

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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 油 谷 浩 幸

平成 17 (2005) 年 3 月

目次

I	構成員名簿	1
II	平成 16 年度総括研究報告書	5
III	平成 16 年度分担研究報告書	
	肝細胞癌の遺伝子発現および染色体変異に関する研究	13
	東京大学国際・産学共同研究センター教授 油谷 浩幸	
	肝がん関連遺伝子の分子病理学的解析	21
	東京大学大学院医学系研究科教授 深山 正久	
	肝細胞癌の発現プロファイルの染色体領域による偏在に関する研究	29
	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) F A X : 03-5452-6075

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

Ⅱ 平成 16 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

最大 5 万個の転写産物について肝細胞癌組織の非癌部と癌部組織における遺伝子発現プロファイリング解析をおこない、新規の診断、治療の標的分子として、GPC3 を含めた膜分子 3、転写因子 2、フォスファターゼ 1、細胞質因子 2、分泌分子 2 を同定した。肝細胞癌に高発現するヘパラン硫酸プロテオグリカン GPC3 は GPI アンカーされる分子であり、全長分子以外に昨年度に報告した N 末端側切断断片 sGPC3 (40kDa) が血清中に存在することが認められ、ELISA による血清濃度測定系を樹立した。さらに異なる部位で切断を受けた分子種の存在も確認された。GPC3 は既に報告した肝前癌病変のみならず、予後の悪い hepatoid 胃癌を鋭敏に認識する有用な免疫組織染色のマーカーとしても有効であることが示された。肝細胞癌に生じている染色体欠失や増幅などのゲノム異常を解明すべく、発現プロファイルの染色体領域による偏在を示した。さらに新たに開発したアレル別にコピー数を解析する手法を用いて UPD を含めて染色体変異を同定可能とした。

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

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。

既に同定した肝癌特異的な発現を示す遺伝子の機能解析を行い、肝発がんにおける役割を検討する。研究成果の実用化として肝細胞癌に特異的に高発現するタンパク質に対する抗体を作成し、血清診断システムの開発を進める。発癌は様々な遺伝子変異の蓄積によって起こり、癌抑制遺伝子の変異と関連する染色体領域のヘテロ接合性の欠失 (LOH) や癌遺伝子を含む領域の増幅は癌の発生、進展に寄与すると考えられる。肝細胞癌に特異的な染色体変異を明らかにすべく、新規に開発したアルゴリズム GIM によりアレル別コピー数解析を行った。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

組織試料および RNA の調製

肝組織試料の採取、RNA の精製については、昨年度までの報告書の通りである。東京大学医学部附属病院肝胆膵外科および埼玉県立がんセンター外科において肝切除手術を受けた症例よりインフォームドコンセントの下に採取し、凍結された非癌部と癌部組織それぞれより Trizol (LifeTechnology) を用いてトータル RNA を抽出した。

遺伝子発現プロファイリング解析

U133 アレイ (Affymetrix 社) については GeneChip Microarray Suite により average difference 値を算出し、遺伝子発現プロファイルを作成した。組織特異性については他の臓器あるいは組織についての発現解析を進めた。データ処理にあたっては実験間のばらつきを是正するために、アレイ間のシグナル強度をアレイ全体の蛍光強度が一定となるように平均値を 100 に標準化した。非癌部、正常肝、高・中分化型、低分化型の各群別にクラスタ解析により類似していると判断した複数症例からの RNA を等量ずつプールした検体を標識して、U133A、B アレイを用いて計 4 万個の遺伝子あるいは EST 解析を進めた。肝癌における発現特異性の評価のためにヒト胎児肝を含む正常臓器、ヒト初代培養細胞、様々ながん細胞株についての発現プロファイルデータを参照データとして用いた。本年度はあらたに CodeLink55K アレイを用いての探索にも着手した。

統計処理にあたっては、発現量の低い遺伝子についてはデータの信頼度が低いため、average difference 値が全ての症例で一定値以下の場合には、解析対象から除外した。なお、カットオフの閾値については解析により変動させた。

血清中 GPC3 分子の解析

血清中には N 末側の 40kDa 断片の sGPC が主要な分子であると思われるが、sGPC3 に加えてグリカン付加された分子が存在するこ

とが Capurro らにより示唆された。Huh6 細胞株の上清に対して、N 末端側抗体と 2 種類の C 末端側抗体を用いて検討した。

免疫組織学的解析

胃癌の中には通常肝細胞癌で上昇する AFP が上昇し、形態的にも肝細胞癌に類似するものがあり、肝臓様腺癌 Hepatoid adenocarcinoma, AFP 産生胃癌などと呼ばれている。AFP 産生胃癌は胃癌全体の 1.85-15% に発生する稀なものであるが、脈管侵襲、胃壁深層への浸潤や肝転移が多く予後不良である。今回作成した GPC3 に対するモノクローナル抗体が、胃原発の hepatoid adenocarcinoma の認識に有用であるか否か、他のマーカーとも比較して検証した。

東大病院病理部の過去の胃癌ファイルから無作為に 116 例の症例を選択し、組織マイクロアレイを作成した。組織マイクロアレイは各症例のパラフィンブロックから直径 2mm のシリンダーを 2 ヶ所ずつくりぬき、1 ブロックあたり 24 例、48 個所の検体を集めて新たな組織ブロックを作成したものである。これにより効率よく癌細胞における蛋白の発現が検討できる。一方、過去の胃癌症例から、AFP を産生している hepatoid adenocarcinoma 10 症例を選び、浸潤の強い代表的な 1 個所を免疫組織学的に検索した。組織マイクロアレイ、hepatoid adenocarcinoma 例ブロックを 4 μ の厚さに薄切し、GPC3 (C 末抗体および A1836A), AFP, 抗 hepatocyte 抗原 (Dako 社), PIVKA-II (Eisai 社) に対する抗体を用いて染色した。GPC3 の染色に際してはオートクレーブ処理を前処置として行った。

発現プロファイルの染色体領域による偏在

先に開発した解析法 Expression Imbalance Map (以下 EIM) はマイクロアレイによる遺伝子発現データに染色体位置情報をリンクさせ、マッピングすることにより、発現強度の変化を伴う遺伝子群が集中して

いる染色体領域を同定することが可能である。

アレル別コピー数解析

外科的に切除された高分化型肝癌 9 例、中分化型肝癌 20 例、低分化型肝癌 7 例を含む肝細胞癌 36 例 (B 型肝炎 14 例、C 型肝炎 19 例、非 B 非 C 型肝炎 2 例、B+C 型肝炎 1 例) 及び同一患者の末梢血より抽出したゲノム DNA を用いて、SNP チップ (10K アレイ、Affymetrix 社) により染色体コピー数をアレルごとに解析した。

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の研究

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)

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が、アレルを識別するために多型情報を使用する。東京大学医学部および先端科学技術研究センターの研究倫理審査委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

新規肝細胞癌関連遺伝子の探索

肝細胞癌に高発現する遺伝子として GPC3 を含めた膜分子 3、転写因子 2、フォスファターゼ 1、細胞質因子 2、分泌分子 2 を同定しており、抗体の作成、相互作用する分子の解析を進めている。

血清 GPC3 の解析

2-ME(-) の非還元状態で電気泳動すると

sGPC3 に相当するバンドはほとんど検出できず、主にグリカン化された C 末側断片と結合していると考えられた。

従来の N 末側断片 (40kDa) と C 末側断片 (30kDa) を認識する抗体に加えて、新たに得られた C 末端側の 30kDa 断片を形成する切断点の近傍をエピトープとするモノクロナル抗体を用いたところ、新たにおよそ 50kDa のバンドが非還元状態でも検出され、従来の C 末断片認識抗体では検出されなかった (図 1)。R358 より C 末端側の断片にはまだ同定されていない切断点が存在すると考えられた。

免疫組織学的解析

胃癌組織アレイにおける検索では、116 例中 4 例 (3.4%) に GPC3 陽性像を認め、その内 1 例は AFP にも陽性像を示した。それ以外には AFP 陽性例はみられなかった。一方、Hepatocyte 抗原は 26 例に PIVKA-II は 6 例に陽性像を認めた。GPC3 陽性例は低分化腺癌、特に髄様癌の頻度が高く、そのうち 1 例は hepatoid adenocarcinoma の像を示していた。Hepatocyte 抗原、PIVKA-II と GPC3、AFP は独立して発現していた。一方、AFP を産生する Hepatoid adenocarcinoma では、10 例全例が GPC3 陽性であり、そのうち 8 例では AFP の発現と比較して広範囲かつ強い染色性を示した。

発現プロファイルの染色体領域による偏在

EIM により解析を行ったところ肝癌における CGH の論文で報告されている 1q21-23, 8q22-23, 17q11-21, 20q11 で発現の増加が、4q11-21, 9p11-13, 16q13-21, 17p12-13 で発現の減少する遺伝子が集中していたほか、過去の論文では報告されていない領域の 2q31-32, 12q23-24 の発現増加が確認された。上記 10 領域での遺伝子発現変化領域の総和は肝癌の脱分化が進むにつれて増加していた。すなわち高分化、中分化、低分化型肝癌での比較では、低分化型肝癌

でより広範囲にわたって遺伝子発現領域の変化していた。

肝細胞癌のアレル別コピー数解析

SNPチップによる解析の call rate は癌部、正常部でそれぞれ $93.4 \pm 2.7\%$ 、 $95.9 \pm 1.9\%$ と癌部、正常部で明らかな差はみられなかった。また、チップ上の SNP がヘテロである割合 (informative rate) は癌部、正常部でそれぞれ $27.4 \pm 3.2\%$ 、 $31.0 \pm 0.9\%$ と癌部で低い結果であったが、これは癌部における LOH によるものと考えられた。GIM による解析では 7 領域 (1q, 5q, 6p, 7q, 8q, 17q, 20q) においてゲノム数の増加が、また 8 領域 (1p, 4q, 6q, 8p, 10q, 13q, 16p, 17p) で LOH が認められた (図 2)。この HCC における染色体変化領域は過去の Comparative Genomic Hybridization (CGH) 法や包括的 Allelotyping Study による報告と比較して特に大きな差異は認められなかった。また、GIM を用いた解析では、1q, 2p, 2q, 3p, 6q, 8p, 9p, 10q, 13q 染色体上で片親に由来し、対立する染色体が欠失するダイソミー、すなわち uniparental disomy (UPD) 領域の同定が可能で、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法により染色体数を、また SNP を含む領域をシーケンスすることにより病変部の LOH を同定する SNP 解析法により LOH であることを確認し、GIM で描出された allele imbalance の状態を証明した (図 3)。GIM で認められた端数のアレル数については、FISH 法によりその領域における癌細胞の heterogeneity であることが確認された (緑川、未発表データ)。

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

本研究課題に関係するシグナル伝達系での検索例を実証例として示す。インターフェロンは抗ウィルス作用があるため肝炎の治療薬として用いられる。IFN には α 、 β 、 γ が存在し、IFN 受容体と結合し、そのシグ

ナルを細胞内に伝える。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。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。

D. 考察

分泌分子として同定された DKK1 は Wnt シグナルのアンタゴニストであり、Wnt シグナルの亢進に対する生体のフィードバック反応であると考えられた。

昨年度に報告した血清 sGPC3 測定系では N 末側の 40kDa 断片を認識する 2 種類のモノクローナル抗体を使用している。非還元状態ではグリカン化された C 末端断片に結合している sGPC3 とグリカン化されていない 50kDa 断片の双方を認識していたものと考えられる。培養上清中に分泌される GPC3 については N 末端側を認識する抗体の組合せによる ELISA のみで高値で検出できたことから、上清中には N 末端側断片 (sGPC) が有意であると考えられた。肝細胞癌切除後の血清 sGPC3 値が高値の患者群は有意に再発率が高い傾向があり、術後モニタリングのためのバイオマーカーとしての有意義であると考えられた (渡邊、未公表データ)。

抗 GPC3 抗体は hepatoid adenocarcinoma を確実に認識し、AFP に比べ染色性が強く、広い範囲で陽性を示しことから、予後の悪い胃癌である hepatoid adenocarcinoma を高感度に認識する有用なマーカーとなり得ることが明らかになった。

本研究における EIM の結果はすでに肝細胞癌に関する CGH の論文とデータが合致し、

かつゲノム DNA をテンプレートとした定量的 PCR との結果とも相関することから、転写レベルでの発現変化は DNA レベルでの染色体数の変動を強く反映していることを示すものである。また、遺伝子発現値を染色体上にマッピングすることにより、肝癌脱分化の過程で染色体上の特定の領域が段階的に変化してゆくことが確認された。一方、EIM では発現値を直接に観察しているため、発癌や癌の進行における責任領域を絞りこんだ後、転写レベルの変化を改めて確認する必要がない点が従来の CGH 法と異なる。今回の EIM 法において同定された染色体領域の中で、HAX-1, SHC1, CKS1B, CCT3 が 1q21-23 における候補遺伝子として挙げられた。HAX-1 と SHC1 はチロシンキナーゼの活性化に関与し、CKS1B と CCT3 は細胞周期を加速化する遺伝子と考えられている。これらの遺伝子はいずれも非癌部と較べて肝癌において発現値が増加しており、肝発癌に関与している可能性が示唆された。

GIM によるゲノムレベルの解析は染色体コピー数の増減だけでなく UPD などの allele imbalance 領域の同定も可能であり、CGH 法や Allelotyping Study などの既存の方法と比較してより詳細にアレルの状態を観察することが可能である。UPD は遺伝子の不活化機構に関与する可能性があり、発癌に関与する染色体領域および責任遺伝子の同定に有用であると考えられ、さらなる検討が必要である。肝細胞患者は肝硬変を前癌状態として発生することが多いが、肝硬変病変部から抽出した DNA についてアレル別コピー数解析を行ったところ、すでに LOH が認められる症例も存在した。なお、同一症例の癌部に同一の染色体変異は認められなかったことから、異なる再生結節に由来した腫瘍であったと推測される。また、染色体数は不変にもかかわらず、LOH を示す UPD (uniparental disomy) が生じている領域

も珍しくはなく、遺伝子の不活化機構に関与する可能性があり、さらなる検討が必要である。

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し、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と考えられた。

E. 結論

GPC3 分子には R358 に加えて複数の切断を受ける部位が存在することが明らかになった。GPC3 は特異的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、肝細胞癌および予後の悪い hepatoid 胃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。

肝細胞癌について従来報告された染色体増幅や欠失がアレル別コピー数解析により確認された。EIM 法は癌の遺伝子発現包括的解析のデータに用いられ、癌の分子レベルでの診断及び発癌メカニズムの解明への手段として有用であると考えられる。また、過去に報告されている遺伝子発現クラスタリングは遺伝子群の特定の染色体領域への偏在に強く影響を受けることが、本研究において確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(分担研究者の項参照)

2. 学会発表

(分担研究者の項参照)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含

む)

1. 特許取得
(分担研究者の項参照)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ 平成 16 年度分担研究報告書

肝細胞癌の遺伝子発現および染色体変異に関する研究

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

最大 5 万個の転写産物について肝細胞癌組織の非癌部と癌部組織における遺伝子発現プロファイリング解析をおこない、新規の診断、治療の標的分子を探索した。網羅的遺伝子発現プロファイルパターンと肝細胞癌の臨床的あるいは病理学的診断との相関を解析することにより、肝細胞癌の診断アルゴリズムの開発を目指し、さらに肝癌特異的な発現を示す遺伝子の機能解析を行い、肝発がんにおける役割を検討した。肝細胞癌に高発現するヘパラン硫酸プロテオグリカン GPC3 は GPI アンカーされる分子であり、全長分子以外に N 末端側が切断を受けた断片 sGPC3 が血清中に存在することが認められ、ELISA による血清濃度測定系を樹立した。さらに異なる部位で切断を受けた分子種の存在も確認された。また、肝細胞癌に生じている染色体欠失や増幅などのゲノム異常を解明すべく、アレール別にコピー数を解析する手法を開発した。

A. 研究目的

肝癌特異的な発現を示す遺伝子の機能解析を行い、肝発がんにおける役割を検討する。研究成果の実用化として肝細胞癌に特異的に高発現するタンパク質に対するモノクロナル抗体を作成し、血清診断システムの開発を進める。発癌は様々な遺伝子変異の蓄積によって起こり、癌抑制遺伝子の変異と関連する染色体領域のヘテロ接合性の欠失(LOH)や癌遺伝子を含む領域の増幅は癌の発生、進展に寄与すると考えられる。肝細胞癌に特異的な染色体変異を明らかにすべく、新規に開発したアルゴリズム GIM によりアレール別コピー数解析を行った。

B. 研究方法

組織試料および RNA の調製

肝組織試料の採取、RNA の精製については、昨年度までの報告書の通りである。東京大学医学部付属病院肝胆膵外科および埼玉県立がんセンター外科において肝切除手

術を受けた症例よりインフォームドコンセントの下に採取し、凍結された非癌部と癌部組織それぞれより Trizol (LifeTechnology) を用いてトータル RNA を抽出した。

遺伝子発現プロファイリング解析

U133 アレイ (Affymetrix 社) については GeneChip Microarray Suite により average difference 値を算出し、遺伝子発現プロファイルを作成した。組織特異性については他の臓器あるいは組織についての発現解析を進めた。データ処理にあたっては実験間のばらつきを是正するために、アレイ間のシグナル強度をアレイ全体の蛍光強度が一定となるように平均値を 100 に標準化した。非癌部、正常肝、高・中分化型、低分化型の各群別にクラスタ解析により類似していると判断した複数症例からの RNA を等量ずつプールした検体を標識して、U133A、B アレイを用いて計 4 万個の遺伝子あるいは EST 解析を進めた。肝癌における発現特異性の評価のためにヒト胎児肝を含む正常

臓器、ヒト初代培養細胞、様々ながん細胞株についての発現プロファイルデータを参照データとして用いた。本年度はあらたに CodeLink55K アレイを用いての探索にも着手した。

統計処理にあたっては、発現量の低い遺伝子についてはデータの信頼度が低いため、average difference 値が全ての症例で一定値以下の場合には、解析対象から除外した。なお、カットオフの閾値については解析により変動させた。

血清中 GPC3 分子の解析

血清中には N 末側の 40kDa 断片の sGPC が主要な分子であると思われるが、sGPC3 に加えてグリカン付加された分子が存在することが Capurro らにより示唆された。Huh6 細胞株の上清に対して、N 末端側抗体と 2 種類の C 末端側抗体を用いて検討した。

アレル別コピー数解析

外科的に切除された高分化型肝癌 9 例、中分化型肝癌 20 例、低分化型肝癌 7 例を含む肝細胞癌 36 例 (B 型肝炎 14 例、C 型肝炎 19 例、非 B 非 C 型肝炎 2 例、B+C 型肝炎 1 例) 及び同一患者の末梢血より抽出したゲノム DNA を用いて、SNP チップ(10K アレイ、Affymetrix 社)により染色体コピー数をアレルごとに解析した。

(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が、アレルを識別するために多型情報を使用する。東京大学医学部および先端科学技術研究センターの研究倫理審査委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

新規肝細胞癌関連遺伝子の探索

肝細胞癌に高発現する遺伝子として GPC3 を含めた膜分子 3、転写因子 2、フォスフ

ターゼ 1、細胞質因子 2、分泌分子 2 を同定しており、抗体の作成、相互作用する分子の解析を進めている。

血清 GPC3 の解析

2-ME(-) の非還元状態で電気泳動すると sGPC3 に相当するバンドはほとんど検出できず、主にグリカン化された C 末側断片と結合していると考えられた。

従来の N 末側断片 (40kDa) と C 末側断片 (30kDa) を認識する抗体に加えて、新たに得られた C 末端側の 30kDa 断片を形成する切断点の近傍をエピトープとするモノクロナル抗体を用いたところ、新たにおよそ 50kDa のバンドが非還元状態でも検出され、従来の C 末断片認識抗体では検出されなかった (図 1)。R358 より C 末端側の断片にはまだ同定されていない切断点が存在すると思われた。

肝細胞癌のアレル別コピー数解析

SNP チップによる解析の call rate は癌部、正常部でそれぞれ $93.4 \pm 2.7\%$ 、 $95.9 \pm 1.9\%$ と癌部、正常部で明らかな差はみられなかった。また、チップ上の SNP がヘテロである割合 (informative rate) は癌部、正常部でそれぞれ $27.4 \pm 3.2\%$ 、 $31.0 \pm 0.9\%$ と癌部で低い結果であったが、これは癌部における LOH によるものと考えられた。GIM による解析では 7 領域(1q, 5q, 6p, 7q, 8q, 17q, 20q) においてゲノム数の増加が、また 8 領域(1p, 4q, 6q, 8p, 10q, 13q, 16p, 17p)で LOH が認められた (図 2)。この HCC における染色体変化領域は過去の Comparative Genomic Hybridization (CGH) 法や包括的 Allelotyping Study による報告と比較して特に大きな差異は認められなかった。また、GIM を用いた解析では、1q, 2p, 2q, 3p, 6q, 8p, 9p, 10q, 13q 染色体上で片親に由来し、対立する染色体が欠失するダイソミー、すなわち uniparental disomy (UPD) 領域の同定が可能で、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法により染色体数を、また SNP を含む領域をシーケンスすることにより病変部の LOH を同

定する SNP 解析法により LOH であることを確認し、GIM で描出された allele imbalance の状態を証明した (図 3)。GIM で認められた端数のアレル数については、FISH 法によりその領域における癌細胞の heterogeneity であることが確認された (緑川、未発表データ)。

D. 考察

分泌分子として同定された DKK1 は Wnt シグナルのアンタゴニストであり、Wnt シグナルの亢進に対する生体のフィードバック反応であると考えられた。

昨年度に報告した血清 sGPC3 測定系では N 末側の 40kDa 断片を認識する 2 種類のモノクローナル抗体を使用している。非還元状態ではグリカン化された C 末端断片に結合している sGPC3 とグリカン化されていない 50kDa 断片の双方を認識していたものと考えられる。培養上清中に分泌される GPC3 については N 末端側を認識する抗体の組合せによる ELISA のみで高値で検出できたことから、上清中には N 末端側断片 (sGPC) が有意であると考えられた。肝細胞癌切除後の血清 sGPC3 値が高値の患者群は有意に再発率が高い傾向があり、術後モニタリングのためのバイオマーカーとしての有意義であると考えられた (渡邊、未公表データ)。

GIM によるゲノムレベルの解析は染色体コピー数の増減だけでなく UPD などの allele imbalance 領域の同定も可能であり、CGH 法や Allelotyping Study などの既存の方法と比較してより詳細にアレルの状態を観察することが可能である。UPD は遺伝子の不活化機構に関与する可能性があり、発癌に関与する染色体領域および責任遺伝子の同定に有用であると考えられ、さらなる検討が必要である。肝細胞患者は肝硬変を前癌状態として発生することが多いが、肝硬変病変部から抽出した DNA についてアレル別コピー数解析を行ったところ、すでに LOH が認められる症例も存在した。なお、同一

症例の癌部に同一の染色体変異は認められなかったことから、異なる再生結節に由来した腫瘍であったと推測される。また、染色体数は不変にもかかわらず、LOH を示す UPD (uniparental disomy) が生じている領域も珍しくはなく、遺伝子の不活化機構に関与する可能性があり、さらなる検討が必要である。

E. 結論

GPC3 分子には R358 に加えて複数の切断を受ける部位が存在することが明らかになった。

肝細胞癌について従来報告された染色体増幅や欠失がアレル別コピー数解析により確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamauchi N, et al. The Glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. **Modern Pathology** in press
2. Ge X, Yamamoto S, Tsutsumi S, Midorikawa Y, Ihara S, Wang SM, Aburatani H. Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth-of-expression in normal tissues. **Genomics** 2005, in press
3. Kano M, Tsutsumi S, Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, Kirino T, Aburatani H. A meta-clustering analysis indicates distinct pattern alteration between two series of Gene Expression profiles for induced ischemic tolerance in rats. **Physiological Genomics**. 2005 in press
4. Hippo Y, Sato S, Aburatani H. Glypican-3 as a serum marker for hepatocellular carcinoma. **Cancer Research** 65(1):372; author reply 372-3. 2005
5. Midorikawa Y, Tsutsumi S, Nishimura K, Kamimura N, Kano M, Sakamoto H,

- Makuuchi M, Aburatani H. Distinct chromosomal bias of gene expression signatures in the progression of hepatocellular carcinoma. **Cancer Reseach.** 64(20): 7263-70. 2004
6. 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** 64(7): 2418-2423. 2004
7. Komura D, Nakamura H, Tsutsumi S, Aburatani H, Ihara S. Multidimensional support vector machines for visualization of gene expression data. **Bioinformatics.** 2004 Dec 17; [Epub ahead of print]
8. Fukumoto S, Yamauchi N, Moriguchi H, Hippo Y, Watanabe A, Shibahara J, Taniguchi H, Ishikawa S, Ito H, Yamamoto S, Iwanari H, Hironaka M, Ishikawa Y, Niki T, Sohara Y, Kodama T, Nishimura M, Fukayama M, Dosaka-Akita H, Aburatani H. Over-expression of The Aldo-keto Reductase Family Protein AKR1B10 Is Highly Correlated with Smokers \pm Non-Small Cell Lung Carcinomas. **Clinical Cancer Research** 2005 in press
9. Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Ohki M, Aburatani H, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H. Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. **Carcinogenesis.** 25(8): 1495-505. 2004
10. Aburatani H. Discovery of a new biomarker for gastroenterological cancers. **J gastroenterol** in press
2. 学会発表
1. 第90回日本消化器病学会（仙台）4/22 International symposium “The front line of cancer therapy” Discovery of a new biomarker for gastroenterological cancers
2. 国公立大学病院医療技術関係職員研修（東京）5/21「DNAチップと病理診断」
3. がんのシステムバイオロジーミニシンポジウム（東京）5/27「Integrated genomics in cancer research」
4. 東京医科歯科大学大学院特別講義（東京）6/22「がんの統合的ゲノム解析」
5. 164委員会国際交流分科会（東京）6/25「Integrated genomics in cancer research」
6. 第14回難病治療研究会（東京）7/8「アレイを用いた機能ゲノム解析」
7. LSBM国際シンポジウム（東京）7/13 2nd International Symposium on New Frontiers of Systems Biology and Medicine 「Novel Biomarker discovery through cancer genomics」
8. 第11回箱根肝臓シンポジウム（箱根）7/22「肝発癌におけるゲノム変異の統合的解析」
9. マイクロアレイ研究会「次世代トランスクリプトーム解析」（東京）8/31「マイクロアレイ技術によるハイスループットバイオロジー」
10. 第55回日本皮膚科学会中部支部学術大会（金沢）9/12 特別講演「ゲノム研究は医療をどう変えるか」
11. BioJapan2004シンポジウム「ゲノム・プロテオーム解析の癌診療へのインパクト」（東京）9/28「ゲノム解析の癌研究への応用」
12. 日本癌学会ランチョンセミナー（福岡）9/30「Molecular Karyotyping: allelic gene dosage analysis」
13. 第11回群馬clinical Oncology Research勉強会（前橋）11/11「アレイ解析技術と癌研究」
14. 三菱化学ヘルスケアフォーラム（東京）11/13「癌の分子診断と治療への展開」
15. Gordon Research Conference -Cancer

Genetics and Epigenetics-, Ventula, 1/23-27 p53-associated histone modification.

16. 東京大学国際シンポジウム (東京) 2/18 Genomic Technology in Drug Development
17. 第13回広島大学・がんセミナー学術講演会 (広島) 3/1「アレイ解析によるhigh throughput biology」
18. 第7回 Tokyo Urological Research Conference (TURC) 東京、3/5「がんゲノム情報の網羅的解析」

1. 特願 2004-134008「肝癌治療後の再発予測判定薬」渡邊清高、大西真、油谷浩幸、緑川泰、筆宝義隆、岩成宏子、時田進、佐藤広一 2004.4.28
2. 特願 2004-260328「遺伝子コピーの解析方法及び装置」油谷浩幸、石川俊平、西村邦裕 2004.9.7
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

図1 培養上清中の GPC3 分子

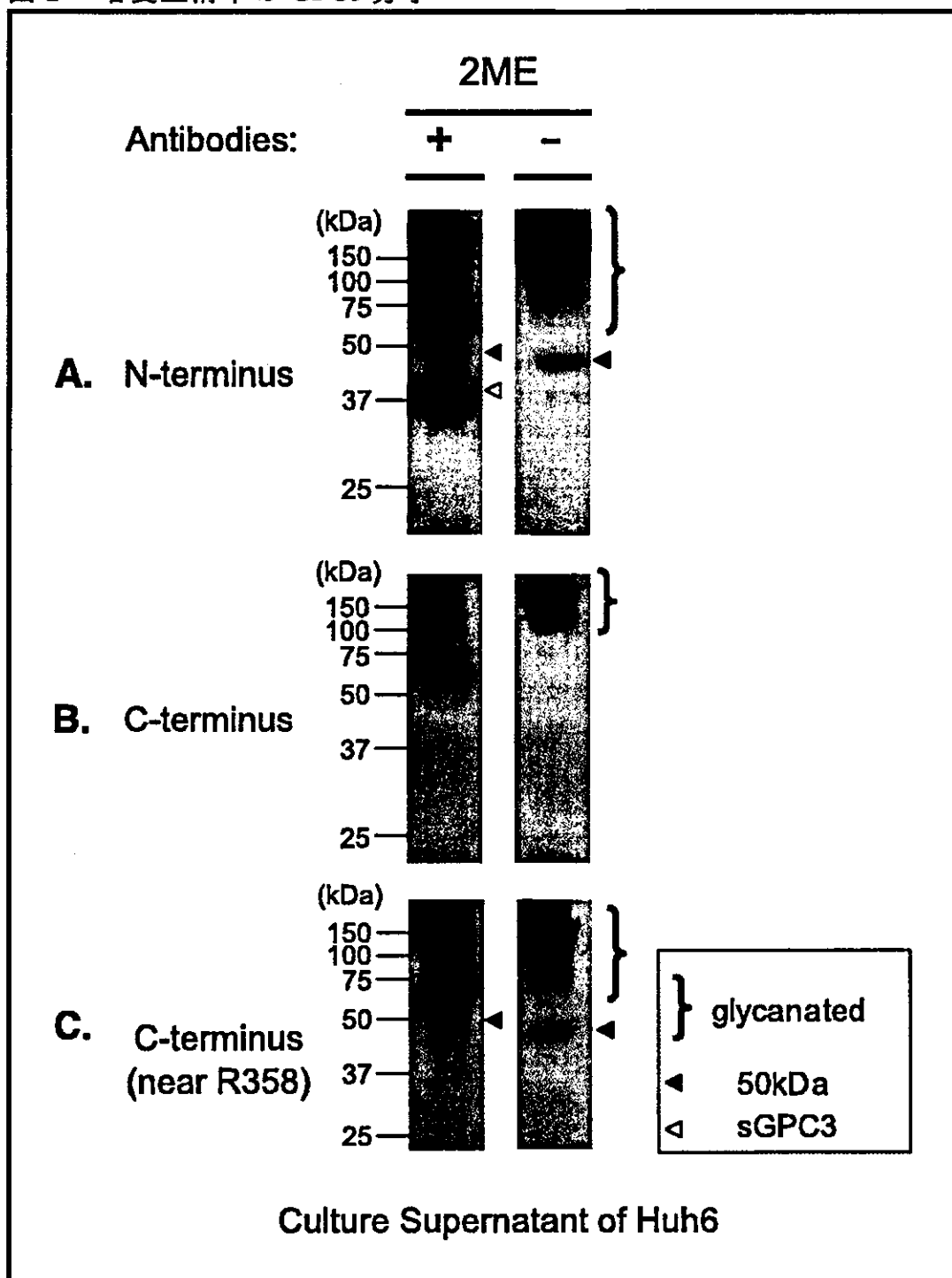


図2 GIMによるHCCの染色体変化領域

赤は増加、青はLOH、緑はUPD、茶色は増幅、グレーは変化なし、白は not informative をそれぞれ示す

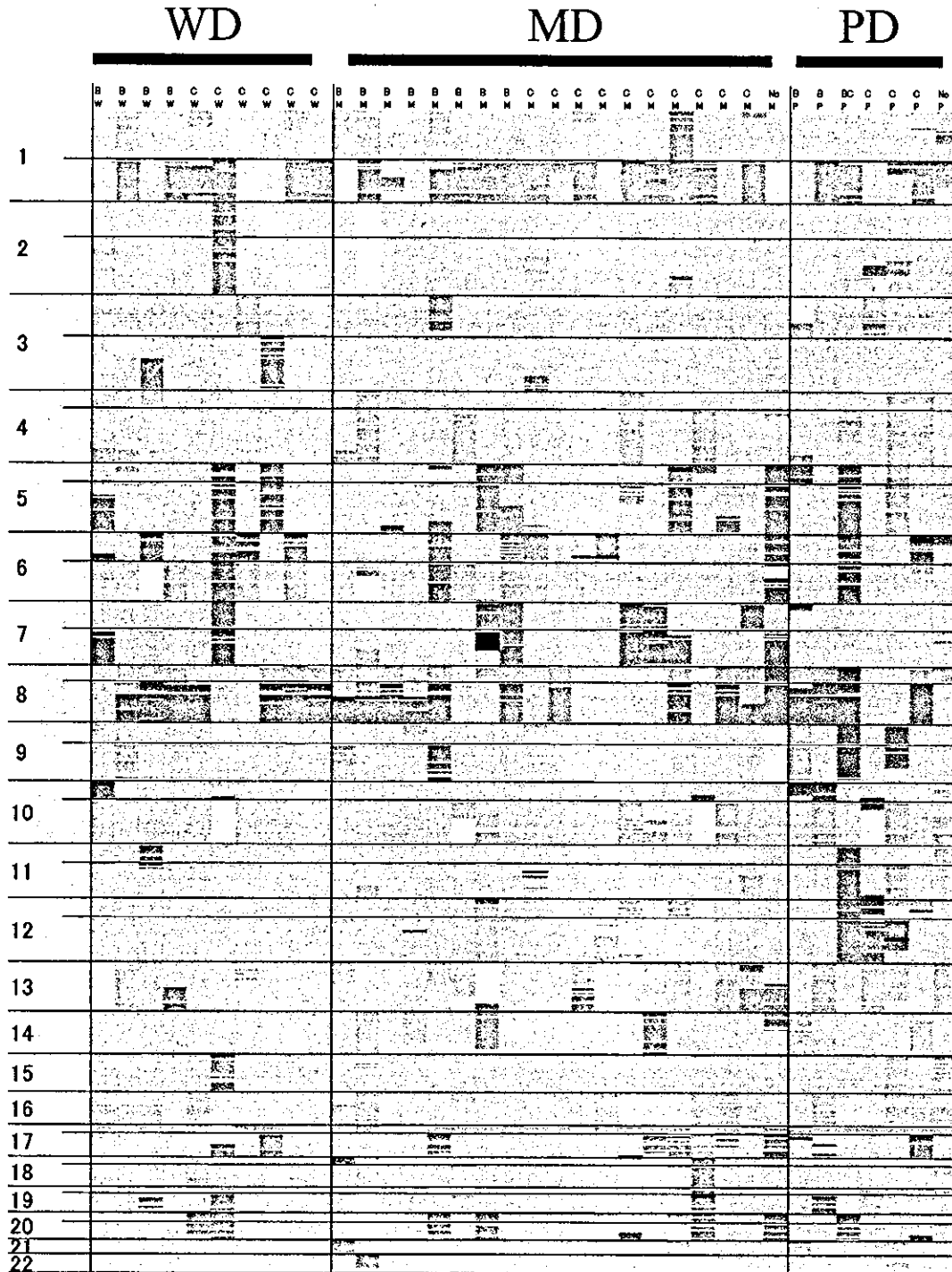
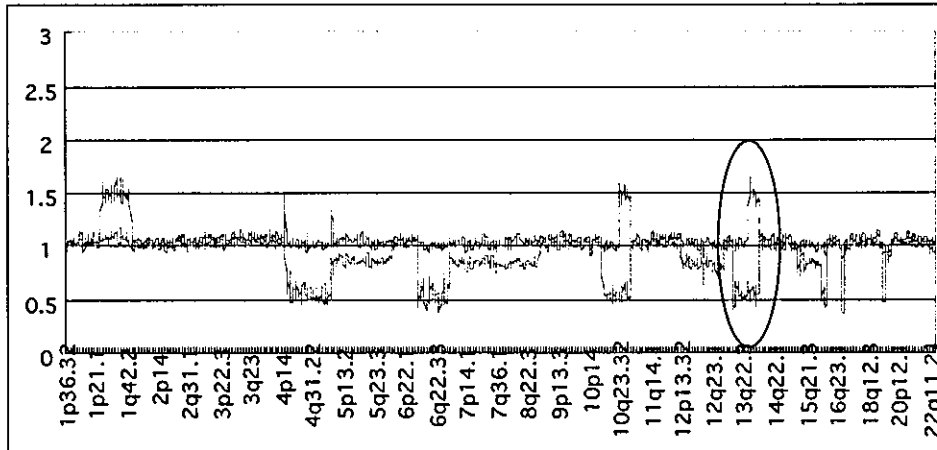


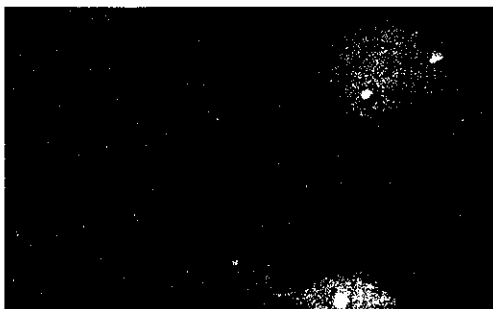
図3 UPDを含む症例の GIM

- A GIM
- B 癌部の UPD 領域における FISH 像
- C 癌部の UPD 領域における LOH

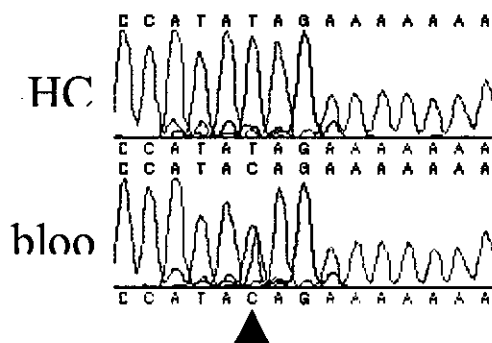
A



B



C



厚生科学研究費補助金（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

肝細胞癌において高発現される glypican3 (GPC3)に対するモノクローナル抗体が、胃癌の中で予後の悪い型である Hepatoid adenocarcinoma を認識するマーカーとして有用であるか、組織マイクロアレイを用いて検討した。GPC3 に対する抗体は、AFP に対する抗体に比べ染色性が強く、より広い範囲で陽性を示した。GPC3 は予後の悪い hepatoid 胃癌を鋭敏に認識する有用なマーカーと考えられる。

A.研究目的

肝癌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)の高発現が見出された。グリピカンファミリーは、膜表面に結合しているヘパラン硫酸プロテオグリカンである。哺乳類では現在までに GPC1～GPC6 が同定され、成長と形態発生に重要な役割をもつ。一方、GPC3 は腫瘍の進展に関与することが報告されるようになり、卵巣腫瘍、胃癌では正常組織より発現低下がみられる。GPC3 に対してモノクローナル抗体を作成して免疫組織学的に検討すると、抗体が肝細胞癌を特異的に認識することが明らかになった。GPC3 は肝細胞癌の新たな組織診断マーカーと期待されるが、実際の肝細胞癌症例、あるいは肝細胞癌に類似した性格を示す腫瘍の診断に対して応用できるか否かを検討する必要がある。

胃癌の中には通常肝細胞癌で上昇する AFP が上昇し、形態的にも肝細胞癌に類似するものがあり、肝臓様腺癌 Hepatoid adenocarcinoma, AFP 産生胃癌などと呼ばれている。

AFP 産生胃癌は胃癌全体の 1.85-15%に発生する稀なものであるが、脈管侵襲、胃壁深層への浸潤や肝転移が多く予後不良である。

今回作成した GPC3 に対するモノクローナ

ル抗体が、胃原発の hepatoid adenocarcinoma の認識に有用であるか否か、他のマーカーとも比較して検証した。

B.研究方法

東大病院病理部の過去の胃癌ファイルから無作為に 116 例の症例を選択し、組織マイクロアレイを作成した。組織マイクロアレイは各症例のパラフィンブロックから直径 2mm のシリンダーを 2 ヶ所ずつくりぬき、1 ブロックあたり 24 例、48 個所の検体を集めて新たな組織ブロックを作成したものである。これにより効率よく癌細胞における蛋白の発現が検討できる。一方、過去の胃癌症例から、AFP を産生している hepatoid adenocarcinoma 例、10 症例を選び、浸潤の強い代表的な 1 個所を免疫組織学的に検索した。

組織マイクロアレイ、hepatoid adenocarcinoma 例ブロックを 4 μ の厚さに薄切し、GPC3（研究代表者の油谷らが作成した C 末抗体, A1836A）、AFP、抗 hepatocyte 抗原（Dako 社）、PIVKA-II(Eisai 社)に対する抗体を用いて染色した。GPC3 の染色に際してはオートクレーブ処理を前処置として行った。

（倫理面への配慮）

東京大学医学部附属病院で手術する際に検