

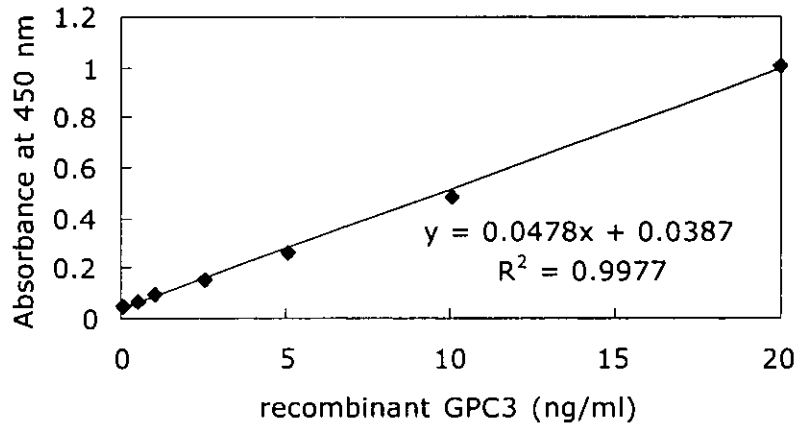
図2 モノクロナル抗体を用いた内因性GPC3蛋白の解析

(A) N端抗体とC端抗体による、内因性GPC3に対する代表的なイムノブロッティング。肝癌細胞株HepG2とHuH6の培養上清と細胞融解液を用いた。培養上清から検出されるのはsGPC3のみである。中括弧：糖鎖修飾を受けたGPC3のスミア状のバンド；黒矢頭：GPC3コア蛋白（66kDa）、白矢頭：sGPC3（40kDa）、矢印：未解析のGPC3断片（50kDa） Lys（細胞融解液）、lysate（培養上清）

(B) GST-sGPC3に対するanti-GPC3モノクローナル抗体A1836A、M18D04およびM19B11を用いたイムノブロッティング。これらの抗体はGSTには反応せず、GST-sGPC3のみに対して反応している。

(C) 肝癌患者および健常者の血清の免疫沈降後のイムノブロッティング。GPC3としてはsGPC3のみが肝癌患者血清中に検出される。肝癌患者2例（HCC）および健常者3例（NL）をM18D04で免疫沈降し、A1836Aでプロットした。HuH7細胞を陽性コントロールとして用いた。黒矢頭：GPC3コア蛋白（66kDa）、白矢頭：sGPC3（40kDa）。

A



B

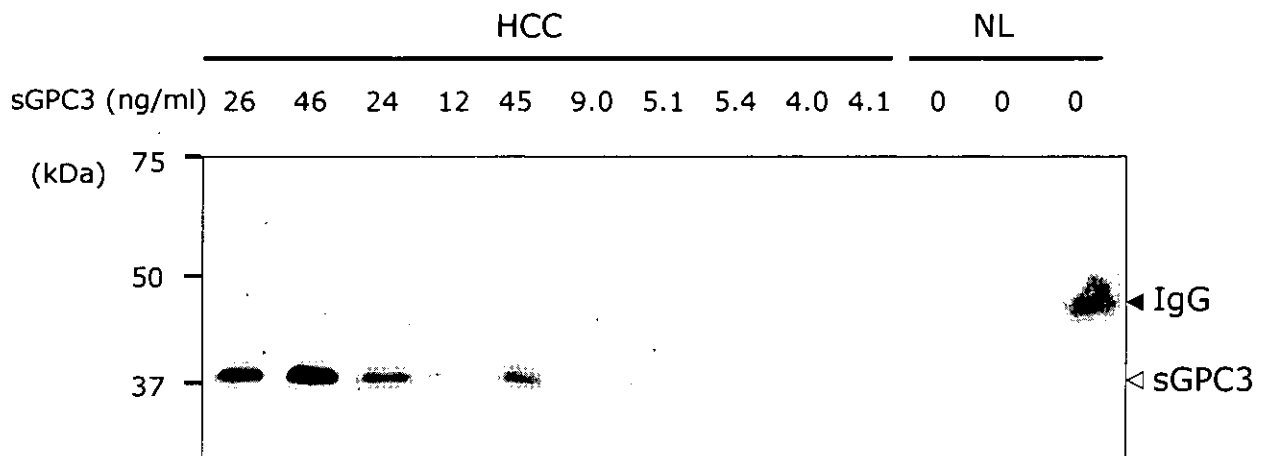


図3 sGPC3の血清測定系の樹立

(A) サンドイッチELISAの標準直線

(B) サンドイッチELISAの高い特異性の確認。サンドイッチELISAでsGPC3が高値だった検体について同じ抗体の組み合わせで免疫沈降後のイムノブロットティングを行い、sGPC3のみがELISAの値にほぼ相関して検出された。

白矢頭：sGPC3 (40kDa)。黒矢頭：IgG。

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

肝がん関連遺伝子の分子病理学的解析

分担研究者 深山正久（東京大学大学院医学系研究科教授）

研究要旨

肝がんの遺伝子発現プロファイリングに基づき、肝細胞癌において glypican3 (GPC3) の高発現が見いだされ、免疫組織化学的に蛋白レベルにおいて、肝細胞癌および肝前癌病変、並びに他の肝腫瘍に関して GPC3 の発現を検討した。その結果、GPC3 は肝細胞癌症例に高率に強陽性であり、肝前癌病変の一部の症例にも部分的に弱陽性像を認めたが、胆管細胞癌には全例陰性であった。これらのことから、GPC3 は肝細胞癌の組織診断マーカーとして応用可能と考えられる。

A. 研究目的

肝細胞癌はアジアや西洋諸国において罹患率が急速に上昇しており、本邦においては悪性新生物による死亡率（男性）の第3位となっている。HBV 感染者は減少しているものの HBV 及び HCV 慢性感染からの肝細胞癌の発生を推定すると今後 10 年間でさらに増加すると予想され、肝細胞癌の発症あるいは悪性化に関連する遺伝子あるいは分子の同定およびメカニズムの解明は重要な研究課題である。本研究は、遺伝子発現プロファイルで得られた肝がん関連遺伝子について、臨床検体を用いて蛋白レベルで局在を同定することで、肝細胞の癌化機構について包括的な解明、臨床試料に基づいたゲノム学 (clinical genomics) を実現することを目的とする。具体的には、肝疾患臨床検体における GPC3 の蛋白レベルでの局在、発現パターンを解明する。

B. 研究方法

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。

GPC3 に関して、研究代表者の油谷らが作成したモノクローナル抗体を用いて、東京大学医学部附属病院で採取されたホルマリン固定パラフィン包埋切片の免疫組織化学染色を以下の方法で行なった。

- 1) 4 μ m に薄切したホルマリン固定パラフィン包埋切片をキシレン及びアルコールで親水化した後、PBS で洗浄した。
- 2) pH6 の 0.01M クエン酸緩衝溶液に浸漬し、120°C 10 分間オートクレーブで処理し、抗原賦活化を行なった。
- 3) PBS で洗浄し、モノクローナル抗体を室温で 2 時間反応させた。
- 4) PBS で洗浄し、二次抗体として LSABkit (Dako) を用いた。
- 5) DAB を用いて発色し、対比染色にはヘマトキシリンを用いた。

（倫理面への配慮）

東京大学医学部附属病院で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

GPC3 は臨床検体において肝細胞癌症例

(図 1)の 84%に強陽性であったが、胆管細胞癌(図 2)、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(図 3)を認めた。

D. 考察

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。

E. 結論

GPC3 は、モノクロー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

なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Kashima T, Nakamura K, Kawaguchi J, Takanashi M, Ishida T, Aburatani H, Kudo A, Fukayama M, Grigoriadis AE. Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. *Int J Cancer*. 104:147-54, 2003
- 2) Chong JM, Sakuma K, Sudo M, Ushiku T, Uozaki H, Shibahara J, Nagai H, Funata N, Taniguchi H, Aburatani H, Fukayama M.

Global and non-random CpG-island methylation in gastric carcinoma associated with Epstein-Barr virus. *Cancer Sci*. 94:76-80, 2003

- 3) Hoshimoto K, Yamauchi N, Takazawa Y, Onda T, Taketani Y, Fukayama M. CD44 variant 6 in endometrioid carcinoma of the uterus: its expression in the adenocarcinoma component is an independent prognostic marker. *Pathol Res Pract*. 199:71-7, 2003
- 4) Zhang SC, Miyamoto S, Kamijo T, Hayashi R, Hasebe T, Ishii G, Fukayama M, Ochiai A. Intratumor microvessel density in biopsy specimens predicts local response of hypopharyngeal cancer to radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol*. 33:613-9. 2003
- 5) Liu D, Wada I, Tateno H, Ogino D, Suzuki M, Li L, Lu W, Kojiro M, Fukayama M, Okabe H, Fukumoto M. Allelotypic characteristics of thorotrast-induced intrahepatic cholangiocarcinoma: comparison to liver cancers not associated with thorotrast. *Radiat Res*. 161:235-43, 2004
- 6) Sudo M, Chong JM, Sakuma K, Ushiku T, Uozaki H, Nagai H, Funata N, Matsumoto Y, Fukayama M. Promoter hypermethylation of E-cadherin and its abnormal expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer*. 109:194-9, 2004

2. 学会発表

- 1) 菊池好晃(東京大学 呼吸器内科), 荒井俊也, 河崎伸, 滝沢始, 山本一彦, 石井彰, 竹腰知紀, 高橋芳久, 深山正久: 著明な閉塞性呼吸障害をきたしたサルコイドーシスの 1 例. 日本内科学会関東地方会 509 回演題要旨 Page24, 2003
- 2) 深山正久: 遺伝子診断・DNA チップと形態診断の共存. 第 92 回日本病理学会, 福岡, 2003 年 4 月 23-25 日(日本病理学会会誌 92(1): 138, 2003)
- 3) 土橋洋, 鈴木潮人, 後藤明輝, 深山正久, 大井章史: 肺癌における Cyclin/Cdk 過剰発現とアポトーシスとの関連. 第 92

- 回日本病理学会，福岡，2003年4月23-25日（日本病理学会会誌 92(1)：215, 2003)
- 4) 元井亨，西村訓弘，久光亜弥子，元井紀子，五嶋孝博，園部宏，久力権，清水英男，林一彦，黒田雅彦，丹下剛，向井清，深山正久，石田剛：cDNA アレイを用いた肉腫キメラ遺伝子検出法の構築とEWS 関連腫瘍群への応用。第92回日本病理学会，福岡，2003年4月23-25日（日本病理学会会誌 92(1)：223, 2003)
- 5) 柴原純二，村山繁雄，船田信頭，深山正久：神経細胞腫として特徴を有する脳室外腫瘍 6例の臨床病理学的検討。第92回日本病理学会，福岡，2003年4月23-25日（日本病理学会会誌 92(1)：262, 2003)
- 6) 齋藤深雪，森下保幸，深山正久：二重染色法における加熱処理についての検討。第92回日本病理学会，福岡，2003年4月23-25日（日本病理学会会誌 92(1)：287, 2003)
- 7) 牛久哲男，鄭子文，須藤誠，佐久間和也，宇於崎宏，柴原純二，深山正久：Epstein-Barr virus 関連胃癌におけるDNA メチル化についての検討。第92回日本病理学会，福岡，2003年4月23-25日（日本病理学会会誌 92(1)：382, 2003)
- 8) 笹沼英紀，栗原克己，富樫一智，穂積康夫，岡田真樹，安田是和，永井秀雄，弘中貢，深山正久：甲状腺癌合併家族性大腸腺腫症(FAP)における β -catenin 染色の意義。日本外科学会雑誌 104 (臨増)：381, 2003
- 9) 土橋洋，北川雅敏，後藤明輝，深山正久，鈴木潮人，大井章史：培養細胞とヒト腫瘍における Cyclin/Cdk 過剰発現とアポトーシスとの関連。(Cancer Science 94(Suppl)242, 2003)
- 10) 須藤誠(東京大学 人体病理 教室)，鄭子文，BaruaRita，宇於崎宏，松本由朗，深山正久：Epstein-Barr ウイルス関連胃癌における E-cadherin のプロモーターメチル化と発現異。(Cancer Science 94(Suppl.):288, 2003)
- 11) BaruaRita(東京大学 人体病理 教室)，鄭子文，須藤誠，宇於崎宏，深山正久：Epstein-Barr ウイルス関連胃癌でのMUC 遺伝子産物の発現。(Cancer Science, 94(Suppl.):288, 2003)
- 12) 佐野圭二，菅原寧彦，金子順一，國土典宏，松岡勇二郎，元井亨，深山正久，幕内雅敏：自己免疫性肝炎に対する生体肝移植後胆管炎を繰り返した1例。(今日の移植 16:671-672, 2003)

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

表 1. 肝組織検体における Glypican-3 の発現

	弱陽性数	強陽性数	検体数
肝細胞腺腫	0	0	7
異形成結節 (低異型度)	2	0	8
(高異型度)	6	0	8
肝細胞癌	0	47	56
(高分化/中分化/低分化)	0/0/0	14/24/9	18/29/9
(<3.0cm / 3.0cm \leq)	0/0	27/20	29/27
胆管細胞癌	0	0	16
カルチノイド腫瘍	0	0	1
転移性肝癌	1	0	23

図1. 肝細胞癌における GPC3 の強陽性像
(図1A: HE 染色、図1B: 免疫組織化学染色)

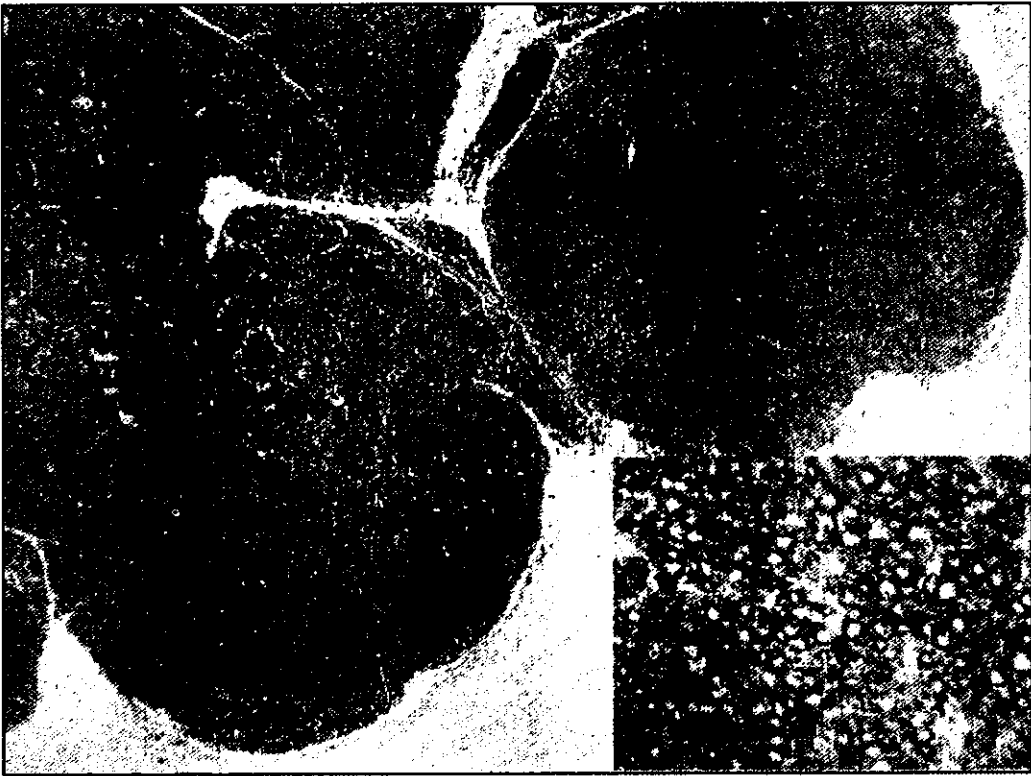
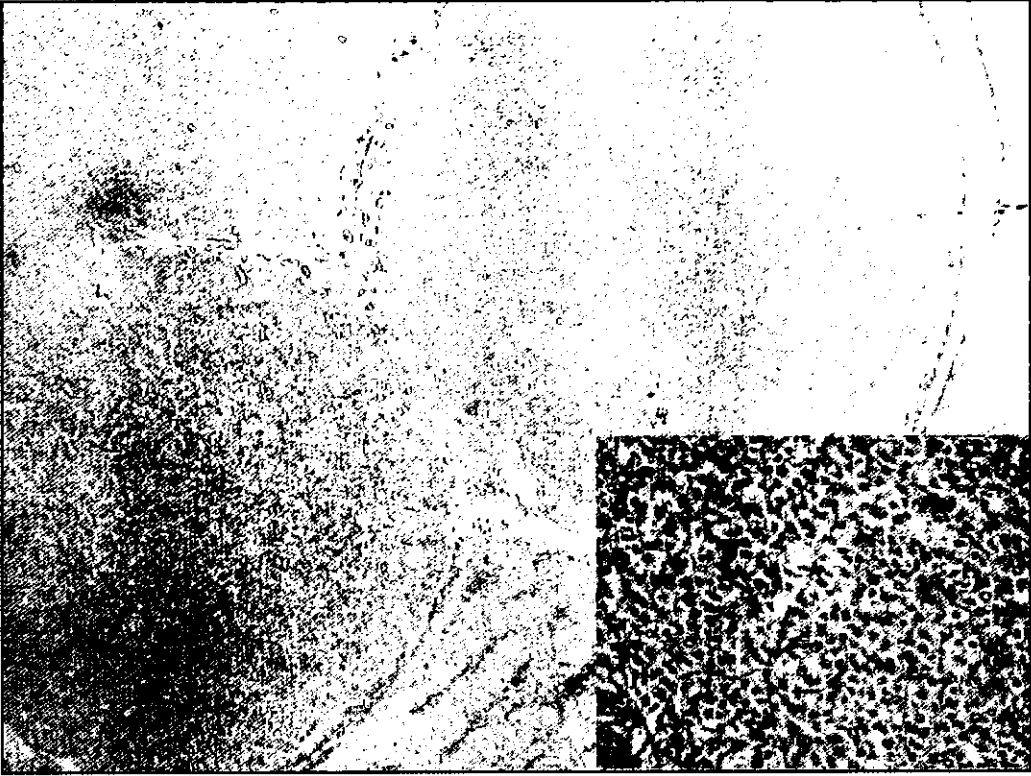


図2. 胆管細胞癌における GPC3 の陰性像(免疫組織化学染色)

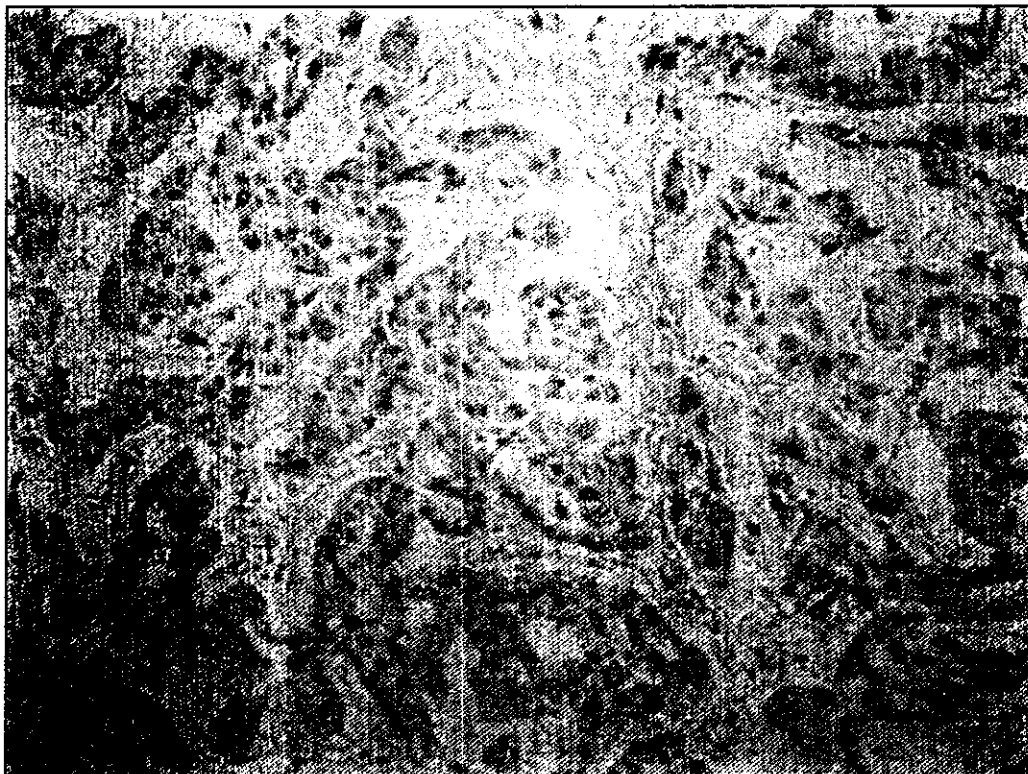
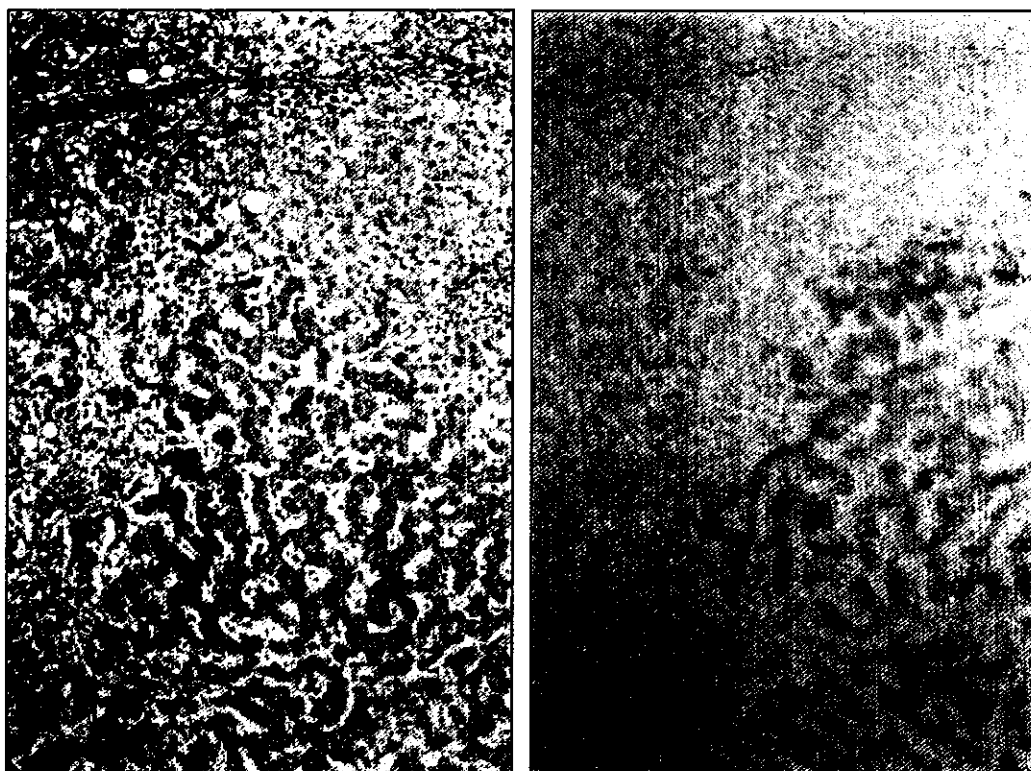


図3. 異形成結節における GPC3 の弱陽性像
(図3A: HE 染色、図3B:免疫組織化学染色)



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

臨床検体の収集・臨床疫学的解析に関する研究

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）

研究要旨

我々はこれまでに豊富な手術症例数を背景に、種々の臨床情報を付帯した肝癌検体および患者血清サンプルの収集を行ってきた。これらを用いた DNA チップの解析により、従来より使用されてきた AFP と比較して mRNA レベルでは高分化型肝癌で優れた特異性・感受性を示すことが明らかになった sGPC3 について、血清マーカーとしての有用性を基礎検討ですでに昨年度確認した。本年度は当初の測定系が特異性および感度において改善の余地があることを受けて、新たに最適な抗体の組み合わせを使用した改良版の測定系により正確な測定を行い、改めて肝癌の血清マーカーとしての有用性を確認した。

A.研究目的

肝癌は慢性ウイルス性肝炎後の肝硬変をベースに発症するため、これらのハイリスク患者に対して AFP などの腫瘍マーカーおよび腹部超音波による定期的スクリーニングをおこなうことで効率よく早期発見を行うことが可能である。しかし、最近超音波の普及とともに AFP 陰性の肝癌が増加しており、新規の腫瘍マーカーの開発が求められている。本研究はマイクロアレイ解析より選抜された新規腫瘍マーカー sGPC3 の血清レベルでの測定を行い、その有用性を検討することを目的とした。

B.研究方法

肝炎、肝硬変、肝癌、その他の癌患者の組織・血清収集

すでに 25 例の肝癌、16 例の非癌部肝硬変、8 例の正常肝組織（大腸がん肝転移手術時の非癌部）について病理診断、生化学データ、ウイルスの有無などの情報とともに収集し、マイクロアレイ解析が終了している。新たに血清を入院患者、通院患者より肝癌以外の癌の患者からも幅広く多数収集（200 検

体/月）した。特に、同一患者でも時系列の検体を豊富に揃え、症例ごとの後ろ向きまたは前向きの解析が可能ないように備えた。

ELISA を用いた患者血清測定

膜蛋白である GPC3 はそのアミノ末端が切断されて血中に放出されることが知られている。この断片 sGPC3 を認識するサンドイッチ ELISA の系が油谷らによって構築され、さらにシグナル・ノイズ比を向上させた改良型の測定系が開発されたことを受けて、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。

（倫理面への配慮）

本年度の研究には DNA 多型解析研究は含まれず、倫理上の問題はない。

C.研究結果

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(図1)、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(図1)。

sGPC3とAFPとの比較

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の方が有用なマーカーであった(図2A)。例えば、cut-off値を 2ng/ml (sGPC3)、 20ng/ml (AFP)とした場合、sGPC3が感度が51%で特異性90%、AFPが感度が55%で特異性90%だった。ただし、両者には相関がなかったため($r=0.13$)、組み合わせて測定した場合、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

最初の解析には肝癌の進行例、多発例も多く含まれていたが、もともと sGPC3 は早期発見用に開発されたマーカーなので、手術後の病理診断で高分化・中分化型と診断された32例のみについて次に解析した。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(図2B)。

D.考察

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極め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。また、他にも同様に新規血清マーカー候補がマイクロアレイ解析から同定されてきており、現在測定系の構築中だが、将来的には同様の血清測定が必要になる。すでに十分な血清を確保しており、同様の解析を強力に支援することができる。こうした肝癌血清マーカーを複数同時測定する「肝癌早期診断用抗体アレイキット」の実用化により肝癌の日常診療は大きく変わることが予想される。

E.結論

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の有用性を再確認した。今後、大規模な臨床試験の実施が望まれる。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

原著

1. Ohkubo T, Sugawara Y, Imamura H, Kaneko J, Matsui Y, Makuuchi M. Early recurrence of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology*. 51(55):237-8. 2004
2. Makuuchi M, Sano K. The surgical approach to HCC: our progress and results in Japan. *Liver Transpl*. 10(2 Suppl 1):S46-52. 2004
3. Ikai I, Itai Y, Okita K, Omata M, Kojiro M, Kobayashi K, Nakanuma Y, Futagawa S, Makuuchi M, Yamaoka Y. Report of the 15th follow-up survey of primary liver cancer. *Hepatol Res*. 28(1):21-29. 2004
4. Sano K, Takayama T, Murakami K, Saiki I, Makuuchi M. Overexpression of retinoic acid receptor alpha in hepatocellular carcinoma.

Clin Cancer Res. 9(10 Pt 1):3679-83. 2003

なし

5. Makuuchi M, Belghiti J, Belli G, Fan ST, Lau JW, Ringe B, Strasberg SM, Vauthey JN, Yamaoka Y, Yamasaki S; Working Group of the International Scientific Committee of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association. IHPBA concordant classification of primary liver cancer: working group report. **J Hepatobiliary Pancreat Surg.** 10(1):26-30. 2003
6. Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi T, Ouchi Y, Makuuchi M. EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with tumour dedifferentiation and proliferation. **Eur J Cancer.** 39(11):1552-61, 2003
7. Takikawa H, Mafune K, Hamada H, Nettelbeck DM, Muller R, Makuuchi M, Kaminishi M. An advanced strategy of enhanced specific gene expression for hepatocellular carcinoma. **Int J Oncol.** 22(5):1051-6. 2003
8. Tang W, Miki K, Kokudo N, Sugawara Y, Imamura H, Minagawa M, Yuan LW, Ohnishi S, Makuuchi M. Des-gamma-carboxy prothrombin in cancer and non-cancer liver tissue of patients with hepatocellular carcinoma. **Int J Oncol.** 22(5):969-75. 2003
9. 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

総説

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

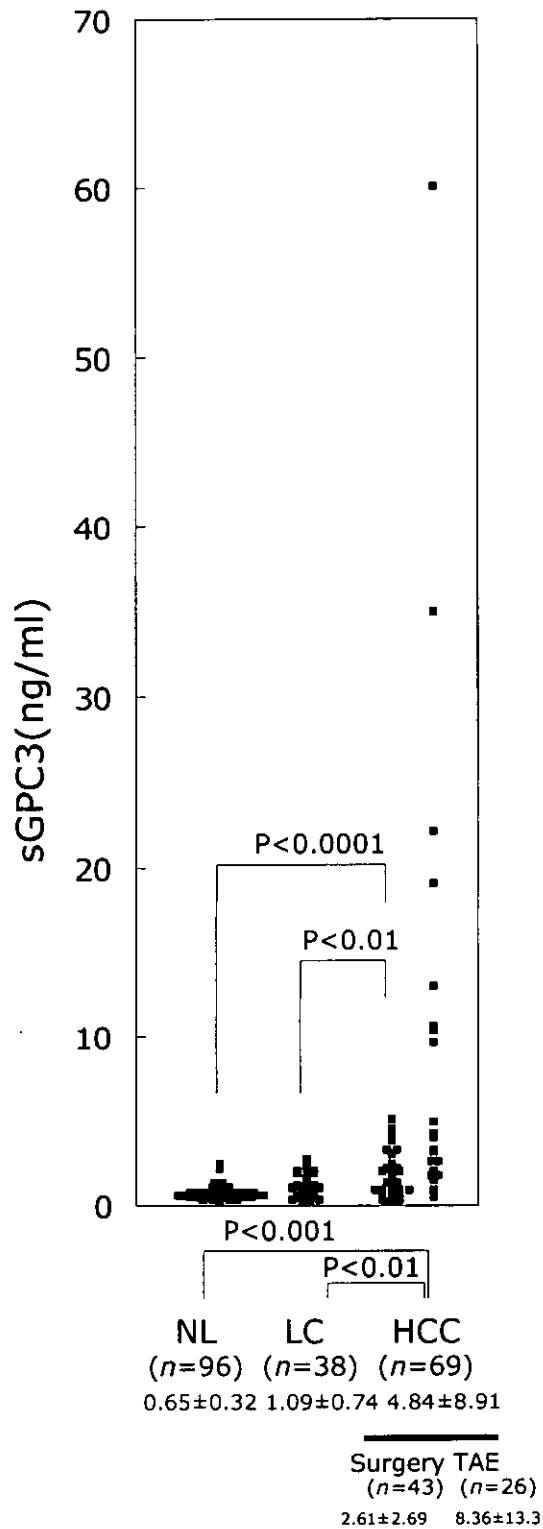
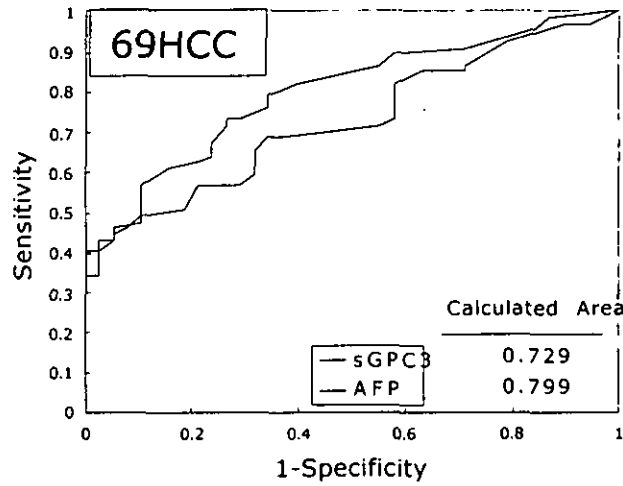


図1 サンドイッチELISAによるsGPC3血清測定
 肝癌(HCC)は肝硬変(LC)と正常肝(NL)に比べて有意に高値を示し、肝癌の中でも早期が多い手術例(Surgery)よりも進行例が多い塞栓術例(TAE)で高値を示した。

A



B

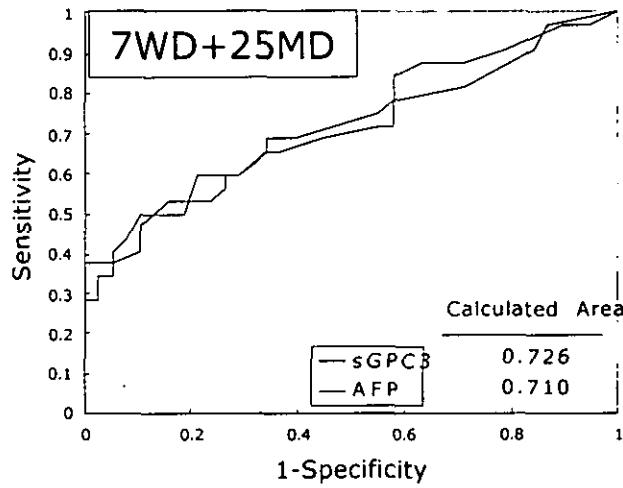


図2 ROC曲線

Cut-off値を変動させた時に特異性と感度がどのように変化するかを表す曲線。囲む面積が大きいほど腫瘍マーカーとして優れている。対象には肝硬変患者38例を用いた。

(A) 肝癌患者全69例を用いたAFPとsGPC3の比較

(B) 高・中分化型肝癌患者32例を用いたAFPとsGPC3の比較

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

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

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

研究要旨 肝炎症例の遺伝子発現プロファイル解析を行なうため、絶えず更新される文献情報を活用するための情報処理基盤の構築を進めた。肝炎の遺伝子発現プロファイルデータに適用し開発した技術の検証を行なった。また、文献情報をもとに構築した蛋白質の相互作用ネットワークから疾病に関係のある特定のネットワークを抽出するためのインターフェースのプロトタイピングを行なった。

A. 研究目的

遺伝子発現プロファイル情報では、絶えず更新されるゲノムおよび遺伝子の配列情報、さらには文献情報などの知識を統合化することによってはじめて意味付けが可能になる。LOH、染色体異常、エピジェネティクス、などの情報を統合化して、肝炎症例の遺伝子発現プロファイル解析を行なうためには、これらの様々な知識を活用し、膨大に情報が蓄積されている文献情報から必要な情報を抽出し、抽出した情報を分かりやすいネットワークの形で表示する文献情報処理が不可欠である。文献情報処理システムのプロトタイプは作成したので、ここでは特に肝炎に関係のある遺伝子に対して検索結果の正当性を検証した。本研究目的は、正当性の検証や、遺伝子探索上で必要になる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のできるシステムを開発する。プロトタイプを作成し正当性を検証する。

B. 研究方法

ヒト正常臓器あるいは細胞について、GeneChip (Affymetrix 社製) U133 アレイを用いた4万個の遺伝子あるいはESTについてのトランスクリプトーム解析実験データに対し、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、検証を行なう。

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)

厚生労働省の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」、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）に従い指針に適合する倫理委員会の承認を得、各臨床機関において患者からの血液あるいは組織試料等の匿名化をはかった試料に対して得られた遺伝子発現解析実験データに対して情報処理解析を行なう。

C. 研究結果

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。公共の文献データベースの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 をまず利用できるようなシステムを構築した。まず、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 クラスター 11 台 (LINUX) で行なった。概要を図 1 に示す。

さらに、信頼できる結果がだせ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二十万件にまで拡大した。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図 2 と図 3 のように表示することができるようになった。

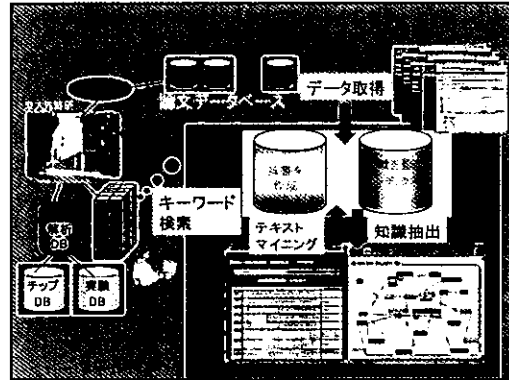


図 1 文献情報検索を多用した遺伝子および蛋白質の相互作用探索システムの概要

	蛋白質 1	動詞	蛋白質 2
1	SH2	phosphorylate	InsR-1
2	SH2	bind	InsR-1
3	SH2	bind	InsR-1
4	SH2	bind	InsR-1
5	SH2	bind	InsR-1
6	SH2	bind	InsR-1
7	SH2	bind	InsR-1
8	SH2	bind	InsR-1
9	SH2	bind	InsR-1
10	SH2	bind	InsR-1
11	SH2	bind	InsR-1
12	SH2	bind	InsR-1
13	SH2	bind	InsR-1
14	SH2	bind	InsR-1
15	SH2	bind	InsR-1
16	SH2	bind	InsR-1
17	SH2	bind	InsR-1
18	SH2	bind	InsR-1
19	SH2	bind	InsR-1
20	SH2	bind	InsR-1
21	SH2	bind	InsR-1
22	SH2	bind	InsR-1
23	SH2	bind	InsR-1
24	SH2	bind	InsR-1
25	SH2	bind	InsR-1
26	SH2	bind	InsR-1
27	SH2	bind	InsR-1
28	SH2	bind	InsR-1
29	SH2	bind	InsR-1
30	SH2	bind	InsR-1
31	SH2	bind	InsR-1
32	SH2	bind	InsR-1
33	SH2	bind	InsR-1
34	SH2	bind	InsR-1
35	SH2	bind	InsR-1
36	SH2	bind	InsR-1
37	SH2	bind	InsR-1
38	SH2	bind	InsR-1
39	SH2	bind	InsR-1
40	SH2	bind	InsR-1
41	SH2	bind	InsR-1
42	SH2	bind	InsR-1
43	SH2	bind	InsR-1
44	SH2	bind	InsR-1
45	SH2	bind	InsR-1
46	SH2	bind	InsR-1
47	SH2	bind	InsR-1
48	SH2	bind	InsR-1
49	SH2	bind	InsR-1
50	SH2	bind	InsR-1
51	SH2	bind	InsR-1
52	SH2	bind	InsR-1
53	SH2	bind	InsR-1
54	SH2	bind	InsR-1
55	SH2	bind	InsR-1
56	SH2	bind	InsR-1
57	SH2	bind	InsR-1
58	SH2	bind	InsR-1
59	SH2	bind	InsR-1
60	SH2	bind	InsR-1
61	SH2	bind	InsR-1
62	SH2	bind	InsR-1
63	SH2	bind	InsR-1
64	SH2	bind	InsR-1
65	SH2	bind	InsR-1
66	SH2	bind	InsR-1
67	SH2	bind	InsR-1
68	SH2	bind	InsR-1
69	SH2	bind	InsR-1
70	SH2	bind	InsR-1
71	SH2	bind	InsR-1
72	SH2	bind	InsR-1
73	SH2	bind	InsR-1
74	SH2	bind	InsR-1
75	SH2	bind	InsR-1
76	SH2	bind	InsR-1
77	SH2	bind	InsR-1
78	SH2	bind	InsR-1
79	SH2	bind	InsR-1
80	SH2	bind	InsR-1
81	SH2	bind	InsR-1
82	SH2	bind	InsR-1
83	SH2	bind	InsR-1
84	SH2	bind	InsR-1
85	SH2	bind	InsR-1
86	SH2	bind	InsR-1
87	SH2	bind	InsR-1
88	SH2	bind	InsR-1
89	SH2	bind	InsR-1
90	SH2	bind	InsR-1
91	SH2	bind	InsR-1
92	SH2	bind	InsR-1
93	SH2	bind	InsR-1
94	SH2	bind	InsR-1
95	SH2	bind	InsR-1
96	SH2	bind	InsR-1
97	SH2	bind	InsR-1
98	SH2	bind	InsR-1
99	SH2	bind	InsR-1
100	SH2	bind	InsR-1

図 2 文献情報検索を多用した遺伝子および蛋白質の相互作用探索システムの出力結果、2 対相互作用

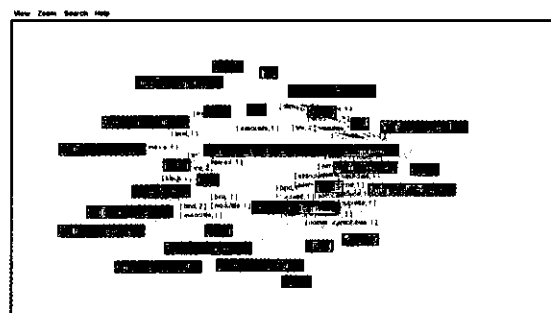


図 3 文献情報検索を多用した遺伝子および蛋白質の相互作用探索システムの多数の相互作用パズェイ表示

本研究課題に関係するシグナル伝達系での例を示す。インターフェロンは抗ウイルス作用があるため、肝炎の治療薬として用いられる。IFN は、IFN 受容体と結合し、そのシグナルを細胞内に伝える。IFN には α 、 β 、 γ が存在する。そこで、IFN 受容体を開発したシステムから調べてみた。IFN 受容体は、JAK を活性化して、STAT をリン酸化し、これが、ダイマーを形成することで核へと移行し、必要な遺伝子を転写する。そのうちの一つに、IRF (interferon regulatory factor)がある。これらの因子は、すべて、開発したシステムから検索が可能であった。

また、IRF には転写活性化因子 IRF1 と転写抑制因子 IRF2 が存在し、2つが、拮抗的に働いて、インターフェロン応答遺伝子 (例えば、NO synthase, GBP) の発現を調節し、細胞増殖やアポトーシスを制御している。開発したシステムで IRF1 について検索したとき、NO synthase や GBP などが得られた。

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 NF κ B-TNF-I κ B 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結果を図4に示す。

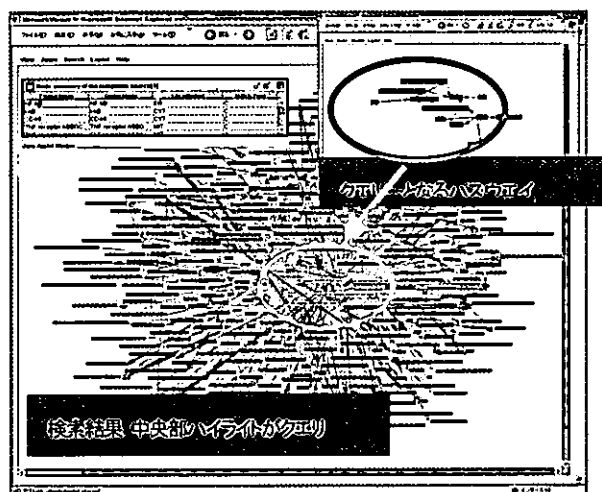


図4 多数の蛋白質からなる大規模なパスウェイからの特定パスウェイの同定

D. 考察

本システムでは、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鑄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用い、さらに文章の鑄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、まずツールを実験の解析に役立てることが必須である。

E. 結論

本年度は GeneChip (Affymetrix 社製) U133 アレイのデータを解析対象とした遺伝子発現データベースと文献情報システムは別々に作成したが、こられを統合化するための技術を開発、融合化することによって知識ベースの進んだシステム構築が可能となる。これによって肝炎に適用するための知識統合型の情報基盤ツールとしての準備を進め、今後、実適用を進める。

F. 健康危険情報

情報処理技術につき特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yuichi Matsui, Akio Saiura, Yasuhiko Sugawara, Masataka Sata, Katsutoshi Naruse, Hideo Yagita, Takahide Kohro, Chikage Mataka, Akashi, Izumi, Takuhiro Yamaguchi, Takashi Minami, Toshiko Sakihama, **Sigeo Ihara**, Hiroyuki Aburatani, Takao Hamakubo, Tatsuhiko Kodama, Masatoshi Makuuchi "Identification of gene expression profile in tolerizing murine cardiac allograft by co-stimulatory blockade" **Physiological Genomics**, 15:199-208 (2003).
- (2) 堤修一、井原茂男、油谷浩幸 "アレイ技術とがん研究" **血液、腫瘍科**, 48: 182-189 (2004).
- (3) D. Komura, H. Nakamura, S. Tsutsumi, H. Aburatani and **S. Ihara**, "Multidimensional Support Vector Machines for visualization of gene expression data" **ACM Symposium on Applied Computing**, Nicosia, Cyprus, in press (2004).
- (4) D. Komura, H. Nakamura, S. Tsutsumi, H. Aburatani and **S. Ihara**, "Features of Gene Extraction by

Nonlinear Support Vector Machines in Gene Expression Analysis", **International Conference on Genome Informatics**, 14, 322-323 (2004).

2. 学会発表

- 1) Sigeo Ihara, Naoko S. Nishikawa, Yoshihiro Ohta, Koji Abe, Shingo Tsuji, Shuichi Tsutsumi, Shogo Yamamoto, and Hiroyuki Aburatani, "Response Analysis in Pharmacogenomics by Literature Mining" Joint Cold Spring Harbor Laboratory/Wellcome Trust Conference, Pharmacogenomics, 1st meeting on pharmacogenomics and related applications of genomics. (Sept 24-28, Cambridge, UK)
- 2) Shuichi Tsutsumi, **Sigeo Ihara**, and Hiroyuki Aburatani "Two Distinct Gene Expression Signatures in Predicted Acute Lymphoblastic Leukemia with MLL Rearrangements" Cold Spring Harbor Laboratory Meetings, Systems Biology: Genomic Approaches to Transcriptional Regulation, (March 4-7, New York US) 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

文献検索のインターフェイスに関し、特許出願の予定。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

IV 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
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 NH 2-Terminal Fragment of Glypican-3 as a Serological Marker for Early Stage Hepatocellular Carcinoma.	Cancer Research	64	2418-2423	2004
Ge X, Tsustumi S, Aburatani H, Iwata S.	Reducing false positives in molecular pattern recognition.	Genome Informatics	14	34-43	2003
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	1	5	2003
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
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
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
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
Kashima T, Nakamura K, Kawaguchi J, Takanashi M, Ishida T, Aburatani H, Kudo A, Fukayama M, Grigoriadis AE.	Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo.	Int J Cancer	104	147-54	2003

Chong JM, Sakuma K, Sudo M, Ushiku T, Uozaki H, Shibahara J, Nagai H, Funata N, Taniguchi H, Aburatani H, Fukayama M.	Global and non-random CpG-island methylation in gastric carcinoma associated with Epstein-Barr virus.	Cancer Sci	94	76-80	2003
Hoshimoto K, Yamauchi N, Takazawa Y, Onda T, Taketani Y, Fukayama M.	CD44 variant 6 in endometrioid carcinoma of the uterus: its expression in the adenocarcinoma component is an independent prognostic marker.	Pathol Res Pract	199	71-7	2003
Zhang SC, Miyamoto S, Kamijo T, Hayashi R, Hasebe T, Ishii G, Fukayama M.	Ochiai A. Intratumor microvessel density in biopsy specimens predicts local response of hypopharyngeal cancer to radiotherapy.	Jpn J Clin Oncol	33	613-9	2003
Liu D, Wada I, Tateno H, Ogino D, Suzuki M, Li L, Lu W, Kojiro M, Fukayama M, Okabe H, Fukumoto M.	Allelotypic characteristics of thorotrast-induced intrahepatic cholangiocarcinoma: comparison to liver cancers not associated with thorotrast.	Radiat Res	161	235-43	2004
Sudo M, Chong JM, Sakuma K, Ushiku T, Uozaki H, Nagai H, Funata N, Matsumoto Y, Fukayama M.	Promoter hypermethylation of E-cadherin and its abnormal expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma.	Int J Cancer	109	194-9	2004
Ohkubo T, Sugawara Y, Imamura H, Kaneko J, Matsui Y, Makuuchi M.	Early recurrence of hepatocellular carcinoma after living donor liver transplantation.	Hepato-gastroenterology	51(55)	237-8	2004
Makuuchi M, Sano K.	The surgical approach to HCC: our progress and results in.	Japan. Liver Transpl	10(2 Suppl 1)	S46-52	2004
Ikai I, Itai Y, Okita K, Omata M, Kojiro M, Kobayashi K, Nakanuma Y, Futagawa S, Makuuchi M, Yamaoka Y.	Report of the 15th follow-up survey of primary liver cancer.	Hepatol Res	28(1)	21-29	2004
Sano K, Takayama T, Murakami K, Saiki I, Makuuchi M.	Overexpression of retinoic acid receptor alpha in hepatocellular carcinoma.	Clin Cancer Res	9(10 Pt 1)	3679-83	2003
Makuuchi M, Belghiti J, Belli G, Fan ST, Lau JW, Ringe B, Strasberg SM, Vauthey JN, Yamaoka Y, Yamasaki S	Working Group of the International Scientific Committee of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association. IHPBA concordant classification of primary liver cancer: working group report.	Hepatobiliary Pancreat Surg	10(1)	26-30	2003