

体を研究に用いること、組織マイクロアレイを作成することは東京大学医学部の倫理委員会の承認を得ており、患者に対してはインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

胃癌組織アレイにおける検索では(表1), 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(図1)。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。Hepatocyte抗原は正常胃粘膜表層にも発現しており、胃癌においては必ずしも肝細胞への示すものではないと考えられる。

一方、AFPを産生するHepatoid adenocarcinomaでは(表2), 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。また6例ではHepatocyte抗原、PIVKA-IIの発現もみられた。

D. 考察

GPC3に対する抗体は、組織マイクロアレイにおける1例と別シリーズの10例の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すことから、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。これまで組織像の上ではhepatoidな形態を示すのに、血中のAFPの上昇が軽い例が見られたが、今後血中GPC3の測定が可能となれば、予後の悪い例をより鋭敏に知る良い指標になると思われる。

E. 結論

GPC3に対するモノクローナル抗体を用い

て胃癌例を対象にした免疫組織化学的検討により、GPC3が予後の悪いhepatoid adenocarcinomaを鋭敏に認識する良いマーカーになり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) Yamauchi N, et al. The Glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Modern Pathology in press*
- 2) Sakurai S, Hasegawa T, Sakuma Y, Takazawa Y, Motegi A, Nakajima T, Saito K, Fukayama M, Shimoda T. Myxoid epithelioid gastrointestinal stromal tumor (GIST) with mast cell infiltrations: a subtype of GIST with mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene. *Hum Pathol*, 35:1223-30, 2004
- 3) Goto A, Niki T, Terado Y, Fukushima J, Fukayama M. Prevalence of CD99 protein expression in pancreatic endocrine tumours (PETs). *Histopathology*. 45:384-92, 2004
- 4) Goto A, Niki T, Moriyama S, Funata N, Moriyama H, Nishimura Y, Tsuchida R, Kato JY, Fukayama M. Immunohistochemical study of Skp2 and Jab1, two key molecules in the degradation of P27, in lung adenocarcinoma. *Pathol Int*, 54:675-81, 2004
- 5) Sakuma K, Chong JM, Sudo M, Ushiku T, Inoue Y, Shibahara J, Uozaki H, Nagai H, Fukayama M. High-density methylation of p14ARF and p16INK4A in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer*, 112:273-8, 2004
- 6) Koshiishi N, Chong JM, Fukasawa T, Ikeno R, Hayashi Y, Funata N, Nagai H, Miyaki M, Matsumoto Y, Fukayama M. p300 gene alterations in intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. *Gastric Cancer*. 2004;7(2):85-90.
- 7) Shibahara J, Todo T, Morita A, Mori H, Aoki S, Fukayama M. Papillary neuroepithelial tumor

- of the pineal region. A case report. *Acta Neuropathol (Berl)*. 108:337-40, 2004
- 8) Ishikawa S, Uozumi N, Shiibashi T, Izumi T, Fukayama M, Shimizu T, Watanabe J, Nogami S. Short report: Lethal malaria in cytosolic phospholipase A2- and phospholipase A2IIA-deficient mice. *Am J Trop Med Hyg*, 70:645-50, 2004
- 9) Shibahara J, Goto A, Niki T, Tanaka M, Nakajima J, Fukayama M. Primary pulmonary paraganglioma: report of a functioning case with immunohistochemical and ultrastructural study. *Am J Surg Pathol*, 28:825-9, 2004
- 10) Dobashi Y, Goto A, Fukayama M, Abe A, Ooi A. Overexpression of cdk4/cyclin D1, a possible mediator of apoptosis and an indicator of prognosis in human primary lung carcinoma. *Int J Cancer*, 110:532-41, 2004
- 11) Uemura K, Nakajima M, Yamauchi N, Fukayama M, Yoshida K. Sudden death of a patient with primary hypereosinophilia, colon tumours, and pulmonary emboli. *J Clin Pathol*, 57:541-3, 2004
- 12) 金子順一, 菅原寧彦, 新谷隆, 松井郁一, 赤松延久, 岸庸二, 竹村信行, 佐野圭二, 今村宏, 國土典宏, 幕内雅敏, 元井亨, 深山正久. C型肝炎肝硬変に対する生体肝移植後, 約1年6ヵ月で肝硬変に至り, 再移植を施行した1例. 今日の新移植 17:829-830, 2004

総説

- 1) Fukayama M, Hishima T, Fujii T, Zettl A, Shimosato Y: Squamous cell carcinoma. In *Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Travis T, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC (eds), IARC press, Lyon, 2004, p172-174
- 2) 宇於崎宏, 牛久哲男, 深山正久: EBウイルスと発癌の病理. 「H. pylori 発癌のエビデンス」(菅野健太郎, 榊信廣編), 医学書院, 東京 2004, p208-213
- 3) 松原大祐, 後藤明輝, 深山正久. 犬糸状虫. 日本胸部臨床 63 巻増刊:S227-S229, 2004
- 4) 後藤明輝, 深山正久. じん肺における肺癌合併のメカニズム. 最新医学 59:1114-1118, 2004
- 5) 大田泰徳, 深山正久: 膿胸関連リンパ腫. 呼吸器科 5:164-168, 2004

2. 学会発表

- 1) 山口剛(東京大学), 依田憲治, 西松寛明, 栗本重陽, 久米春喜, 高橋悟, 富田京一, 鈴木誠, 武内巧, 太田信隆, 本間之夫, 北村唯一, 深山正久, 杉本雅幸: 骨肉腫成分を伴う sarcomatoid 腎癌の1例. 泌尿器外科 (0914-6180)17 巻 12 号 Page1293(2004.12)
- 2) 後藤明輝, 仁木利郎, 石川雄一, 船田信顕, 深山正久: 肺腺癌における芳香族炭化水素受容体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)の発現と P53 異常との関連性. 肺癌(0386-9628)44 巻 5 号 Page613(2004.10)
- 3) 李治平, 後藤明輝, 仁木利郎, 福元伸一, 油谷浩幸, 深山正久: IPF(特発性肺線維症)患者における扁平上皮細胞癌及び扁平上皮化生外傷における AKR1B10 発現. 肺癌(0386-9628)44 巻 5 号 Page454(2004.10)
- 4) 稲村健太郎, 松井啓夫, 平松美也子, 佐藤之俊, 奥村栄, 中川健, 堀池篤, 大柳文義, 西尾誠人, 宝来威, 深山正久, 石川雄一: 肺扁平上皮癌の cDNA マイクロアレイ解析. 肺癌 (0386-9628)44 巻 5 号 Page444(2004.10)
- 5) 大橋健一, 菊地芳直, 深山正久, 油谷浩幸: 頭頸部原発扁平上皮癌における Aldo-keto reductase family protein AKR1B10 の発現. 日本癌学会, 福岡, 2004 年 9 月 29 - 10 月 1 日 (学会誌 95 巻 Suppl. 371)
- 6) 福元伸一, 山内直子, 森口尚史, 筆宝義隆, 渡辺亮, 谷口浩和, 石川俊平, 岩成宏子, 西村正治, 深山正久, 秋田弘俊, 油谷浩幸: 肺癌における AKR1B10 の発現亢進. 日本癌学会, 福岡, 2004 年 9 月 29 - 10

- of the pineal region. A case report. *Acta Neuropathol (Berl)*. 108:337-40, 2004
- 8) Ishikawa S, Uozumi N, Shiibashi T, Izumi T, Fukayama M, Shimizu T, Watanabe J, Nogami S. Short report: Lethal malaria in cytosolic phospholipase A2- and phospholipase A2IIA-deficient mice. *Am J Trop Med Hyg*, 70:645-50, 2004
 - 9) Shibahara J, Goto A, Niki T, Tanaka M, Nakajima J, Fukayama M. Primary pulmonary paraganglioma: report of a functioning case with immunohistochemical and ultrastructural study. *Am J Surg Pathol*, 28:825-9, 2004
 - 10) Dobashi Y, Goto A, Fukayama M, Abe A, Ooi A. Overexpression of cdk4/cyclin D1, a possible mediator of apoptosis and an indicator of prognosis in human primary lung carcinoma. *Int J Cancer*, 110:532-41, 2004
 - 11) Uemura K, Nakajima M, Yamauchi N, Fukayama M, Yoshida K. Sudden death of a patient with primary hypereosinophilia, colon tumours, and pulmonary emboli. *J Clin Pathol*, 57:541-3, 2004
 - 12) 金子順一, 菅原寧彦, 新谷隆, 松井郁一, 赤松延久, 岸庸二, 竹村信行, 佐野圭二, 今村宏, 國土典宏, 幕内雅敏, 元井亨, 深山正久. C 型肝炎肝硬変に対する生体肝移植後, 約 1 年 6 ヶ月で肝硬変に至り, 再移植を施行した 1 例. *今日の移植* 17:829-830, 2004

総説

- 1) Fukayama M, Hishima T, Fujii T, Zettl A, Shimosato Y: Squamous cell carcinoma. In *Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Travis T, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC (eds), IARC press, Lyon, 2004, p172-174
- 2) 宇於崎宏, 牛久哲男, 深山正久: EB ウイルスと発癌の病理. 「H. pylori 発癌のエビデンス」(菅野健太郎, 榊信廣編), 医学書院, 東京 2004, p208-213
- 3) 松原大祐, 後藤明輝, 深山正久. 犬糸状虫. *日本胸部臨床* 63 巻増刊:S227-S229, 2004
- 4) 後藤明輝, 深山正久. じん肺における肺癌合併のメカニズム. *最新医学* 59:1114-1118, 2004
- 5) 大田泰徳, 深山正久: 膿胸関連リンパ腫. *呼吸器科* 5:164-168, 2004

2. 学会発表

- 1) 山口剛(東京大学), 依田憲治, 西松寛明, 栗本重陽, 久米春喜, 高橋悟, 富田京一, 鈴木誠, 武内巧, 太田信隆, 本間之夫, 北村唯一, 深山正久, 杉本雅幸: 骨肉腫成分を伴う sarcomatoid 腎癌の 1 例. *泌尿器外科* (0914-6180)17 巻 12 号 Page1293(2004.12)
- 2) 後藤明輝, 仁木利郎, 石川雄一, 船田信頭, 深山正久: 肺腺癌における芳香族炭化水素受容体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)の発現と P53 異常との関連性. *肺癌*(0386-9628)44 巻 5 号 Page613(2004.10)
- 3) 李治平, 後藤明輝, 仁木利郎, 福元伸一, 油谷浩幸, 深山正久: IPF(特発性肺線維症)患者における扁平上皮細胞癌及び扁平上皮化生外傷における AKR1B10 発現. *肺癌*(0386-9628)44 巻 5 号 Page454(2004.10)
- 4) 稲村健太郎, 松井啓夫, 平松美也子, 佐藤之俊, 奥村栄, 中川健, 堀池篤, 大柳文義, 西尾誠人, 宝来威, 深山正久, 石川雄一: 肺扁平上皮癌の cDNA マイクロアレイ解析. *肺癌* (0386-9628)44 巻 5 号 Page444(2004.10)
- 5) 大橋健一, 菊地芳直, 深山正久, 油谷浩幸: 頭頸部原発扁平上皮癌における Aldoketo reductase family protein AKR1B10 の発現. *日本癌学会*, 福岡, 2004 年 9 月 29 - 10 月 1 日 (学会誌 95 巻 Suppl. 371)
- 6) 福元伸一, 山内直子, 森口尚史, 筆宝義隆, 渡辺亮, 谷口浩和, 石川俊平, 岩成宏子, 西村正治, 深山正久, 秋田弘俊, 油谷浩幸: 肺癌における AKR1B10 の発現亢進. *日本癌学会*, 福岡, 2004 年 9 月 29 - 10

- 日 (日本病理学会会誌 93(1), 306)
- 21) 宇於崎宏, 井上揚子, 鄭子文, 須藤誠, 牛久哲男, 深山正久: EBV 感染胃癌細胞株の interleukin 1 β 発現と増殖刺激の検討. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004 年 6 月 9 - 11 日 (日本病理学会会誌 93(1), 301)
- 22) 菱沼美千代, 山内直子, 大橋健一, 深山正久, 油谷浩幸: 胃癌における glypican-3 の発現. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004 年 6 月 9 - 11 日 (日本病理学会会誌 93(1), 262)
- 23) 土橋洋, 後藤明輝, 深山正久, 鈴木潮人, 大井章史: 肺癌における Cyclin D1/Cdk4 によるアポトーシス誘導と RB の関与. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004 年 6 月 9 - 11 日 (日本病理学会会誌 93(1), 246)
- 24) 元井亨, 石田剛, 河戸亜弥子, 白田勝利, 川上明子, 小林希, 園部宏, 大橋健一, 深山正久: cDNA マクロアレイによる新規肉腫診断法の開発と EWS 関連腫瘍への応用. 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004 年 6 月 9 - 11 日 (日本病理学会会誌 93(1), 190)
- 25) 野崎浩二(東京大学医学部附属病院 消化管外科), 久保田啓介, 清水伸幸, 比企直樹, 山口浩和, 下山省二, 真船健一, 黒坂判造, 上西紀夫, 深山正久: 4 年間経過を観察した胃 MALT リンパ腫の 1 例. Progress of Digestive Endoscopy(消化器内視鏡の進歩)(0389-9403)65 巻 1 号 Page95(2004.06)
- 26) 鹿毛秀宣, 幸山正, 永田泰自, 大石展也, 滝沢始, 長瀬隆英, 正田絵里子, 本倉徹, 仁木利郎, 深山正久: 同種末梢血幹細胞移植 1 ヶ月後にびまん性汎細気管支炎様の所見を呈した 1 例. 日本内科学会関東地方会 523 回演題要旨 Page32(2004.12)
- 27) 榎奥健一郎(東京大学 アレルギーリウマチ内科), 鈴川真穂, 沢田哲治, 久保かなえ, 駒形嘉紀, 三崎義堅, 鄭子文, 深山正久, 山本一彦: Angiocentric immunoproliferative lesion(AIL)と考えられる肺野多発結節性陰影を呈した SLE. 日本内科学会関東地方会 516 回演題要旨 Page27(2004.03)
- 28) 明城正博(東京大学 呼吸器内科), 岡崎仁, 滝沢始, 長瀬隆英, 関尚美, 野中泰延, 辻省次, 中島淳, 後藤明輝, 深山正久: 傍腫瘍性小脳変性症を主体とする神経症状で発症した小細胞肺癌の 1 例. 日本内科学会関東地方会 516 回演題要旨 Page19(2004.03)
- 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
なし

表 1 Summary of the GPC3, AFP, Hepatocyte and PIVKA-II positive cases in the tissue microarray.

Case number	Age	Gender	Diameter of the tumor	Diagnosis	Depth	ly	v	n	GPC3	AFP	PIVKA-II	Hepatocyte
2	89	M	3.5	por	serosa	+	+	+	-	-	-	+
14	66	M	7.5	por	serosa	+	+	+	-	-	-	+
15	80	F	8.2	por	serosa	+	+	+	-	-	+-	++
18	49	F	3	por	serosa	-	-	-	++	-	-	-
24	68	M	5.5	por	serosa	+	+	-	+	-	-	++
26	70	M	3.2	por	serosa	-	+	-	-	-	+	-
33	77	M	9	por	serosa	+	+	+	-	-	-	++
43	83	M	12.5	muc	serosa	+	+	+	-	-	-	++
57	59	M	3.3	mod	serosa	+	-	+	+	-	-	-
58	75	M	5.4	mod	serosa	+	+	+	-	-	-	+
59	70	M	5	mod	serosa	-	+	-	-	-	-	++
60	68	M	3	mod	muscularis propria	-	+	+	-	-	-	++
70	82	M	3	well	serosa	+	+	-	-	-	++	++
71	85	F	5.5	well	serosa	+	+	+	-	-	+	-
73	59	M	3	well	serosa	+	+	+	-	-	-	+
74	64	M	8	mod	serosa	+	+	+	-	-	-	+
79	76	M	3.5	mod	serosa	+	+	+	-	-	-	+
85	80	F	0.8	mod	mucosa	-	-	-	-	-	-	+
86	72	F	9	mod	submucosa	+	-	+	-	-	-	++
88	83	F	2	por	submucosa	+	+	-	++	++	-	-
89	71	F	5.5	mod	submucosa	+	+	+	-	-	+	-
90	84	M	0.5	por	mucosa	-	-	-	-	-	-	++
96	73	M	0.6	well	mucosa	-	-	-	-	-	-	+
99	69	F	1.6	mod	mucosa	-	-	-	-	-	-	+
109	67	F	4	well	mucosa	-	-	-	-	-	-	++
110	82	F	4.5	well	submucosa	+	-	-	-	-	-	++
111	60	M	2.3	mod	mucosa	-	-	-	-	-	-	++
112	75	F	5	well	mucosa	-	-	-	-	-	-	++
114	62	M	2	well	submucosa	-	-	-	-	-	-	+
116	67	F	3.5	mod	submucosa	+	-	-	-	-	+	+
117	47	M	1.5	mod	mucosa	-	-	-	-	-	-	++
119	83	M	3.5	well	muscularis propria	-	-	-	-	-	-	+

por, poorly differentiated adenocarcinoma;

mod, moderately differentiated adenocarcinoma;

ly, lymphoduct invasion;

v, venous invasion;

n, lymph node metastasis

表 2

Results of the immunohistochemical studies in relation to the clinical and pathological features of AFP-producing gastric cancers(10 cases).

Clinical and Pathological features of the AFP-producing gastric cancer used for immunohistochemical study										Immunohistochemical studies			
Case number	Age	Gender	Diameter of the tumor	Histological type	Invasion depth	Invasion			Preoperative serum AFP level(ng/ml)	GPC3	AFP	Hepatocyte	PIVKA-II
						ly	v	n					
241	58	Male	3.9	por	serosa	-	+	-	no data	+	+	++	-
242	76	Male	5	por	serosa	+	+	+	no data	++	+	-	-
243	73	Male	7	por	serosa	+	+	+	*1,631	+	-	-	-
**										++	+	-	++
244	71	Male	9	well	serosa	+	+	+	1,000	+	+	-	-
245	62	Male	10	mod	serosa	+	+	+	no data	+	+	+	-
246	61	Male	14	por	serosa	+	+	+	130,000	++	++	+	++
247	68	Female	8.5	por	serosa	-	+	+	201	+	+	+	+
248	73	Male	10.5	pap	serosa	+	+	+	18	+	+	+	+
249	60	Male	4	mod	serosa	-	+	+	no data	+	+	-	-
250	62	Male	7.6	mod	serosa	+	+	+	no data	++	+	-	-

* serum PIVKA- II level 18666AU/ml, ** Tissue from liver metastasis of case 243.

por, poorly differentiated adenocarcinoma; well, well differentiated adenocarcinoma; mod, moderately differentiated adenocarcinoma; ly, lymphoduct invasion; v, venous invasion; n, lymphnode metastasis.

図 1 写真説明

- a 胃癌アレイ hepatoid adenocarcinoma 例, GPC3 染色、弱拡大像
- b. 胃癌アレイ hepatoid adenocarcinoma 例, AFP 染色、弱拡大像
- c, d. 髄様構造を示す低分化腺癌。各々 e, g 部分に対応(HE)。同一例。もとの胃癌切片では典型的 hepatoid adenocarcinoma の像も認められた。
- e. a において四角で囲んだ e 部分の拡大。GPC3 染色。低分化腺癌部分に陽性を示した。
- f. a において四角で囲んだ f 部分の拡大。GPC3 染色。中分化腺癌部分にも陽性を示した。
- g. b において四角で囲んだ g 部分の拡大。AFP 染色。低分化腺癌部分に陽性を示した。
- h. b において四角で囲んだ h 部分の拡大。AFP 染色。中分化腺癌部分は陰性であった。

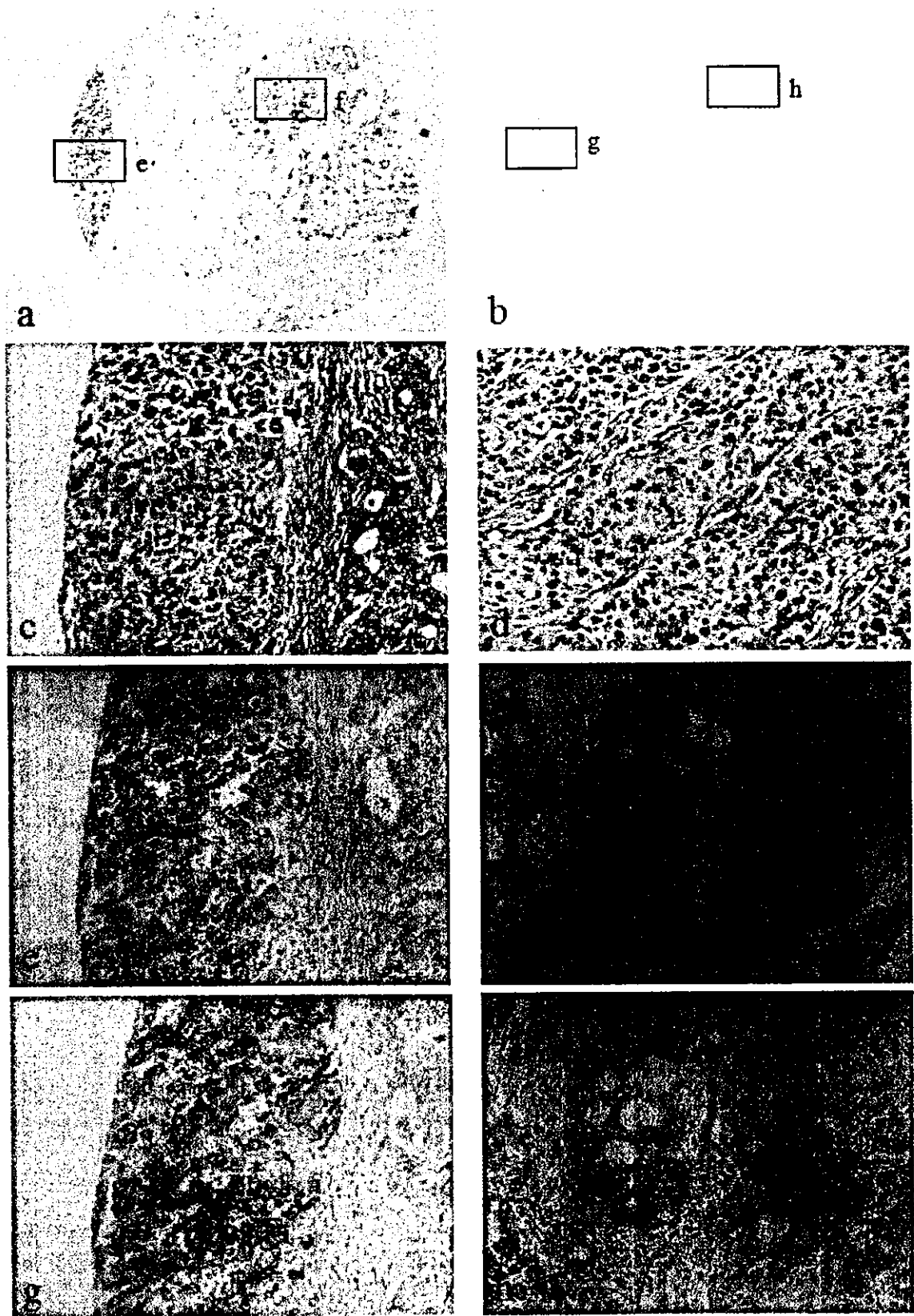


图 1

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

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

我々はこれまでに肝細胞癌の手術症例より種々の臨床情報を付帯した肝癌凍結検体の収集を行い、これらを用いた DNA チップの解析により肝細胞癌の進展に寄与する遺伝子群の同定や新規腫瘍マーカー候補遺伝子 GPC3 の ELISA 測定系の確立、実用化が可能であることを昨年度までに確認している。本年度は包括的遺伝子解析結果に染色体位置情報を加えることにより、肝発癌および肝癌の進行で発現が変化する遺伝子群が集中して存在する染色体領域を同定し、過去に広く行われている遺伝子発現クラスタリングは遺伝子群の染色体への偏在に強く影響を受けることを確認した。

A.研究目的

本邦における肝癌はウイルス性肝炎罹患後の慢性肝疾患をベースに発症し、早期肝癌から脱分化を繰り返して進行肝癌へと多段階に進展してゆく。これらの各段階における遺伝子変化をゲノムワイドに観察するには、従来から行われている Comparative Genomic Hybridization (以下 CGH) が有用な方法であるが、データの精度の低さや転写レベルでの変化が不明であるため、責任遺伝子の絞込みが不十分であった。そこで、CGH のもつこれらの欠点を補うべく、遺伝子発現プロファイリングデータに染色体位置情報をリンクさせ、より高い精度で肝癌進展に寄与する染色体領域、および遺伝子群を同定することを本研究の目的とした。

B.研究方法

肝炎、肝硬変、肝癌、その他の癌患者の組織収集

31 例の肝細胞癌（高分化型肝癌 10 例、中分化型肝癌 13 例、低分化型肝癌 8 例）、19 例の非癌部肝硬変、8 例の正常肝組織（大腸癌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。

Expression Imbalance Map (EIM)による肝細胞癌遺伝子発現解析

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になった。当研究室で開発したこの解析法は Expression Imbalance Map (以下 EIM)と命名され、本研究における肝細胞癌のマイクロアレイ解析データの解析に用いられている。

(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

EIM による発現強度の変化を伴う染色体領域の同定

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。特に1q, 2q, 12q, 17q, 20qの発現増加および4q, 16pの低下は高分化型肝癌では発現の変化が認められず、これらの領域の発現変化は肝癌の進展に、また8qの発現増加と9p, 17pでの低下はすでに高分化型肝癌の状態から認められ、肝発癌に参与している可能性が示唆された。また、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(図1)。

ゲノム量と発現強度の比較

1q21-23についてDNAをテンプレートとして定量的PCRをおこなったところ、この領域では高分化型肝癌ではゲノム量の変化がなかったのに対し、中および低分化型肝癌ではゲノム量が有意に増加しており、DNAとRNAのレベルでゲノム量と発現量が一致することが示された。

肝発癌・進展における候補遺伝子

1q21-23領域における肝発癌・進展の責任遺伝子としてCCT3, HAX1, SHC1, CKS1Bが挙げられた(図2)。これらの遺伝子はいずれも発現強度の増強が認められている。

D. 考察

本研究におけるEIMの結果は過去の肝細胞癌に関するCGHの論文とデータが相関し、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レベルでの染色体の増減を強く反映され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発現の変化が染色体上の

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参与し、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、肝発癌に参与している可能性が示唆された。

E. 結論

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

1. Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M. Advances in surgical therapy for hepatocellular carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2004; 31: 2110-3.
2. Li X, Hui AM, Sun L, Hasegawa K, Torzilli G, Minagawa M, Takayama T, Makuuchi M. p16INK4A hypermethylation is associated with hepatitis virus infection, age, and gender in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 7484-9.
3. 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 Res.* 2004; 64: 7263-70.
4. Torzilli G, Gambetti A, Del Fabbro D, Leoni P, Olivari N, Donadon M, Montorsi M, Makuuchi M. Techniques for hepatectomies without blood transfusion, focusing on interpretation of postoperative anemia. *Arch Surg.* 2004; 139: 1061-5.
 5. Torzilli G, Del Fabbro D, Olivari N, Calliada F, Montorsi M, Makuuchi M. Contrast-enhanced ultrasonography during liver surgery. *Br J Surg.* 2004; 91: 1165-7.
 6. Minagawa M, Makuuchi M, Takayama T, Kokudo N. Surgical approach to liver metastasis with hepatic hilar invasion. *Hepatogastroenterology.* 2004; 51: 1467-9.
 7. Minagawa M, Makuuchi M, Kubota K, Kondo Y. Intraoperative three-dimensional visualization of liver vasculature by ultrasonography. *Hepatogastroenterology.* 2004; 51: 1448-50.
 8. Chiappa AC, Makuuchi M, Zbar AP, Biella F, Vezzoni A, Torzilli G, Andreoni B. Protective effect of methylprednisolone and of intermittent hepatic pedicle clamping during liver vascular inflow occlusion in the rat. *Hepatogastroenterology.* 2004; 51: 1439-44.
 9. Sondenaar K, Kubota K, Sano K, Takayama T, Makuuchi M. Successful reconstruction of segmental or subsegmental bile ducts after resection of hilar bile ducts: short- and long-term results. *Hepatogastroenterology.* 2004; 51: 1278-81.
 10. Yuan LW, Tang W, Kokudo N, Sugawara Y, Karako H, Hasegawa K, Aoki T, Kyoden Y, Deli G, Li YG, Makuuchi M. Measurement of des-gamma-carboxy prothrombin levels in cancer and non-cancer tissue in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2004; 12: 269-73.
 11. Aoki T, Imamura H, Hasegawa K, Matsukura A, Sano K, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Sequential preoperative arterial and portal venous embolizations in patients with hepatocellular carcinoma. *Arch Surg.* 2004; 139: 766-74.
 12. Miyoshi H, Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K. Methylation status of suppressor of cytokine signaling-1 gene in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2004; 39: 563-9.
 13. Hasegawa K, Imamura H, Akahane M, Miura Y, Kiryu S, Ohtomo K, Makuuchi M. Administration of iodized oil resulted in impaired liver function due to enhanced portosystemic shunting. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2004; 27: 282-4.
 14. Kokudo N, Imamura H, Sugawara Y, Sakamoto Y, Yamamoto J, Seki M, Makuuchi M. Surgery for multiple hepatic colorectal metastases. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2004; 11: 84-91.
 15. Imamura H, Seyama Y, Kokudo N, Aoki T, Sano K, Minagawa M, Sugawara Y, Makuuchi M. Single and multiple resections of multiple hepatic metastases of colorectal origin. *Surgery.* 2004; 135: 508-17.
 16. Sakamoto Y, Yamamoto J, Kosuge T, Sugawara Y, Seki M, Kokudo N, Azekura K, Yamaguchi T, Muto T, Makuuchi M. Extended left hepatectomy by severing all major hepatic veins with reconstruction of the right hepatic vein. *Surg Today.* 2004; 34: 482-4.
 17. Kusaka K, Imamura H, Tomiya T, Makuuchi M. Factors affecting liver regeneration after right portal vein embolization. *Hepatogastroenterology.* 2004; 51: 532-5.
 18. Kokudo N, Makuuchi M. Current role of portal vein embolization/hepatic artery chemoembolization. *Surg Clin North Am.* 2004; 84: 643-57.
 19. 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 NH2-terminal fragment of glypican-3

- as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2004; 64: 2418-23.
20. Sakamoto Y, Yamamoto J, Saiura A, Koga R, Kokudo N, Kosuge T, Yamaguchi T, Muto T, Makuuchi M. Reconstruction of hepatic or portal veins by use of newly customized great saphenous vein grafts. *Langenbecks Arch Surg.* 2004; 389: 110-3.
 21. Aoki T, Sugawara Y, Imamura H, Seyama Y, Minagawa M, Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M. Hepatic resection with reconstruction of the inferior vena cava or hepatic venous confluence for metastatic liver tumor from colorectal cancer. *J Am Coll Surg.* 2004; 198: 366-72.
 22. Torzilli G, Olivari N, Moroni E, Del Fabbro D, Gambetti A, Leoni P, Montorsi M, Makuuchi M. Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography in surgery for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Liver Transpl.* 2004; 10: S34-8.
 23. Torzilli G, Olivari N, Del Fabbro D, Leoni P, Gendarini A, Palmisano A, Montorsi M, Makuuchi M. Indication and contraindication for hepatic resection for liver tumors without fine-needle biopsy: validation and extension of an Eastern approach in a Western community hospital. *Liver Transpl.* 2004; 10: S30-3.
 24. Inoue K, Takayama T, Higaki T, Watanabe Y, Makuuchi M. Clinical significance of early hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl.* 2004; 10: S16-9.
 25. Torzilli G, Belghiti J, Makuuchi M. Differences and similarities in the approach to hepatocellular carcinoma between Eastern and Western institutions. *Liver Transpl.* 2004; 10: S1-2.
 26. Sakamoto Y, Yamamoto J, Kokudo N, Seki M, Kosuge T, Yamaguchi T, Muto T, Makuuchi M. Bloodless liver resection using the monopolar floating ball plus ligasure diathermy: preliminary results of 16 liver resections. *World J Surg.* 2004; 28: 166-72.
2. 学会発表
1. 「原発性および転移性肝癌の外科治療」 第 33 回神奈川県消化器外科研究会 2004.4.7 横浜
 2. 「PTPE のエビデンスについて」 第 16 回日本肝胆膵外科学会 2004.5.13 大阪
 3. 「他科に学ぶ診断と治療法「肝細胞における集学的治療法と外科の役割」」 第 16 回日本肝胆膵外科学会 2004.5.13 大阪
 4. 「転移性肝癌の外科治療」 第 2 回東京外科学臨床研究会フォーラム 2004. 6.19 東京
 5. 「肝細胞癌のステージングシステムの確立とその評価」 第 8 回日本肝臓学会大会 2004.10.23 福岡
 6. “Liver Hanging Maneuver During LDH” 6th IHPBA World Congress Washington,USA 2004.6.5
 7. “Malignant neoplasia of the biliary tract-cholangiocarcinoma, state of the art in surgical treatment” 1st International Meeting of Digestive Surgery Rocchetta tonaro, Italy, 2004.10.2
 8. “Causes of a continuing problem and its management” 14th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists Zwrich,2004.9.10-11
 9. “Non Colorectal Liver Metastasis” 14th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists Zwrich,2004.9.10-11
 10. “Hepato Resection for Colorectal Liver Metastasis:Is there any limitation in number of nodules and synchronous livar mets?” 14th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists Zwrich,2004.9.10-11
 11. “New Frontiers in the Diagnosis and Management of GI Disease” 12th International Postgraduate Course 12th International Postgraduate Course Athens,2004.12.3-4
 12. “Impact of IOUS in Liver Surgery and Transplantation” 12th International Postgraduate Course Athens,2004.12.3-4
 13. “Surgical Treatment of Bile Duct

Stricture Tollowing Laparoscopic
Cholecystectomy” 19th WC-ISDS
Yokohama,japan,2004.12.9-10

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

なし

☒ 1

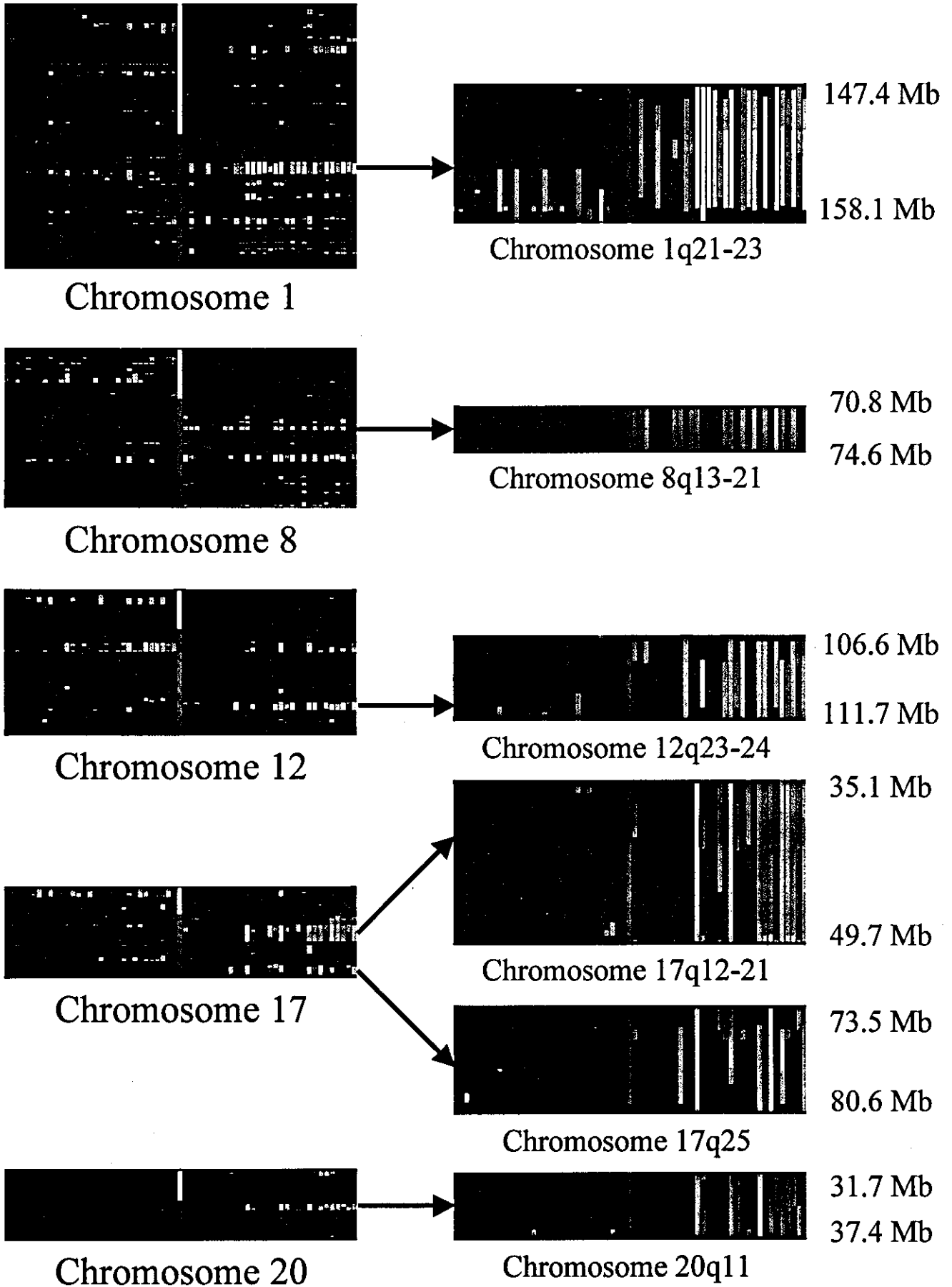


図1 (続き)

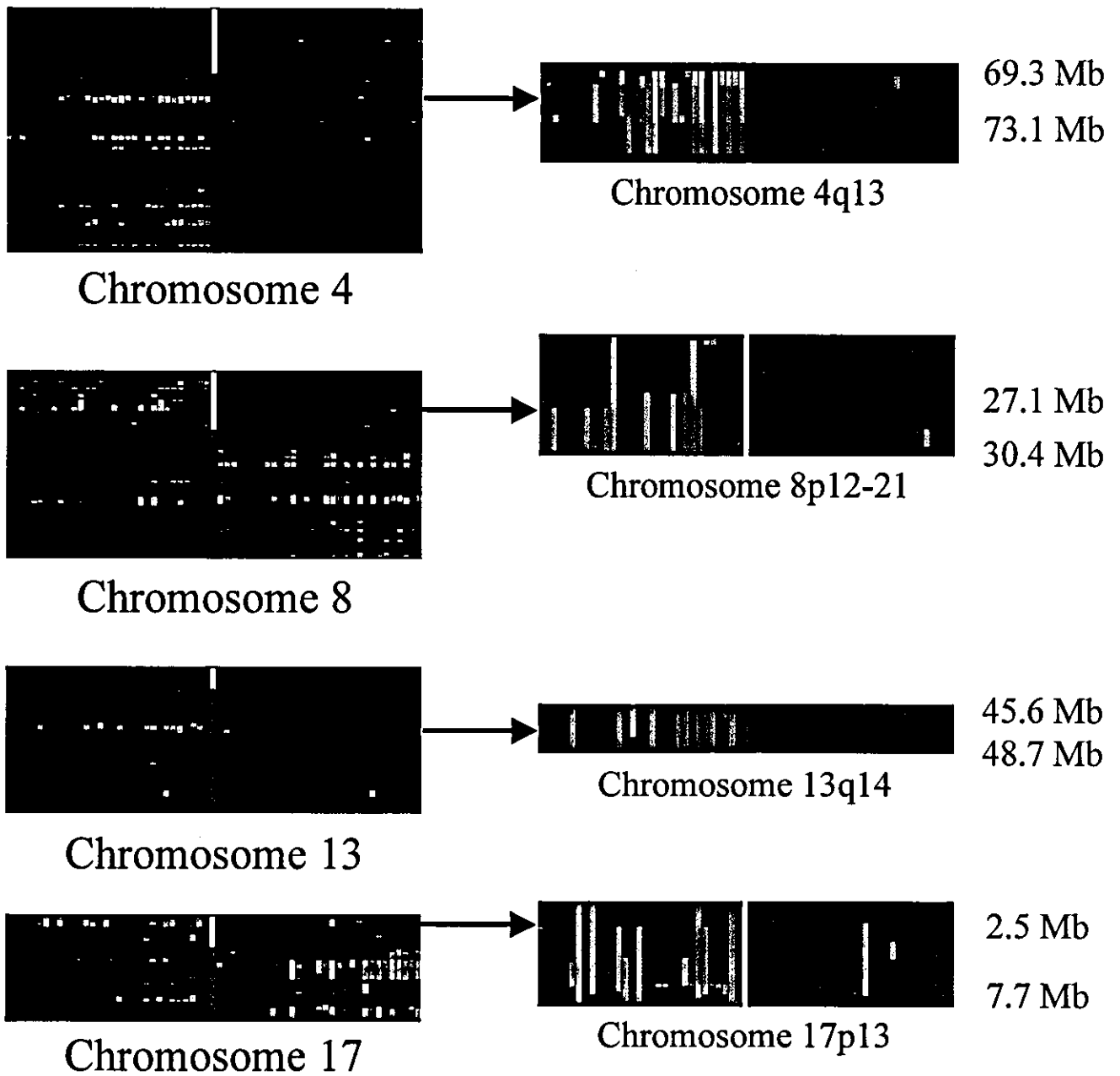
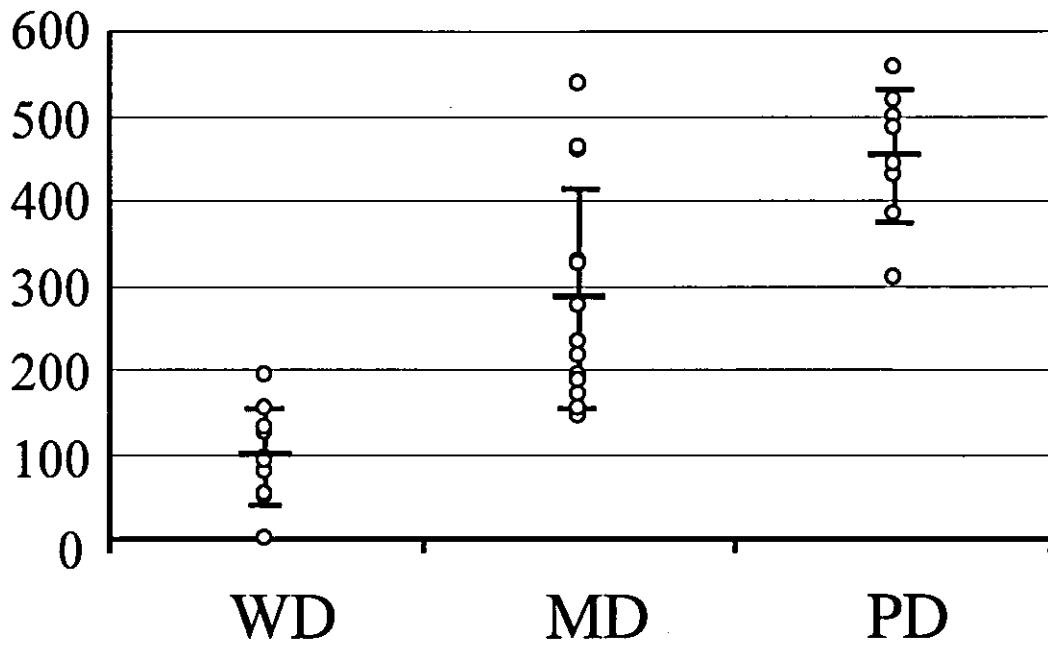


図 2



厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究費研究事業）
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、マイクロアレイの多数のプロープ情報から、文献情報を活用し相互作用ネットワークを構築する文献情報処理と、ヒト正常臓器は40種、17種のヒト正常培養細胞および23種の癌細胞株のデータを収集し、公開しているトランスクリプトームデータベースとを有機的に使える情報処理基盤の構築をすすめた。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。

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ものが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。

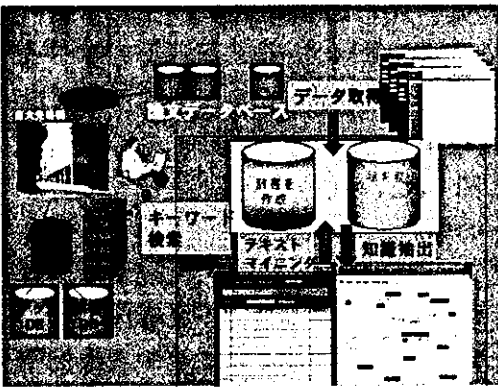


図1 文献情報検索を多用した遺伝子および蛋白質の相互作用探索システムの概要

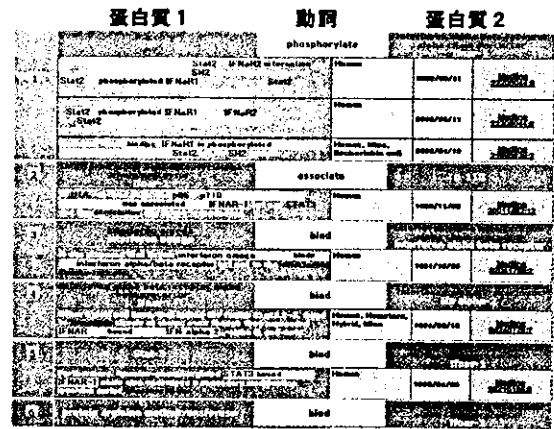


図2 文献情報検索を多用した遺伝子および蛋白質の相互作用探索システムの出力結果、2対相互作用

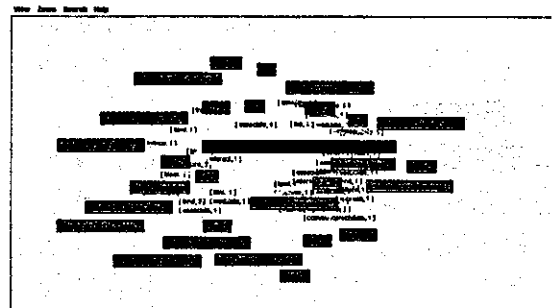


図3 文献情報検索を多用した遺伝子および蛋白質の相互作用探索システムの多数の相互作用パスウェイ表示

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をりん酸化し、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9つのファミリー分子が知られており、中でも転写活性化因子 IRF1 と転写抑制因子 IRF2 は最初に同定され、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。また、IRF 3は、リン酸化されると IFN β の転写を活性化する。開発したシステムで IRF1 について検索したとき、NO synthase や GBP などが検索可能である。

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。

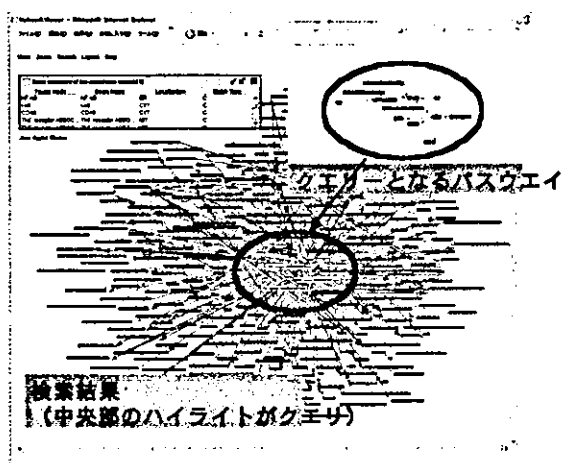


図4 多数の蛋白質からなる大規模なパスウェイからの特定パスウェイの同定

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る用い、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。これによって知識統合型の肝炎に適用するため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) D. Komura, H. Nakamura, S. Tsutsumi, H. Aburatani and S. Ihara, "Multidimensional Support Vector Machines for visualization of gene expression data" **Proceedings of 2004 ACM Symposium on Applied Computing**, Nicosia, Cyprus, 175-179 (2004).
- (2) 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).
- (3) 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).
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