

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14～16年度

総合研究報告書

主任研究者 油谷浩幸

平成17(2005)年3月

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 総合研究報告書

主任研究者 油 谷 浩 幸

平成 17 (2005) 年 3 月

目 次

I 総合研究報告書

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	1
--	---

東京大学国際・産学共同研究センター教授 油谷浩幸

II 研究成果の刊行に関する一覧表	29
-------------------	----

III 研究成果の刊行物・別刷	41
-----------------	----

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）
総合研究報告書

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。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、他臓器の発現パターンとも比較した上で、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、FGF2、BMP、Wnt などのモルフォージェネシグナルを調節する。その全長分子以外に 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 C 末端側の異なる部位で切断を受けた分子種の存在も確認された。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。GPC3 は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、Expression Imbalance Map 法により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 genome Imbalance Map を用いて Uniparental disomy (UPD) を含めた染色体変異を同定可能なことから、新たな肝癌関連遺伝子の探索が期待される。

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

A. 研究目的

遺伝子発現プロファイルのみならず、発癌関連遺伝子の変異、ヘテロ接合性の消失 (LOH, loss of heterozygosity) や染色体変異、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。

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

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た。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

上記の 49 検体については U95A アレイ (Affymetrix) を用いて 12000 遺伝子の発現プロファイル解析を行った。

さらに網羅的解析を進めるために U133 アレイ (Affymetrix) 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

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。16 年度には 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。主成分分析やクラスタ解析は定法によった。

血清中 GPC3 分子の解析

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。

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。

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。

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。

ELISA を用いた患者血清測定

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。

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。また、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。すなわち、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。有意に発現の異なる領域については、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。

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ピング解析は含まないが、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。

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)YCSYCQ (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 の間で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。

血清中 GPC3 の解析

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。イムノブロッティングではコア蛋白 (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ティ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。

一方、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。

肝癌、肝硬変、健常者での血清 sGPC3 測定

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。

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。

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 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。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

肝細胞癌に高発現する遺伝子については機能解析を進めている。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。

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 2002 年に世界

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。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、今後のさらなる研究が望まれる。

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)。

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。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。

Expression Imbalance Map法を肝細胞癌の臨床検体の解析に適用した結果、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。本研究におけるEIM解析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ある点が従来の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比べて肝癌において発現値が増加しており、肝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。多数のモノクローナル抗体を作成し 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。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

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

2002 年

- 1) Aburatani H. Understanding cancer through gene expression profiling. (review) **International Congress Series 1246: 261-270, 2002**
- 2) Yabuuchi H, Takayanagi S, Yoshinaga K, Taniguchi N, Aburatani H, Ishikawa T. ABC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver. **Biochem Biophys Res Commun. 299(3): 410-7. 2002**
- 3) Fujiwara Y, Yokoyama M, Umeda-Sawada R, Seyama Y, Ishii M, Tsutsumi S,

- Aburatani H, Hanaka S, Itakura H, Matsumoto A. Influence of polyunsaturated fatty acid on gene expression in HepG2 cells. **J Atheroscler Thromb**, 9(3): 157-162 2002
- 4) Chong JM, Sakuma K, Sudo M, Osawa T, Ohara E, Uozaki H, Shibahara J, Kuroiwa K, Tominaga SI, Hippo Y, Aburatani H, Funata N, Fukayama M. Interleukin-1beta Expression in Human Gastric Carcinoma with Epstein-Barr Virus Infection. **J Virol**. 76(13):6825-6831. 2002
- 5) Midorikawa Y, Tsutsumi S, Taniguchi H, Ishii M, Kobune Y, Kodama T, Makuuchi M, Aburatani H. Identification of genes associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma with expression profiling analysis. **Jpn J Cancer Res**. 93(6): 636-43 2002
- 6) Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T, Aburatani H. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. **Cancer Res**. 62(1): 233-240, 2002
- 7) Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Ezaki O. Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPARalpha activation and ROS production. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 282(2):G338-48. 2002
- 8) Kanno T, Endo H, Takeuchi K, Morishita Y, Fukayama M, Mori S. High expression of methionine aminopeptidase type 2 in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. **Lab Invest**, 82:893-901, 2002
- 9) Kakiuchi C, Ishida T, Sato H, Katano H, Ishiko T, Mukai H, Kogi M, Kasuga N, Takeuchi K, Yamane K, Fukayama M, Mori S. Secretion of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor by spindle cell sarcoma complicating Castleman's disease (so-called 'vascular neoplasia'). **J Pathol**, 197:264-71, 2002
- 10) Ishiguro N, Baba T, Ishida T, Takeuchi K, Osaki M, Araki N, Okada E, Takahashi S, Saito M, Watanabe M, Nakada C, Tsukamoto Y, Sato K, Ito K, Fukayama M, Mori S, Ito H, Moriyama M. Carp, a cardiac ankyrin-repeated protein, and its new homologue, Arpp, are differentially expressed in heart, skeletal muscle, and rhabdomyosarcomas. **Am J Pathol**, 160:1767-78, 2002
- 11) Niki T, Kohno T, Iba S, Moriya Y, Takahashi Y, Saito M, Maeshima A, Yamada T, Matsuno Y, Fukayama M, Yokota J, Hirohashi S. Frequent Co-Localization of Cox-2 and Laminin-5 gamma2 Chain at the Invasive Front of Early-Stage Lung Adenocarcinomas. **Am J Pathol**, 160:1129-41, 2002
- 12) Kobayashi T, Sugawara Y, Shi YZ, Makuuchi M. Telomerase expression and p53 status in hepatocellular carcinoma. **Am J Gastroenterol**. 2002; 97: 3166-71.
- 13) Ohkubo T, Imamura H, Sugawara Y, Takayama T, Makuuchi M. Successful pancreatic duct-to-jejunum anastomosis in a patient with a double pancreatic duct: usefulness of intraoperative ultrasonography (IOUS) and IOUS-guided pancreatography. **Hepatogastroenterology**. 2002; 49: 1724-5.
- 14) Hasegawa K, Kubota K, Mori M, Midorikawa Y, Takayama T, Makuuchi M. Hepatocellular carcinoma originating from intramural cells in the bile duct. **Hepatogastroenterology**. 2002; 49: 1688-

- 91.
- 15) Natori T, Sata M, Washida M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2002; 297: 1058-61.
 - 16) Li X, Hui AM, Shi YZ, Sun L, Takayama T, Makuuchi M. Deregulation of G1/S transition is a common event in carcinoma of the ampulla of Vater. **Hepatogastroenterology.** 2002; 49: 1239-44.
 - 17) Midorikawa Y, Ishikawa T, Kubota K, Mori M, Takayama T, Makuuchi M. Development of well-differentiated hepatocellular carcinoma in large adenomatous hyperplasia after long-term follow-up: a case report. **Hepatogastroenterology.** 2002; 49: 1098-101.
 - 18) Kokudo N, Miki Y, Sugai S, Yanagisawa A, Kato Y, Sakamoto Y, Yamamoto J, Yamaguchi T, Muto T, Makuuchi M. Genetic and histological assessment of surgical margins in resected liver metastases from colorectal carcinoma: minimum surgical margins for successful resection. **Arch Surg.** 2002; 137: 833-40.
 - 19) Kobayashi T, Sugawara Y, Ohkubo T, Imamura H, Makuuchi M. Effects of amrinone on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. **J Hepatol.** 2002; 37: 31-8.
 - 20) Torzilli G, Makuuchi M, Ferrero A, Takayama T, Hui AM, Abe H, Inoue K, Nakahara K. Accuracy of the preoperative determination of tumor markers in the differentiation of liver mass lesions in surgical patients. **Hepatogastroenterology.** 2002; 49: 740-5.
 - 21) Seyama Y, Makuuchi M, Sano K, Kaneko J, Takayama T. Intermittent total vascular exclusion in removing caudate lobe tumor with tumor thrombus in the vena cava. **Surgery.** 2002; 131: 574-6.
 - 22) Kanda T, Yokosuka O, Fujiwara K, Saisho H, Shiga H, Oda S, Okuda K, Sugawara Y, Makuuchi M, Hirasawa H. Fulminant hepatic failure associated with triazolam. **Dig Dis Sci.** 2002; 47: 1111-4.
 - 23) Takayama T, Makuuchi M. Prevention of hepatocellular carcinoma recurrence: actuality and perspectives. **Hepatogastroenterology.** 2002; 49: 87-90.
 - 24) Makuuchi M, Belghiti J, Torzilli G. Reasons for an exchange between eastern and western approach to patients with HCC. **Hepatogastroenterology.** 2002; 49: 5-6.
 - 25) Makuuchi M. Remodeling the surgical approach to hepatocellular carcinoma. **Hepatogastroenterology.** 2002; 49: 36-40.
 - 26) Torzilli G, Makuuchi M, Inoue K. The vascular control in liver resection: revisitation of a controversial issue. **Hepatogastroenterology.** 2002; 49: 28-31.
 - 27) Torzilli G, Leoni P, Gendarini A, Calliada F, Olivari N, Makuuchi M. Ultrasound-guided liver resections for hepatocellular carcinoma. **Hepatogastroenterology.** 2002; 49: 21-7.
 - 28) Ijichi M, Takayama T, Matsumura M, Shiratori Y, Omata M, Makuuchi M. alpha-Fetoprotein mRNA in the circulation as a predictor of postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study. **Hepatology.** 2002; 35: 853-60.
 - 29) Sugawara Y, Yamamoto J, Higashi H, Yamasaki S, Shimada K, Kosuge T, Takayama T, Makuuchi M. Preoperative

portal embolization in patients with hepatocellular carcinoma. **World J Surg.** 2002; 26: 105-10.

- 30) Sakamoto Y, Tanaka N, Nagai M, Nobori M, Otani T, Makuuchi M. Anterior segmentectomy of the pancreatic head for islet cell tumors. **Pancreas.** 2002; 24: 317-9.
- 31) Hasegawa K, Takayama T, Orii R, Sano K, Sugawara Y, Imamura H, Kubota K, Makuuchi M. Effect of hypoventilation on bleeding during hepatic resection: a randomized controlled trial. **Arch Surg.** 2002; 137: 311-5.
- 32) Makuuchi M, Imamura H, Sugawara Y, Takayama T. Progress in surgical treatment of hepatocellular carcinoma. **Oncology.** 2002; 62: 74-81.
- 33) Maema A, Hashimoto D, Yokoya S, Shoji M, Makuuchi M. Spatially selective laser coagulation of the gastric wall: a new methodology. **J Surg Res.** 2002; 103: 114-20.
- 34) Ohkubo T, Sugawara Y, Sasaki K, Maruyama K, Ohkura N, Makuuchi M. Early induction of nerve growth factor-induced genes after liver resection-reperfusion injury. **J Hepatol.** 2002; 36: 210-7.
- 35) Kubota K, Takayama T, Sano K, Hasegawa K, Aoki T, Sugawara Y, Makuuchi M. Small bile duct reconstruction of the caudate lobe in living-related liver transplantation. **Ann Surg.** 2002; 235: 174-7.
- 36) Hui AM, Shi YZ, Li X, Sun L, Guido T, Takayama T, Makuuchi M. Proliferative marker Ki-67 in gallbladder carcinomas: high expression level predicts early recurrence after surgical resection. **Cancer Lett.** 2002; 176: 191-8.
- 1) 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) Ge X, Tsustumi S, Aburatani H, Iwata S. Reducing false positives in molecular pattern recognition. **Genome Informatics** 14:34-43, 2003
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

2003 年

- 7) 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
- 8) Matsui Y, Saiura A, Sugawara Y, Sata M, Naruse K, Yagita H, Kohro T, Mataka C, Izumi A, Yamaguchi T, Minami T, Sakihama T, Ihara S, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T, Makuuchi M. Identification of gene expression profile in tolerizing murine cardiac allograft by costimulatory blockade. **Physiol Genomics**. 15(3):199-208, 2003
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) Kokudo N, Vera DR, Makuuchi M. Clinical application of TcGSA. **Nucl Med Biol** 2003; 30: 845-9.
- 14) Noritomi T, Sugawara Y, Kaneko J, Matsui Y, Makuuchi M. Refractory acute rejection in a living related liver transplantation. **Hepatogastroenterology** 2003; 50: 2192-3.
- 15) Natori T, Sata M, Washida M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. Nicotine enhances neovascularization and promotes tumor growth. **Mol Cells** 2003; 16: 143-6.
- 16) Imamura H, Seyama Y, Kokudo N, Maema A, Sugawara Y, Sano K, Takayama T, Makuuchi M. One thousand fifty-six hepatectomies without mortality in 8 years. **Arch Surg** 2003; 138: 1198-206.
- 17) Imamura H, Sano K, Harihara Y, Noie T, Hasegawa K, Minagawa M, Takayama T, Makuuchi M. Complete remission of disease for 5 years following initial and repeat resection of the liver for the removal of 22 metastases of colorectal origin. **J Hepatobiliary Pancreat Surg** 2003; 10: 321-4.
- 18) Minagawa M, Makuuchi M. [Surgical treatment of colorectal liver metastasis] **Nippon Geka Gakkai Zasshi** 2003; 104: 721-9.
- 19) Minagawa M, Makuuchi M, Takayama T, Kokudo N. Selection criteria for repeat hepatectomy in patients with recurrent hepatocellular carcinoma. **Ann Surg** 2003; 238: 703-10.
- 20) Ijichi H, Kawabe T, Isayama H, Yamagata M, Imai Y, Tada M, Komatsu Y, Shiratori Y, Omata M, Tanaka K, Midorikawa Y, Kubota K, Makuuchi M. "Duodenal intussusception" due to adenoma of the papilla of Vater. **Hepatogastroenterology**

- 2003; 50: 1399-402.
- 21) Guo L, Fujino M, Kimura H, Funeshima N, Kitazawa Y, Harihara Y, Tezuka K, Makuuchi M, Suzuki S, Li XK. Simultaneous blockade of co-stimulatory signals, CD28 and ICOS, induced a stable tolerance in rat heart transplantation. **Transpl Immunol** 2003; 12: 41-8.
 - 22) Seyama Y, Sakamoto Y, Sano K, Noie T, Motoi T, Takayama T, Makuuchi M. Anatomical Segmentectomy of the Pancreas Head: Can this Procedure be Curatively Applied for Intraductal Papillary Mucinous Tumors? **Pancreas** 2003; 27: 270-2.
 - 23) Sano K, Takayama T, Murakami K, Saiki I, Makuuchi M. Overexpression of retinoic acid receptor alpha in hepatocellular carcinoma. **Clin Cancer Res** 2003; 9: 3679-83.
 - 24) Sakamoto Y, Yamamoto J, Takahashi H, Kokudo N, Yamaguchi T, Muto T, Makuuchi M. Segmental resection of the third portion of the duodenum for a gastrointestinal stromal tumor: a case report. **Jpn J Clin Oncol** 2003; 33: 364-6.
 - 25) 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** 2003; 10: 26-30.
 - 26) Yano Y, Yamamoto J, Kosuge T, Sakamoto Y, Yamasaki S, Shimada K, Ojima H, Sakamoto M, Takayama T, Makuuchi M. Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: a clinicopathologic study of 26 resected cases. **Jpn J Clin Oncol** 2003; 33: 283-7.
 - 27) Guo Q, Tang W, Mafune K, Yu J, Liao X, Li M, Wang X, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. An in vitro evaluation of radiation effects of different fractionated regimens by absolute cell count beads. **Oncol Rep** 2003; 10: 1405-10.
 - 28) Yamashita H, Otani T, Shioiri T, Takayama T, Kakiuchi C, Todani T, Makuuchi M. Smallest Todani's type II choledochal cyst. **Dig Liver Dis** 2003; 35: 498-502.
 - 29) Kokudo N, Makuuchi M, Natori T, Sakamoto Y, Yamamoto J, Seki M, Noie T, Sugawara Y, Imamura H, Asahara S, Ikari T. Strategies for surgical treatment of gallbladder carcinoma based on information available before resection. **Arch Surg** 2003; 138: 741-50.
 - 30) 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** 2003; 39: 1552-61.
 - 31) Kobayashi T, Imamura H, Takayama T, Makuuchi M. The role of preoperative phenylalanine breath test in hepatectomy. **Hepatogastroenterology** 2003; 50: 1124-7.
 - 32) Seyama Y, Kubota K, Sano K, Noie T, Takayama T, Kosuge T, Makuuchi M. Long-term outcome of extended hemihepatectomy for hilar bile duct cancer with no mortality and high survival rate. **Ann Surg** 2003; 238: 73-83.
 - 33) Kogure K, Sakurai T, Tsuzuki Y, Ishizaki M, Nemoto M, Fukusato T, Kuwano H, Makuuchi M. Long-term survival after hepatectomy for large metastatic breast

- cancer: a case report. **Hepatogastroenterology** 2003; 50: 827-9.
- 34) Aoki T, Kubota K, Oka T, Hasegawa K, Hirai I, Makuuchi M. Follicular cholangitis: another cause of benign biliary stricture. **Hepatogastroenterology** 2003; 50: 639-42.
- 35) Seyama Y, Kubota K, Sano K, Endo D, Otani T, Takayama T, Makuuchi M. Intraoperative direct pancreatography using ultrasound-guided puncture for accessory duct sphincteroplasty in a patient with pancreas divisum. **Pancreas** 2003; 27: 98-100.
- 36) Yamazaki S, Miki K, Hasegawa K, Sata M, Takayama T, Makuuchi M. Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. **J Hepatol** 2003; 39: 17-23.
- 37) Katayama A, Mafune K, Tanaka Y, Takubo K, Makuuchi M, Kaminishi M. Autopsy findings in patients after curative esophagectomy for esophageal carcinoma. **J Am Coll Surg** 2003; 196: 866-73.
- 38) Sakamoto Y, Ohyama S, Yamamoto J, Yamada K, Seki M, Ohta K, Kokudo N, Yamaguchi T, Muto T, Makuuchi M. Surgical resection of liver metastases of gastric cancer: an analysis of a 17-year experience with 22 patients. **Surgery** 2003; 133: 507-11.
- 39) Chiappa A, Makuuchi M, Zbar AP, Biella F, Bellomi M, Biffi R, Bertani E, Vezzoni A, Crosta C, Andreoni B. Effects of the free radical scavenger dimethyl sulphoxide on experimental normothermic ischaemia of the liver. **Dig Surg** 2003; 20: 238-45.
- 40) Hasegawa K, Kubota K, Midorikawa Y, Matsui Y, Mafune K, Takayama T, Makuuchi M. Extended right hepatectomy and total gastrectomy with double Roux-en-Y reconstruction for hilar bile duct and gastric carcinomas. **Hepatogastroenterology** 2003; 50: 374-6.
- 41) Torzilli G, Makuuchi M. Intraoperative ultrasonography in liver cancer. **Surg Oncol Clin N Am** 2003; 12: 91-103.
- 42) Hasegawa K, Imamura H, Akahane M, Miura Y, Takayama T, Ohtomo K, Makuuchi M. Endovascular stenting for celiac axis stenosis before pancreaticoduodenectomy. **Surgery** 2003; 133: 440-2.
- 43) 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** 2003; 22: 1051-6.
- 44) 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** 2003; 22: 969-75.
- 45) Abe H, Tanaka K, Sugiyama S, Katamoto T, Makuuchi M. CT findings of cystic duct carcinoma two years before obstructive jaundice. **Hepatogastroenterology** 2003; 50: 24-6.
- 46) Torzilli G, Makuuchi M. Tricks for ultrasound-guided resection of colorectal liver metastases. **Hepatogastroenterology** 2003; 50: 1-3.
- 47) Tang W, Mafune K, Nakata M, Konishi T, Kojima N, Mizuochi T, Makuuchi M. Association of histochemical expression of Maackia amurensis leucoagglutinin-

positive glycoconjugates with behaviour of human gastric cancer. **Histopathology**. 2003; 42: 239-45.

- 48) Aoki T, Imamura H, Sakamoto Y, Hasegawa K, Seyama Y, Kubota K, Makuuchi M. Bile duct of Luschka connecting with the cystohepatic duct: the importance of cholangiography during surgery. **AJR Am J Roentgenol** 2003; 180: 694-6.
- 49) Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa K, Miyagawa S, Sugawara Y, Minagawa M, Takayama T, Kawasaki S, Makuuchi M. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. **J Hepatol** 2003; 38: 200-7.
- 50) Seyama Y, Otani T, Matsukura A, Makuuchi M. The pH modulator chloroquine blocks trypsinogen activation peptide generation in cerulein-induced pancreatitis. **Pancreas** 2003; 26: 15-7.
- 4) 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
- 5) 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** 2004; 28: 21-29.
- 6) 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**. 64(20): 7263-70. 2004
- 7) 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 Res**. 64(7): 2418-2423. 2004
- 8) Komura D, Nakamura H, Tsutsumi S, Aburatani H, Ihara S. Multidimensional support vector machines for visualization of gene expression data. **Bioinformatics**. 21(4):439-44, 2004
- 9) Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Ohki M, Aburatani H, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H. Global gene expression

2004 年

- 1) 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
- 2) Maeda K, Murakami A, Takaoka T, Takamoto S, Sano K, Makuuchi M. Usefulness of Intraoperative Color Doppler Ultrasonography in Decision Making Regarding Conversion of an Accessory Hepatic Vein after a Fontan-Type Operation. **Pediatr Cardiol** 2004;25: 414-6
- 3) Torzilli G, Makuuchi M. Ultrasound-guided

- 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) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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*. 7(2):85-90, 2004.
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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. 今日の移植 17:829-830, 2004
- 21) 山口剛, 依田憲治, 西松寛明, 栗本重陽, 久米春喜, 高橋悟, 冨田京一, 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 卷 12 号 Page1293
- 22) 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 卷 5 号 Page613
- 23) 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 卷 5 号 Page454
- 24) 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 卷 5 号 Page444
- 25) 野崎浩二, 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 卷 1 号 Page95
- 26) Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M. Advances in surgical therapy for hepatocellular carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2004; 31: 2110-3.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) Minagawa M, Makuuchi M, Takayama T, Kokudo N. Surgical approach to liver metastasis with hepatic hilar invasion. *Hepatogastroenterology*. 2004; 51: 1467-9.
- 31) Minagawa M, Makuuchi M, Kubota K, Kondo Y. Intraoperative three-dimensional visualization of liver vasculature by ultrasonography. *Hepatogastroenterology*. 2004; 51: 1448-50.
- 32) 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.
- 33) Sondena 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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