

2003.13'

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

慢性肝障害合併肝癌の治療適応決定のための

肝炎・肝硬変 DNA チップの開発

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 森 正樹

平成16（2004）年 4月

目 次

I	総括研究報告	
	慢性肝障害合併肝癌の治療適応決定のための 肝炎・肝硬変DNAチップの開発	----- 1
	森 正樹	
II	研究成果の刊行に関する一覧表	----- 5
III	研究成果の刊行物・別刷	----- 6

慢性肝障害合併肝癌の治療適応決定のための肝炎・肝硬変DNAチップの開発

主任研究者 森 正樹 九州大学生体防御医学研究所 教授

（研究要旨）本研究では、客観的かつ標準化可能な肝機能評価法として、肝炎肝硬変DNAチップを開発することを目的とした。研究は3年計画で行い平成13年度は肝癌患者からの標本及びデータ収集とDNAマイクロアレイ法の実践応用を行い平成14年度はラット肝硬変モデルを用いて遺伝子発現パターンに基づく肝障害度の定量化スコアを確立した。平成15年度は、臨床例においても再現可能であるかを検証した。即ち、非癌部切除標本での肝障害関連遺伝子の同定と遺伝子発現パターンに基づく定量化スコアの決定を行った。肝障害度を肝線維化の程度と肝炎活動性に分け、既存の臨床的評価法との比較により検証した。肝線維化に関しては、既存の血液検査で最も精度の高かったIV型コラーゲン・7Sを格段に凌駕してきた。一方、従来の病理学的評価との関連では、新大山分類を用いた場合等、判定医の主観が入る事のみならず、各Staging, Gradingで大きな重なりがある。この点、われわれの定量化スコアでは従来の病理学的評価より客観性・正確性の両面において勝るものと期待される。

以上より、肝障害関連遺伝子の発現パターンに基づく肝機能評価法の確立には十分な可能性があり、極細の肝生検針にて採取した微量の組織にて評価する診断機器の開発を進めている。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

宇都宮徹・九州大学生体防御医学研究所講師
井上 裕 九州大学生体防御医学研究所助教授
三森功士・九州大学生体防御医学研究所助手
渡邊五朗・虎の門病院消化器外科部長

A 研究目的

我が国の肝癌罹患率は8割以上に慢性肝炎 肝硬変が併存しており、肝癌治療にあたっては常にその併存肝疾患の重症度を正確に把握することが必要となる。従来より肝機能(予備能)評価法としてChild分類や臨床病期分類などが汎用されてきたか、いずれもその正確性において一定の限界があり客観的な評価法とはなり難い。そこで本研究ではDNAマイクロアレイ法を用いて、より正確・客観的に標準化可能な肝炎活動性や肝線維化などの評価法を確立し、個人レベルで併存肝疾患に応じた適切な肝癌治療法選択に役立てることを目的とする。

B 研究方法

研究は3年計画で行い、平成13年度は肝癌患者からの非癌部切除標本及び臨床データ収集とDNAマイクロアレイ法の実践応用を行った。

平成14年度からは、ラットを用いた基礎的検討と非癌部切除標本を用いた臨床的検討の実際を開始した。平成14年度は、基礎的検討を中心に行った。0.05% thioacetamideの自由飲水3ヶ月間によるラット肝硬変モデルを作製し肝線維化率をAZAN染色による面積比で算出した。cDNAマイクロアレイ法(14,815遺伝子)を用いて遺伝子発現を解析した。20頭のtraining sampleにおいて肝線維化率と相関の強い上位95遺伝子の発現パターンにより算定された肝線維化予測値は、肝線維化率実測値と極めて良く相関した($R=0.910$, $P<0.001$)。6頭のtest sampleにおいても、本法によるスコア化の妥当性が実証された($R=0.908$, $P<0.05$)。以上より、肝線維化関連遺伝子の発現パターンのみを検索することにより肝線維化の程度を評価できる可能性が示された。平成15年度は、平成14年度に得た基礎的検討結果を踏まえ臨床的検討を中心に研究を進めた。当研究所、虎の門病院、飯塚病院、広島日赤病院、大分日赤病院の5施設において倫理委員会の承認及び患者インフォームドコンセント取得のもと非癌部切除標本の採取を行ってきた。非癌部切除標本のDNAマイクロアレイ(12,814遺伝子)解析を行った。臨床的肝機能評価は、GPT値、ICGR15値、プロトロンヒン時間、IV型コラーゲン・7S、ヒアルロン酸等の

血液検査と病理所見を用いた。臨床例においても肝線維化率をAZAN染色による面積比で算出した。更に、新大山分類に則り、2人の病理医によりStaging (F0~F4)とGrading (A0~A3)を決定した。同一症例での非癌部切除標本と肝生検標本におけるDNAマイクロアレイ解析も行った。

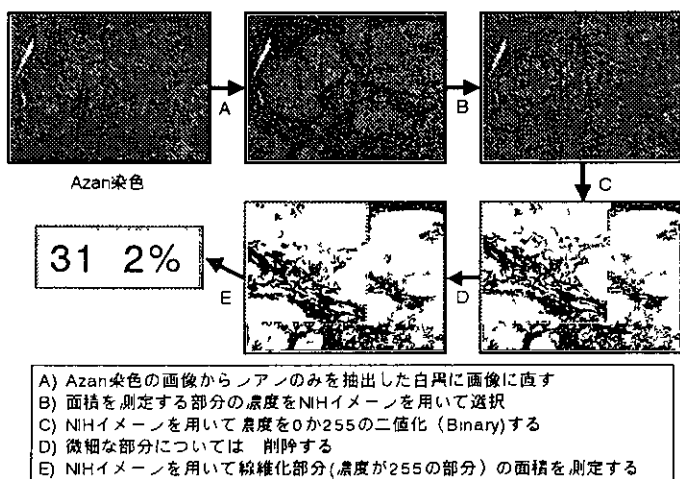
(倫理面への配慮) 当研究は「ヒトゲノム 遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日)」に厳密に従い、十分なインフォームドコンセントを得た患者から新たに採取された組織、血液について遺伝子発現解析を行っている。当該研究施設にはすでに倫理委員会が設置されており、十分な審議を得ている。また施設内に患者情報管理者を置いており、患者の個人情報と遺伝子発現解析結果は管理者のもとに厳重に分割管理され、情報の漏洩防止には十分の配慮を払っている。

C 研究結果

(1) 基礎的検討 ラット肝硬変モデルを作製し肝線維化率と相関の強い上位95遺伝子の発現パターンにより算定された肝線維化予測値(定量化スコア)は、肝線維化率実測値と極めて良く相関することをsupervised learning法にて実証した。即ち、年齢・性・肝障害の要因などを統一した肝硬変モデルにおいては、肝線維化関連遺伝子の発現パターンのみを検索することにて肝線維化の程度を評価できることを実証した(特許出願中)。

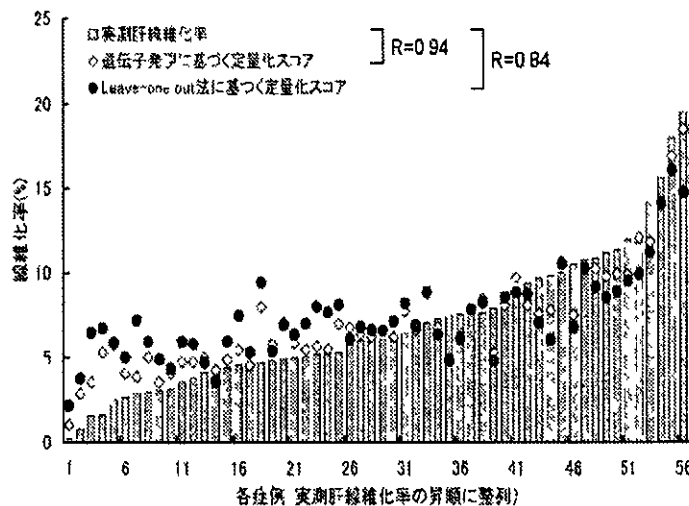
(2) 臨床的検討 肝がん74例の非癌部切除標本を用いてAZAN染色を行い、実測線維化率を測定した。本線維化率は9視野(弱拵40倍視野)の平均であり、1cm²以上の十分な量の切除肝組織によってのみ決定される指標であり、肝生検組織などでは到底決定できない肝線維化の程度を評価する教師値としての指標である(図1)。

図1 実測線維化率測定方法



DNAマイクロアレイの解析結果と実測線維化率との関連より「support vector regression法と変数増加法を組み合わせた解析法」を用いて27個の肝線維化関連遺伝子群を決定した。これら27遺伝子を用いて算出した肝線維化の定量化スコアは実測線維化率と良く相関した($R=0.94$)。supervised learning法であるleave-one-out法を用いても $R=0.84$ と良好であった(図2)。

図2. 肝線維化関連遺伝子27個の発現パターンに基づく肝線維化のスコア化



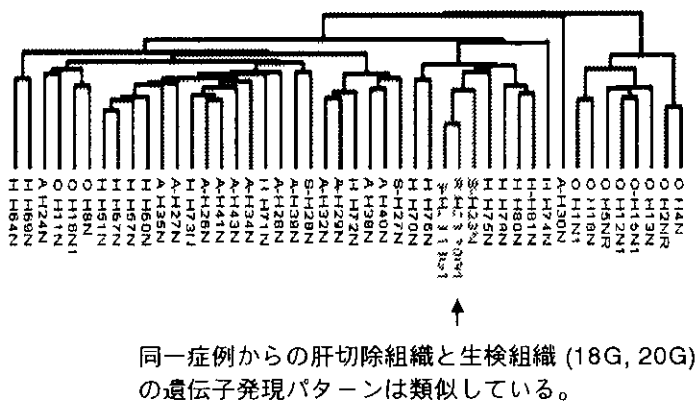
同様の症例において、実測線維化率と既存の肝機能検査(肝線維化マーカーを含む)との相関係数をみると、良好な順に、IV型コラーゲン・7S 0.65 、ICGR15 0.53 、PT 0.51 、アルブミン値 0.45 、血小板数 0.38 、ヒアルロン酸 0.36 、ヘパプラスチンテスト 0.28 であった。以上の如く、教師値としての実測線維化率を最も良く反影する既存の指標はIV型コラーゲン・7S 0.65 であるか、遺伝子発現パターンに基づく定量化スコア 0.94 を用いることと格段に精度を向上できることか明かとなった。一方、肝炎活動性の指標の一つであるGPT値と非癌部切除標本のDNAマイクロアレイ解析結果より

「support vector regression法と変数増加法を組み合わせた解析法」を用いて5個の肝炎活動性関連遺伝子群を決定した。これら5遺伝子を用いて決定した肝炎活動性の定量化スコアはtraining sample 46症例においてGPT値と良く相関した($R=0.61$)。leave-one-out法を用いても $R=0.59$ と比較的良好であった。また、全く独立する12症例においても $R=0.61$ と良好な相関を示した。更に、もう一つの肝炎活動性の指標である新大山分類に基づいて決定したGrading (A0~A3、2人の肝臓病理医のGrading scoreの

平均値を用いた)と肝がん51例の切除非がん組織のDNAマイクロアレイ解析結果より

「support vector regression法と変数増加法を組み合わせた解析法」を用いて5個の肝炎活動性関連遺伝子群を決定した。これら5遺伝子を用いて決定した肝炎活動性の定量化スコアは training sample 41症例において組織学的な Gradingと良く相関した($R=0.64$)。leave-one-out法を用いても $R=0.61$ と良好であった。また、独立する10症例においても $R=0.76$ と良好な相関を示した。臨床応用を考慮したとき標本の採取は肝生検によることか想定される。同一症例の非癌肝組織より18G, 20Gの生検針で肝組織を採取し通常の採取法との比較を行った。Rosetta Luminator 10 (Agilent社製の解析ソフト)による解析で有意差を認める約2000遺伝子において、切除組織と生検組織での相関係数は $R=0.95$ 、一致率は99%であった。クラスター解析でも一つのクラスターに分類された(図3)。

図3 肝切除組織と生検組織のクラスタリング



20Gの肝生検針(ACECUT)にて $15.3 \pm 1.4 \mu\text{g}$ の total RNAを採取可能である。われわれは平成15年12月以後、Agilent社製オリコアレイ(約17000遺伝子搭載)へ全面的に切り替えてDNAマイクロアレイ解析を行っているが、解析に必要な total RNA量は $0.05-0.5 \mu\text{g}$ である。現在22Gと23Gの肝生検針にて検討中であるが、今後極細の肝生検針にて採取した極く微量の組織にて非癌部切除標本にて得られた解析結果と同様の評価が可能であると確信している。

D 考察

平成15年度の目標は、基礎的検討で得た手法を臨床例においても再現可能であるか否かを検証することであった。即ち、非癌部切除標本で

の肝障害関連遺伝子の同定と遺伝子発現パターンに基づく定量化スコアの決定を行った。肝障害度を肝線維化の程度と肝炎活動性に分け、既存の臨床的評価法との比較により検証した。肝線維化の程度に関しては、既存の血液検査で最も精度の高かったIV型コラーゲン・7Sを格段に凌駕してきた。一方、従来の病理学的評価との関連では、新犬山分類を用いた場合、各 Staging, Gradingで大きな重なりがある(つまり単なるクルーピンクであり定量性に劣る)ことはわれわれのデータを示すまでもなく自明の事実である。われわれの定量化スコアは、従来の病理学的評価を客観性・正確性の両面において明らかに凌駕するものと期待される。肝炎活動性についても遺伝子発現パターンに基づく定量化スコアの決定を行い、一定の成果を示せたか、その精度においては改善の余地がある。現在、肝炎活動性と共に変化する多くの遺伝子群の中から新規の肝炎活動性マーカー(血清レベルで評価可能な分泌蛋白をターゲット)を探索中である。本件研究の特徴は、肝障害関連遺伝子の選別の際に教師値となる実測肝線維化率などの決定を外科切除した非癌部肝組織を低倍率の視野で広範に調べた結果を基に行った点である。実際の臨床応用では極細の肝生検針にて採取した極く微量の組織にて評価を行うがその根拠となる教師値がしっかりしている点で信頼性が高いと言える。

E 結論

本研究では、客観的かつ正確で標準化可能な肝機能評価法として肝炎・肝硬変DNAチップを開発することを最終目標とする。平成14年度は、ラット肝硬変モデルを用いて肝線維化関連遺伝子の発現パターンのみを検索することにて肝線維化の程度を評価できることを実証した。平成15年度は、臨床的に非癌部切除標本においても同様に評価できることを示した。特に、既存の血液検査で最も精度の高かったIV型コラーゲン・7Sと比べても格段に精度が高いことを示した。新犬山分類などの病理学的評価は客観性・定量性に劣るが、遺伝子発現に基づく定量化スコアは、その両面で明らかに勝る。極細の肝生検針にて採取した極く微量の組織にて評価可能となれば、現在世界中で行われている肝生検の既成概念を大きく変化させるものと考えられる。

F 健康危険情報

該当無し。

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Yamaguchi, H , Tanaka, F , Ohta, M , Inoue, H , and Mori, M Identification of HLA-A24-restricted CTL epitope from cancer-testis antigen, NY-ESO-1, and induction of a specific antitumor immune response ***Clin Cancer Res***, 10 890-896, 2004
- 2 Mimori, K , Tanaka, Y , Yoshinaga, K , Masuda, T , Inoue, H , and Mori, M Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer ***Ann Oncol***, 15 236-241, 2004
- 3 Utsunomiya T, Shimada M, Kaku S, Yamada K, Sugimachi K Antioxidant and anti-inflammatory effects of diet supplemented with sesamin on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats ***Hepato-Gastroenterol*** 50 1609-1614 2003
- 4 Yoshinaga, K , Mimori, K , Yamashita, K , Utsunomiya, T , Inoue, H , and Mori, M Clinical significance of the expression of activin A in esophageal carcinoma ***Int J Oncol***, 22 75-80, 2003
- 5 Yoshinaga, K , Inoue, H , Tanaka, F , Mimori, K , Utsunomiya, T , and Mori, M Platelet-derived endothelial cell growth factor mediates Rho-associated coiled-coil domain kinase messenger RNA expression and promotes cell motility ***Ann Surg Oncol***, 10 582-587, 2003
- 6 Yamashita, K , Upadhyay, S , Mimori, K , Inoue, H , and Mori, M Clinical significance of secreted protein acidic and rich in cysteine in esophageal carcinoma and relation to carcinoma progression ***Cancer***, 97 2412-2419, 2003
- 7 Yamashita, K , Mimori, K , Inoue, H , Mori, M , and Sidransky, D A tumor-suppressive role for trypsin in human cancer progression ***Cancer Res***, 63 6575-6578, 2003
- 8 Yamaguchi, H , Tanaka, F , Sadanaga, N , Ohta, M , Inoue, H , and Mori, M Stimulation of CD40 inhibits Fas- or chemotherapy-mediated apoptosis and increases cell motility in human gastric carcinoma cell ***Int J Oncol***, 23 1697-1702, 2003
- 9 Mimori, K , Shiraishi, T , Mashino, K , Sonoda, H , Yamashita, K , Utsunomiya, T , Alonso, M A , Inoue, H , and Mori, M MAL gene expression in esophageal cancer suppresses motility, invasion, tumorigenicity and enhances apoptosis through the Fas pathway ***Oncogene***, 22 3463-3471, 2003
- 10 Mimori, K , Inoue, H , Shiraishi, T , Matsuyama, A , Mafune, K , Tanaka, Y , and Mori, M Microsatellite instability is often observed in esophageal carcinoma patients with allelic loss in the FHIT/FRA3B locus ***Oncology***, 64 275-279, 2003
- 11 Mimori, K , Inoue, H , Ishii, H , and Mori, M INI-1, a partner gene of ALL-1, is highly conserved in human acute leukemia ***Oncol Rep***, 10 551-553, 2003
- 12 Masuda, T A , Inoue, H , Nishida, K , Sonoda, H , Yoshikawa, Y , Kakeji, Y , Utsunomiya, T , and Mori, M Cyclin-dependent kinase 1 gene expression is associated with poor prognosis in gastric carcinoma ***Clin Cancer Res***, 9 5693-5698, 2003

2 学会発表

- 1 宇都宮 徹ほか、マウス肝切除モデルにおける肝再生関連遺伝子の包括的解析、日本再生医療学会 雑誌、第2巻 (Supp1) 、88、2003
- 2 宇都宮 徹ほか、細胞癌の治療法選択のための標準化可能な分子遺伝学的肝予備能評価法の確立、日本外科学会雑誌、第104巻、217、2003
- 3 増田隆明ほか、細胞周期関連遺伝子p27 の翻訳後制御の重要性と癌悪性度診断への応用、日本外科学会雑誌、第104巻、237、2003
- 4 太田光彦ほか、G protein gamma7 遺伝子導入食道癌細胞株のマイクロアレイによる遺伝子の包括的検討、日本外科学会雑誌、第104巻、351、2003
- 5 岸原文明ほか、肝線維化機構におけるactivin A 遺伝子発現の意義、日本外科学会雑誌、第104巻、363、2003
- 6 西田康二郎ほか、乳癌細胞株における放射線感受性比較とDNA マイクロアレイを用いた放射線感受性 抵抗性規定遺伝子の検索、日本外科学会雑誌、第104巻、256、2003
- 7 山下継史ほか、マイクロアレイを用いた食道癌における癌抑制遺伝子群の同定、日本外科学会雑誌、第104巻、261、2003
- 8 井上 裕ほか、胃癌における術前生検遺伝子診断法の開発とその妥当性の検討-術前生検組織と切除胃癌組織のマイクロアレイ発現プロファイルの比較-、日本外科学会雑誌、第104巻、99、2003
- 9 浅田健二ほか、COMT (Catechol - O - Methyltransferase) 遺伝子多型の乳癌における意義、日本外科学会雑誌、第104巻、284、2003
- 10 園田英人ほか、鏡視下手術の腫瘍発育におよぼす影響の分子生物学的解析、日本外科学会雑誌、第104巻、304、2003
- 11 田中文明ほか、癌抗原ペプチドと樹状細胞を用いた進行消化器癌に対する治療の安全性 有効性検討、日本消化器外科学会雑誌、第36巻、743、2003
- 12 宇都宮 徹ほか、肝切除術に対する生体反応としての肝再生 一分子機構の網羅的解析と制御への展開、日本消化器外科学会雑誌、第36巻、753、2003

3 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得
特許願書類番号 P0188T (出願中)
- 2 実用新案登録
該当無し
- 3 その他
該当無し

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamaguchi, H, Tanaka, F, Ohta, M, <u>Inoue, H</u> , and <u>Mori, M</u>	Identification of HLA-A24-restricted CTL epitope from cancer-testis antigen, NY-ESO-1, and induction of a specific antitumor immune response	<i>Clin Cancer Res</i>	10	890-896	2004
<u>Mimori, K</u> , Tanaka, Y, Yoshinaga, K, Masuda, T, Yamashita, K, Okamoto, M, <u>Inoue, H</u> , and <u>Mori, M</u>	Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer	<i>Ann Surg Oncol</i>	15	236-241	2004
<u>Utsunomiya T</u> , Shimada M, Hasegawa H, Yamasaki M, Kaku S, Yamada K, Sugimachi K	Antioxidant and anti-inflammatory effects of diet supplemented with sesamin on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats	<i>Hepato-Gastroenterol</i>	50	1609-1614	2003
Yoshinaga K, <u>Mimori K</u> , Yamashita K, <u>Utsunomiya T</u> , <u>Inoue H</u> , <u>Mori M</u>	Clinical significance of the expression of activin A in esophageal carcinoma	<i>Int J Oncol</i>	22	75-80	2003
Yoshinaga K, <u>Inoue H</u> , Tanaka F, <u>Mimori K</u> , <u>Utsunomiya T</u> , <u>Mori M</u>	Platelet derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) mediates Rho associated coiled-coil domain kinase (ROCK 1) mRNA expression and promotes cell motility	<i>Ann Surg Oncol</i>	10	582-587	2003
Yamashita, K, Upadhyay, S, <u>Mimori, K</u> , <u>Inoue, H</u> , and <u>Mori, M</u>	Clinical significance of secreted protein acidic and rich in cysteine in esophageal carcinoma and its relation to carcinoma progression	<i>Cancer</i>	97	2412-2419	2003
Yamashita, K, <u>Mimori, K</u> , <u>Inoue, H</u> , <u>Mori, M</u> , and Sidransky, D	A tumor-suppressive role for trypsin in human cancer progression	<i>Cancer Res</i>	63	6575-6578	2003
Yamaguchi, H, Tanaka, F, Sadanaga, N, Ohta, M, <u>Inoue, H</u> , and <u>Mori, M</u> ,	Stimulation of CD40 inhibits Fas- or chemotherapy-mediated apoptosis and increases cell motility in human gastric carcinoma cells	<i>Int J Oncol</i>	23	1697-1702	2003
<u>Mimori, K</u> , Shiraishi, T, Mashino, K, Sonoda, H, Yamashita, K, Yoshinaga, K, Masuda, T, <u>Utsunomiya, T</u> , Alonso, M A, <u>Inoue, H</u> , and <u>Mori, M</u>	MAL gene expression in esophageal cancer suppresses motility, invasion and tumorigenicity and enhances apoptosis through the Fas pathway	<i>Oncogene</i>	22	3463-3471	2003
<u>Mimori, K</u> , <u>Inoue, H</u> , Ishii, H, and <u>Mori, M</u>	Microsatellite instability is often observed in esophageal carcinoma patients with allelic loss in the FHIT/FRA3B locus	<i>Oncology</i>	64	275-279	2003
<u>Mimori, K</u> , <u>Inoue, H</u> , Shiraishi, T, Matsuyama, A, Mafune, K, Tanaka, Y, and <u>Mori, M</u>	INI-1, a partner gene of ALL-1, is highly conserved in human acute leukemia	<i>Oncol Rep</i>	10	551-553	2003
Masuda, T A, <u>Inoue, H</u> , Nishida, K, Sonoda, H, Yoshikawa, Y, Kakeji, Y, <u>Utsunomiya, T</u> , and <u>Mori, M</u>	Cyclin-dependent kinase 1 gene expression is associated with poor prognosis in gastric carcinoma	<i>Clin Cancer Res</i>	9	5693-5698	2003

20031139

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。