) 第 62 回癌学会 (名古屋) 9/25-27
Expression Imbalance Map による肝細胞癌の
染色体における包括的遺伝子解析 緑川
泰、堤 修一、西村邦弘、葛錫金、野中 綾、
上村直子、加納 真、坂本裕彦、幕内雅敏、
油谷浩幸

3) 94th, American Association for Cancer
Research (Washington DC) 7月

Principal component analysis on hepatocellular
carcinoma; identification of differently
regulated genes in the progression of liver
cancer. Yutaka Midorikawa, Shuichi Tsutsumi,
Kunihiro Nishimura, Ge Xijin, Hirohiko
Sakamoto, Masatoshi Makuuchi and Hiroyuki
Aburatani.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「癌高発現遺伝子」特願 2003- 290704、
2003.8.8

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1 EIM の原理

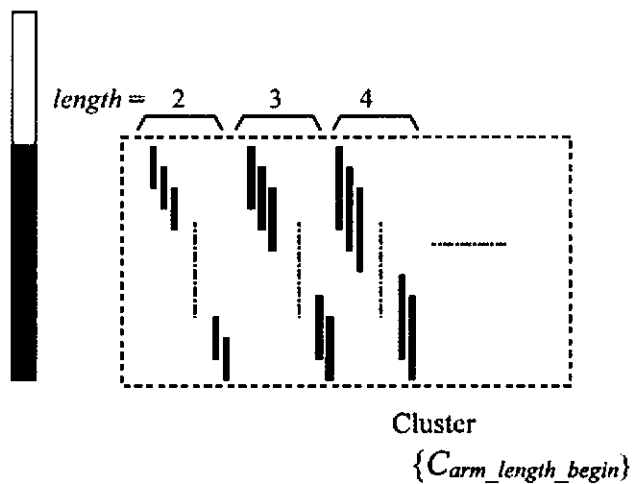
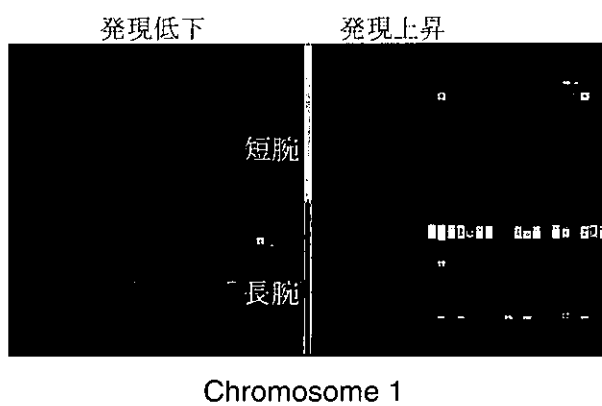


図2 肝細胞癌のEIMによる解析

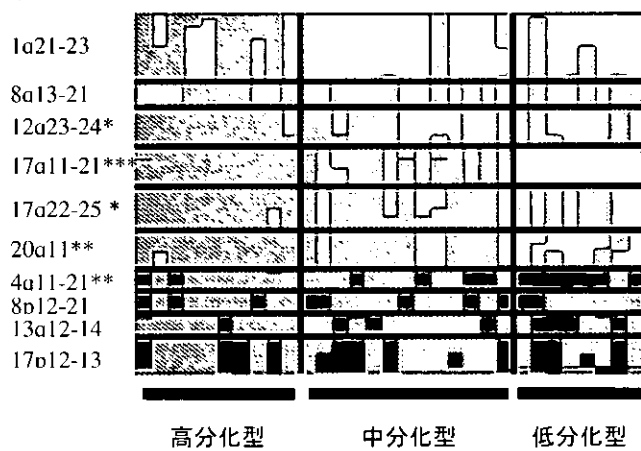
a. 1番染色体 EIR の部位で発現上昇が赤、発現低下が青く表示されている。



b. 1q21-23 の拡大表示



図3 EIR 領域による分化型の分類



厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

早期肝細胞癌の血清マーカーとしての
可溶性アミノ末端グリピカン3（sGPC3）の同定に関する研究

分担研究者 油谷浩幸 東京大学国際・産学共同研究センター 教授

研究要旨

発現プロファイル解析により肝細胞癌組織において高発現する遺伝子群を同定し、診断あるいは治療の新規標的分子候補として分泌蛋白質あるいは膜蛋白質を探索した。選出された GPC3 分子はヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、構造解析を行ったところ、主に可溶性アミノ末端グリピカン3（sGPC3）として血清中に存在することが明らかとなった。多数のモノクロナル抗体を作成し ELISA 測定系を樹立し、肝疾患患者において測定を行ったところ、有意に高値を示した。

A.研究目的

発現プロファイル解析により肝細胞癌組織において高発現する遺伝子群を同定し、診断あるいは治療の新規標的分子候補として分泌蛋白質あるいは膜蛋白質を探索した結果、選出された GPC3 分子について構造解析を行った。

B.研究方法

組み換え GPC3 蛋白の精製 図 1B に示すように GPC3 の C 端の GPI アンカードメインを欠いた GPC3_GPI（1 から 563 番目のアミノ酸）およびさらにヘパラン硫酸を欠いた GPC3_GPI_HS（⁴⁹⁵Ser と ⁵⁰⁹Ser を Ala に改変）に FLAG タグを C 端に付加した発現コンストラクトを作成した。CHO 細胞で安定発現株を取得し、その培養上清から GPC3_GPI-FLAG および GPC3_GPI_HS-FLAG をアフィニティー精製により回収した。

モノクロナル抗体作成 GPC3_GPI を抗原としてマウスを免疫し、定法に従いハイブリドーマを得た。GPC3_GPI_HS-FLAG に対する ELISA でスクリーニングを行い、クローニングを行った。A1836A, M18D04 および M19B11 を本研究に用いた。エピトープマップ用に GPC3（アミノ酸 25 から 358）と GST の融合

蛋白を大腸菌の系で発現させて特異性を確認した（図 1B）。

イムノブロットィング・免疫沈降 検体として細胞融解液または培養上清を用いて、anti-GPC3抗体を5000倍希釈で用い、ECLで発光させ検出した。プロテインGセファロースに50μgのanti-GPC3抗体M18D04またはM19B11を固定し、50μlの患者血清またはHuH7培養上清250μLに対して免疫沈降を行った。

サンドイッチ ELISA anti-GPC3 抗体 A1836A を 96 穴プレートに固相化し、ビオチン化した anti-GPC3 抗体 M18D04 と M19B11 に HRP- で発色させ、450nm の吸光度を測定した。スタンダードには精製した GPC3_GPI を用いた。

アミノ酸配列決定 精製した GPC3_GPI と GPC3_GPI_HS を SDS-PAGE で分離後 PVDF 膜に転写、CBB R-染色を行い、40kDa と 30kDa に相当するバンドの切り出しを行った。まず、40kDa のバンドの N 末端の配列決定を試みたが、何らかの修飾を受けていたため、トリプトファンの C 末端側で切断を行い、断片化したペプチドに対して再度アミノ酸配列の決定を行った。FASTS というアルゴリズムを用いて配列の並びかえおよび検索を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では個人情報については取り扱わない。

C. 研究結果

GPC3 の N 端断片は ³⁵⁸Arg と ³⁵⁹Ser の間の切断により生成する

GPC3 の抗原を精製する過程で、我々は全長の 66kDa に加えて 40kDa のバンドが出現することに気がついた(図 1A)。このバンドを回収し、断片化した後にアミノ酸配列を決定したところ、トリプトファン(W)に続いて VRY, EPX, YES, ITY, LPX, QSV という配列が得られた。FASTF アルゴリズムを用いて整列させたところ、(W)VPETPV (アミノ酸 51-57), (W)YCSYQC (アミノ酸 261-267) および (W)REYILS (アミノ酸 296-302) と GPC3 の部分配列と一致したため、この断片を可溶型 (soluble) という意味の sGPC3 と名付けた。さらに詳細に sGPC3 を解析するために C 端側の断片の切断点を同定しようとしたが、この断片は糖鎖が付加されスミア状になるため、まず糖鎖付加部位のセリンをアラニンに置換して GPC3_GPI_HS を作成したところ予想通り 30kDa のバンドが見えるようになった(図 1A)。アミノ酸配列を決定したところ、SAYYPEDLF であり GPC3 の 359 から 367 番目までのアミノ酸に一致した。すなわち ³⁵⁸Arg と ³⁵⁹Ser の間で切断されることが証明された(図 1B)。予想分子量は 38.1kDa となり SDS-PAGE 上の 40kDa とほぼ一致した(図 1A)。

sGPC3 は肝癌患者血清中に検出される主要な GPC3 の断片である

GPC3 に対する特異的なモノクローナル抗体を作成し、エピトープとして sGPC3 を含むかどうかで N-mAbs と C-mAbs とに分類された(図 2A)。イムノブロットングではコア蛋白 (66kDa) と糖鎖修飾型 (スミア) が N-mAbs と C-mAbs の両方により検出されたが、sGPC3 (40kDa) は N-mAbs のみにより検出されたが、sGPC3 は培養上清中でのみ N-mAbs により検出された(図 2A)。これらの結果から GPC3 のコア蛋白ではなく sGPC3 が HCC 患者血清においても GPC3 の主要な断片である可

能性が想定された。免疫沈降後にイムノブロットングを行ったところ、予想通り sGPC3 のみが肝癌患者特異的に検出された(図 2C)。

sGPC3 測定系の構築

次に sGPC3 に対するサンドイッチ ELISA の系を構築した(図 3A)。特異性を確認するために、sGPC3 レベルが 4.0 から 55.0ng/ml の肝癌患者血清 10 例と 0.1mg/ml 以下の正常人 3 例について免疫沈降を行ったところ、肝癌患者特異的に、定量性も持った形で sGPC3 のバンドが検出された(図 3B)。この測定系を用いて分担研究者の幕内らにより肝癌・肝硬変患者の血清を多数測定し、その早期診断における有用性を示した(分担研究者幕内らの項参照)。

D. 考察

GPC3 はヘパラン硫酸プロテオグリカンであるグリピカンのファミリーに属し、構造上の共通の特徴として分子量約 60kDa のコア蛋白、GPI アンカーを介する膜への結合、C 端側に存在する Ser-Gly に対する糖鎖の付加、保存された 14 個の Cys 残基などがあげられる。GPC3 はもともと胎生期の腸管に時期特異的に発現する遺伝子として同定され、その変異が Simpson-Golabi-Behmel 症候群という臓器肥大を呈する先天性疾患をきたすことから、アポトーシス作用を有することが知られ、実際多くの癌では発現が抑制されている。我々を含む複数のグループから肝癌における GPC3 の転写レベルの亢進が報告されているが、その意味はあまり明らかでない。我々は蛋白レベルでも肝癌における GPC3 の発現亢進を昨年世界に先駆けて報告したが、その際用いた抗体は C 末を認識するものだったため、sGPC3 の発見にはいたらなかった。今回、測定系を構築するために複数の抗体が必要となりあらためて免疫原を作成する過程で、sGPC3 の存在を見出し、その切断点も同定した。さらに、診断の標的として sGPC3 のみが主要な血清中 GPC3 であり、全長の GPC3 は過去の報告にもあるように膜に結合してい

るか、GPI アンカーがはずれていても膜に存在している可能性が高いと考えられる。我々はさらに測定系を構築し、実際に早期の肝癌で有用であることを明らかにした。AFP との相補性も含め、早期肝癌の検出率向上に役立つと考えられるが、切断された膜上の GPC3 も治療の標的として有望と考えられ、GPC3 は肝癌の診断および治療におけるテーラーメイド医療の中心的な分子になる可能性もあると思われる。今後のさらなる研究が望まれる。

E. 結論

GPC3 分子はヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、構造解析を行ったところ、主に可溶性アミノ末端グリピカン 3 (sGPC3) として血清中に存在することが明らかとなった。多数のモノクロナル抗体を作成し ELISA 測定系を樹立し、肝疾患患者において測定を行ったところ、有意に高値を示した。

F. 健康危険情報

肝硬変患者の中で発癌リスクの高い群、術後の再発についての経過観察に有用な測定系が樹立された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, Midorikawa Y, Yamamoto S, Ihara S, Tokita S, Iwanari H, Ito Y, Nakano K, Nezu J, Tsunoda H, Yoshino T, Ohizumi I, Tsuchiya M, Ohnishi S, Makuuchi M, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H. Identification of Soluble Amino Terminal Fragment of Glypican-3 as a Serological Marker for Early Stage Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* in press
- 2) Ge X, Tsustumi S, Aburatani H, Iwata S. Reducing false positives in molecular pattern recognition. *Genome Informatics* 14:34-43, 2003
- 3) Sekoguchi E, Sato N, Yasui A, Fukada S, Nimura Y, Aburatani H, Ikeda K, Matsuura A. A novel mitochondrial carnitine-

acylcarnitine translocase induced by partial hepatectomy and fasting. *J Biol Chem.* 278: 38796 - 38802, 2003

- 4) Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, Imamura T, Sakamoto H, Miyazono K, Kodama T, Makuuchi M, Aburatani H. Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *Int J Cancer.* 103(4): 455-65. 2003

2. 学会発表

第 103 回日本外科学会 (札幌市)

原発性肝細胞癌において高発現するグリピカン 3 による FGF2 および BMP-7 のシグナル伝達抑制 緑川 泰、油谷浩幸、坂本裕彦、幕内雅敏

第 26 回日本分子生物学会総会 12 月 10 日~13 日

2 つの ORF をもつ PEG10 のタンパク質発現解析 上村直子、渡辺亮、緑川泰、岩成宏子、油谷浩幸

第 62 回癌学会 (名古屋)

可溶性 GPC3(sGPC3)は肝細胞癌の血清マーカーとして有用である

筆宝義隆、渡辺亮、渡辺清高、緑川泰、時田進、岩成宏子、伊藤行夫、大泉巖雄、土屋政幸、幕内雅敏、大西真、児玉龍彦、油谷浩幸

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

「GPC3 高感度測定法」特願 2004-036467

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

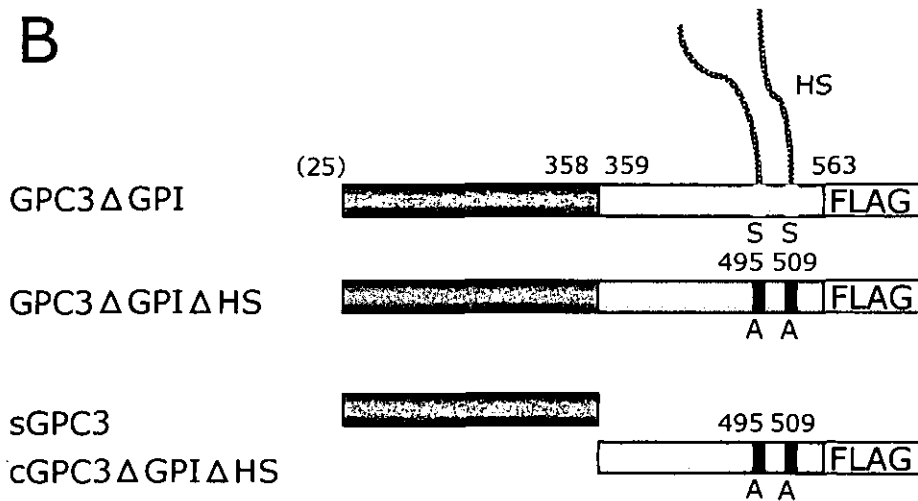
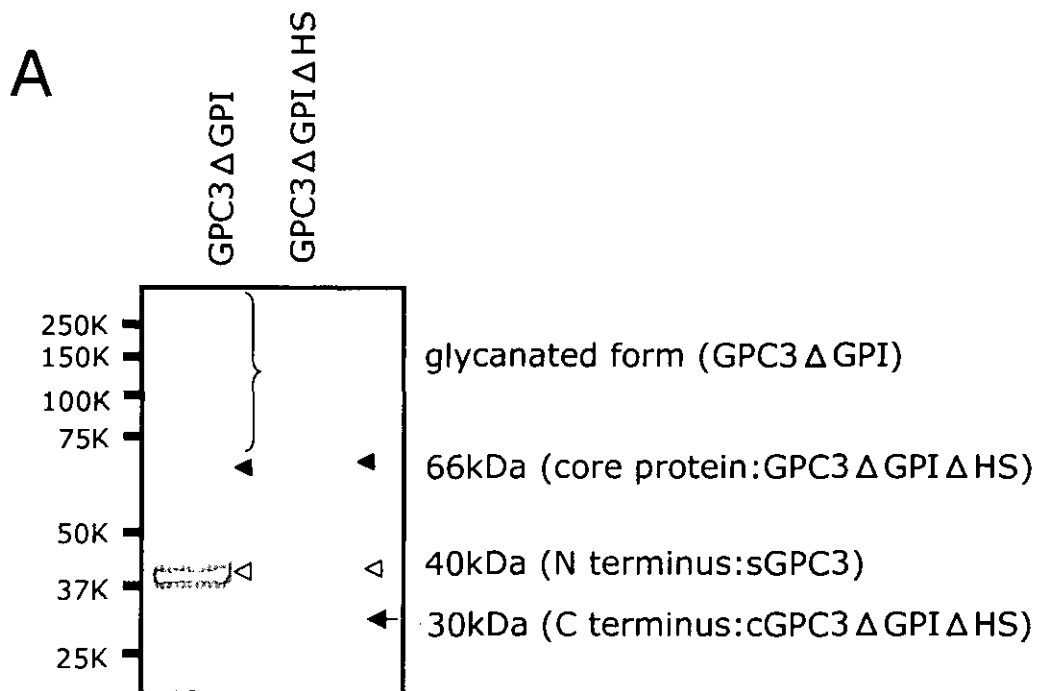


図1 種々の組み換えGPC3 蛋白

(A)精製したGPC3蛋白のSDS-PAGE後のCBB染色。中括弧：GPC3 Δ GPIすなわち糖鎖修飾を受けたスメア状のバンド、黒矢頭：GPC3 Δ GPI Δ HSすなわち糖鎖修飾を受けないコア蛋白(66kDa)、白矢頭：sGPC3すなわちN端断片(40kDa)、矢印：cGPC3 Δ GPI Δ HSすなわちC端断片(30kDa)。

(B)種々の組み換えGPC3 蛋白の模式図。数字はアミノ酸の番号を表し、25はシグナル配列の予想切断部位を表す。HSはheparan sulfate glycosaminoglycan (ヘパラン硫酸糖鎖を表す)。