

抑制を受ける miRNA を、図 2 に示すストラテジーに従い同定した。すなわち、TaqMan アッセイにより発現の評価が可能な miRNA から、ゲノム上近傍 (500 bp 以内) に CpG アイランドを持つ 39 種類 (ゲノム上 43 箇所) を選択し、さらに肝癌細胞株パネル (19 種類) において、正常肝に比較して高頻度に CpG アイランドの高度メチル化が COBRA 法で認められる 11 種類の miRNA を検出した。これら 11 種類の miRNA から、細胞株ならびに肝癌臨床検体において正常肝に比較して Taqman アッセイにより発現低下が認められ (図 3)、かつ発現低下が CpG アイランドのメチル化と相関する 2 種類の miRNA を同定した (論文投稿中)。

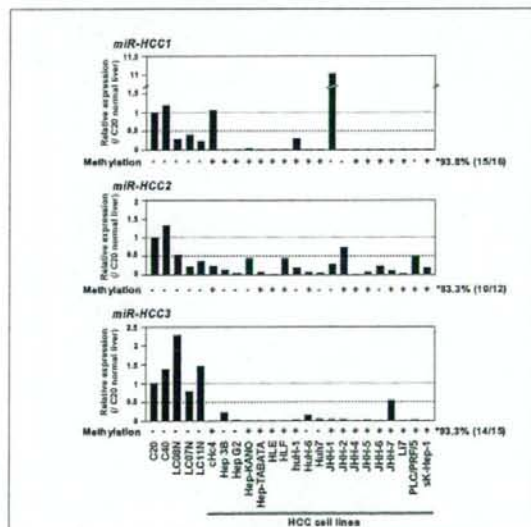


図 3. 肝癌細胞株における新規メチル化標的 miRNA 候補の発現解析例

#### D. 考察

図 1 に示した全体研究計画のもとで、肝癌細胞株ならびに臨床検体のゲノム・エピゲノム解析を行うことで、肝癌特異的

あるいは肝癌の悪性形質と関連するゲノムコピー数異常や DNA メチル化異常とその標的領域、miRNA が同定できることが証明された。これらの領域や遺伝子から、早期発見や病態と関連するマーカーが同定できる可能性がある。そのため、各領域における遺伝子の絞込みをさらに進めるとともに、各遺伝子の臨床病理学的意義や機能の解明、多数の遺伝子群の発現・コピー数異常・エピゲノム異常のパターンのマーカーとしての意義などの解析を引き続き推進している。特に、本課題における目標である、早期発見や病態と関連するマーカーとなりうる遺伝子・遺伝子群の同定ならびに検出方法の開発が、今後の課題である。

#### E. 結論

肝癌細胞株ならびに臨床検体のゲノム・エピゲノム解析を行うことで、肝癌特異的あるいは肝癌の悪性形質と関連するゲノムコピー数異常や DNA メチル化異常とその標的領域、miRNA を同定した。今後更に計画を進めることにより、早期発見や病態と関連するマーカーとなりうる遺伝子・遺伝子群の同定ならびに検出方法の開発を実現する。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

#### G. 研究発表

##### G1. 論文発表

1. Tanaka S, Arie S, Yasen M, Mogushi K, Su NT, Zhao C, Imoto I, Eishi Y,

Inazawa J, Miki Y, Tanaka H. Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy.

Br J Surg 2008;95(5):611-619.

G2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

H1. 特許取得

特になし。

H2. 実用新案登録

特になし。

H3. その他

特になし。

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発  
分担研究報告書

研究分担者 山本 雅一 東京女子医科大学 消化器外科 教授

研究要旨：肝癌の肉眼型診断は肝癌の悪性度診断に有用であり、単純結節型と単純結節周囲増殖型では肝癌の悪性度が異なり、治療方針が異なる。本研究では新しい造影剤を使用したMRIで早期肝癌をふくむ肝癌の肉眼型診断が可能か検討した。

#### A. 研究目的

肝細胞特異性造影剤(Gd-EOB)によるMRI検査で早期肝癌を含む肝細胞癌(HCC)の肉眼型診断が可能か検討した。

#### B. 研究方法

肝細胞癌と診断し、術前にGd-EOB造影MRIを施行した28例を対象とした。男性22例、平均年齢67歳。手術でえた摘出標本で肝細胞癌の肉眼型を診断し、肉眼型ごとにMRI所見検討した。Dynamic造影での腫瘍周囲のコロナとコロナ断裂の有無、また肝細胞相での腫瘍辺縁の突出の有無を検討した。本研究においては、事前に患者に対して十分なインフォームドコンセントを交わし、「ヘルシンキ宣言」、「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する指針」その他を遵守した。

#### C. 研究結果

切除標本の肉眼型は、小結節境界不明

瞭(SNIM)型4例、単純結節(SN)型9例、単純結節周囲増殖(SNEG)型12例、多結節癒合(CM)2例、浸潤型1例であった。SN型では、Dynamic造影でコロナは9例中8例に認め、コロナの断裂は2例(25%)であった。SNEG型では、コロナは12例全例に認め、コロナの断裂は8例(67%,  $p=0.17$ )であった。SN型では、肝細胞相で腫瘍辺縁の突出像は9例中2例(22%)であったが、SNEG型では12例中10例(83%,  $p=0.0092$ )であった。

#### D. 考察

肝癌の肉眼型診断は肝癌の悪性度診断に有用であり、単純結節型と単純結節周囲増殖型では肝癌の悪性度が異なる。また早期肝癌も小結節境界不明瞭型という肉眼的な特徴がある。本検討では、肉眼型でMRI所見に差があることが判明した。新しい造影剤を使用したMRIの新しい撮像タイミングである肝細胞相所見で、単純結節周囲増殖

型では単純結節型と比較し有意に腫瘍辺縁の突出像を認めた。

#### E. 結論

肝細胞特異性造影剤 (Gd-EOB) による MRI は肝癌の肉眼型診断に有用である。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 2. 学会発表

2009 年肝胆膵外科学会発表予定

#### H. 知的財産の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発  
分担研究報告書

研究分担者 飯島 尋子 兵庫医科大学 超音波センター・内科学肝胆膵科 教授

研究要旨：肝臓癌の **Super high risk** 群の設定を超音波を用いて実際の肝の障害度や硬度より推定する方法を検討した。造影超音波による肝実質と脾実質の輝度比や、**Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI)**による肝の硬度推定により、肝硬変の推定に有用であった。造影超音波による微細血管構築とクーパー相を組み合わせた分類により肝癌の分化度分類を推定できた。

A. 研究目的

肝の障害度や硬度より肝臓癌の **Super high risk** 群を推定する方法を検討する。また高悪性度肝癌を早期より推定する方法を造影超音波より確立する。

B. 研究方法

①造影超音波検査での肝実質(L)と脾実質(S)の輝度比(L/S比)やARFIの測定値を肝の障害度や線維化グレードと対比する。

②造影超音波検査による微細血管構築、クーパー相の所見を肝癌の分化度と対比し肝癌の悪性度推定を行う。

(倫理面への配慮)

倫理委員会で承認された(第621号)。これに基づき研究を開始した。

C. 研究結果

①L/S比は肝障害度の進行と共に低下傾向を認めた。ARFIは肝の線維化グレードと相関がみられた。

②新たな肝癌分化度分類では、中低分化肝癌を良好に層別化できた。

D. 考察

L/S比やARFIにより肝障害度の推定ができたが、今後は発癌症例との対比も必要と考えられる。

E. 結論

L/S比やARFIは肝障害度を推定するオプションとなりうる。新たな肝癌悪性度分類は中低分化肝癌の推定に有用であった。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sugimoto K, Moriyasu F, Kamiyama N, Yamada M, Iijima H. Correlation between parametric imaging using contrast ultrasound and the histological differentiation of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 2008;38:273-280.

Sugimoto K, Moriyasu F, Kamiyama N, Metoki R, Yamada M, Imai Y, Iijima H. Analysis of morphological vascular changes of hepatocellular carcinoma by micro flow imaging using contrast-enhanced sonography. *Hepatol Res*, 2008;38:790-799.

Kudo M, Zheng RQ, Kim SR, Okabe Y, Osaki Y, Iijima H, Itani T, Kasugai H, Kanematsu M, Ito K, Usuki N, Shimamatsu K, Kage M, Kojiro M. Diagnostic accuracy of imaging for liver cirrhosis compared to histologically proven liver cirrhosis. *Intervirolology*, 2008;51:17-26.

飯島尋子, 齋藤正紀, 吉川昌平, 東浦晶子, 脇英彦, 森安史典, 西口修平. Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) の造影超音波診断. *肝胆膵画像*, 2008;10:53-57.

飯島尋子, 西口修平. NAFLD (非アルコール性脂肪性肝疾患) の線維化スコ

ア: NAFLD の非侵襲的線維化スコアリングシステムの検討. *Frontiers in Gastroenterology*, 2008;13:166-167.

吉川昌平, 飯島尋子, 山口 匡, 西口修平. 肝機能・肝予備力の新しい評価法と対策. *消化器科*, 2008;47:538-544.

2. 学会発表

2009 年度に予定している。

H. 知的財産の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。

2. 実用新案登録  
なし。

3. その他  
なし。

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）  
肝がん早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発  
分担研究報告書

EGFR を標的とする肝細胞がんイメージングの基礎研究

研究分担者 佐賀 恒夫 放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター  
分子病態イメージング研究グループ・グループリーダー

研究要旨：肝がん細胞膜上に発現する上皮成長因子受容体(EGFR)を標的とするイメージング法の開発に向けた基礎検討を行った。EGFRを認識するヒト抗体048-006は、EGFRと高親和性結合を示し、EGFRを高発現するマウス移植腫瘍に高集積を示すことがわかった。そこで、肝がんモデルでの検討に向けて、数種の肝がん細胞株のヌードマウスでの造腫瘍性、放射性標識048-006抗体とのインビトロでの結合性の検討を行い、今後の検討に適したモデルの選択を行った。

A. 研究目的

上皮成長因子受容体(EGFR)の過剰発現しばしば肝細胞がんで認められ、抗体や阻害剤など、これを標的とする分子標的治療も試みられている。本研究では、肝細胞がんの早期診断に向けて、肝がん細胞膜上に発現するEGFRを標的とする抗体イメージング法の開発に向けた基礎検討を行う。

B. 研究方法

1. EGFR高発現細胞での抗体の性状評価

EGFRを認識するヒト抗体048-006(藤田保健衛生大学黒澤教授より供与)をI-125(クロラミンT法)およびIn-111(CHX-A<sup>99m</sup>-DTPA法)で放射性標識し、EGFR高発現細胞(A431)とのインビトロでの結合親和性、抗体の内在化の有無を検討する。続いて、ヌードマウスにA431細胞

を皮下投与して腫瘍モデルを作成し、これに放射性標識048-006抗体を静脈内投与、体内分布の経時変化を測定するとともに、イメージングを行う。

2. 肝がん細胞株の造腫瘍性

4種類の肝がん細胞株(Hep-G2, HuH-7, SK-Hep1, Li-7)を種々の濃度でヌードマウス皮下に注入し、腫瘍サイズの経時変化を測定し、移植腫瘍に適した細胞株を選択する。必要に応じて、マトリゲルを併用する。

3. 肝がん細胞株との結合性の評価

I-125標識048-006抗体と $1 \times 10^6$ 個の肝がん細胞を反応させ、結合放射能を測定し、それぞれの細胞との結合性(%Bound)を比較する。

(倫理面への配慮)

動物実験の内容は、所内の動物実験委員会の承認を得て、動物実験等に関する規程に沿って行った。

### C. 研究結果

#### 1. EGFR 高発現細胞での抗体の性状評価

抗体 048-006 をクロラミン T 法で I-125 標識、CHX-A<sup>99</sup>-DTPA を用いて In-111 標識して、種々の濃度の EGFR 高発現 A431 細胞と、4℃ で 1 時間反応させたところ、標識抗体の高い結合性が認められた (図 1)。また、種々の濃度の非標識抗体を加えた競合阻害実験から求めた結合親和性は、 $1.8 \times 10^9 \text{M}^{-1}$  と、現在分子標的治療薬として使われている抗 EGFR キメラ抗体 (Cetuximab) と同等の高い親和性を示した。標識抗体が A431 細胞に結合した後に、細胞を洗浄し、37℃ でインキュベート、その後の放射能の局在の経時変化を追ったところ、I-125 標識抗体では、時間とともに膜に結合した標識抗体が細胞内に内在化し、そこで代謝を受けて生じた遊離 I-125 が細胞外に排出されること (図 2)、In-111 標識抗体では、内在化して代謝を受けた後も、放射能は細胞内に留まることが示された (図 3)。

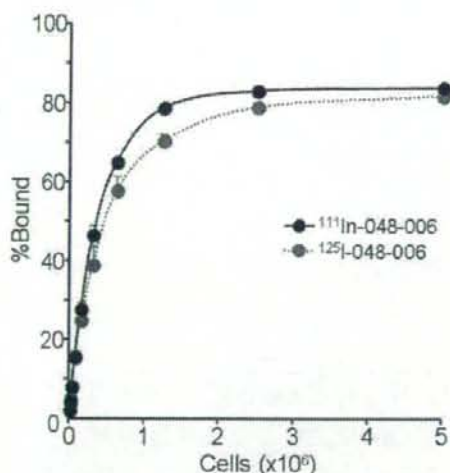


図 1 標識抗体の細胞結合性

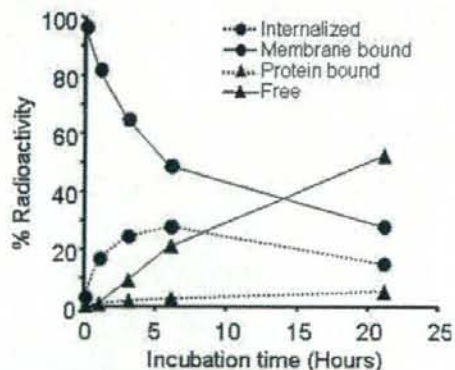


図 2 抗体内在化の検討 (I-125)

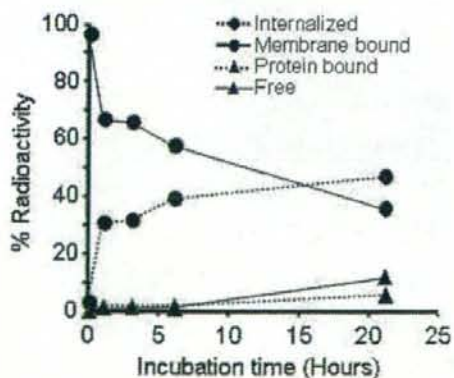


図 3 抗体内在化の検討 (In-111)



インビトロでの検討結果を受けて、担癌マウスでの検討は、In-111 標識抗体を用いて行った。A431 細胞を皮下移植したヌードマウスに In-111 標識抗体(37kBq)を静脈内投与し、18 時間、42 時間、90 時間後に腫瘍・血液・各臓器の放射能を測定した。肝臓・脾臓に高い放射能集積を認めたと、血液およびその他の正常臓器では、時間とともに集積放射能が低下した。一方、A431 移植腫瘍への集積は、投与 18 時間後より 10%を越える値を示し、その後も高値を維持した(図 4)。

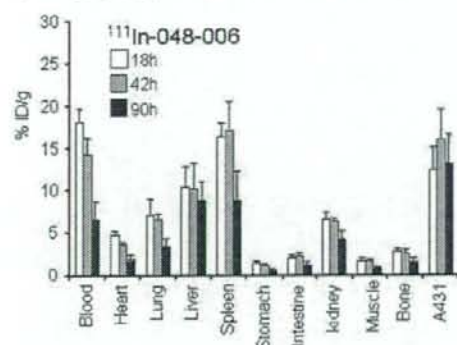


図 4 担癌マウスでの標識抗体の体内分布

多量の In-111 標識抗体(1.85MBq)を投与して担癌マウスのイメージングを行ったところ、肝・脾への集積に加え、投与 1 日後より移植腫瘍が描出され、時間とともに明瞭化した(図 5、矢印)。

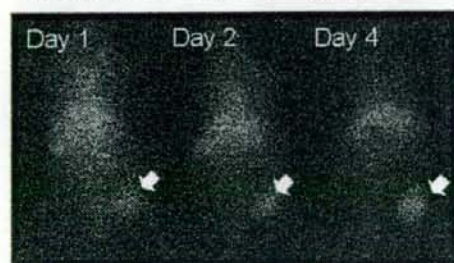


図 5 In-111 標識抗体でのイメージング

## 2. 肝がん細胞株の造腫瘍性

ATCC 等より入手した 4 種の肝がん細胞株をヌードマウス皮下に投与し経時的に腫瘍の形成をフォローした(図 6)。HuH-7 細胞では、約 2 週間で適度な大きさの腫瘍が形成された。Hep-G2 細胞では細胞のみの投与では腫瘍の形成を認めなかったが、細胞数を増やしマトリゲルと共に投与することにより腫瘍が形成されることがわかった。また、SK-Hep1 細胞では腫瘍の形成までに長期を要すること、Li-7 細胞は造腫瘍性が無いことが明らかとなった。

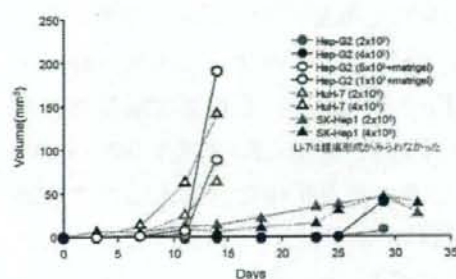


図 6 肝がん細胞株の造腫瘍性

## 3. 肝がん細胞株との結合性の評価

I-125 標識 048-006 抗体と各種がん細胞株とのインビトロ(4°C、1 時間インキュベート)での結合性を比較した(図 7)。今回検討した肝がん細胞株の中では、HuH-7 細胞、SK-Hep1 細胞が標識抗体との良い結合性を示したが、Hep-G2 細胞の結合性はそれほど高いものではなかった。

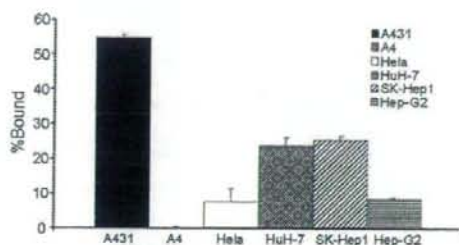


図7 各種がん細胞株と標識抗体の結合性

#### D. 考察

EGFR は肝細胞がんを含む多種の悪性腫瘍での過剰発現や変異が報告されており、EGFR を標的とする分子標的治療薬が開発され臨床応用されている。悪性腫瘍におけるEGFR発現をイメージングで捉えることは、疾患診断のみならず治療方針の決定や治療効果判定にも重要な意義を有する。今回使用した抗EGFR抗体048-006は高親和性のヒト抗体で、臨床応用にも適した抗体である。EGFR高発現細胞を用いた基礎検討では、腫瘍への高集積を認めた。しかしながら、肝・脾への集積も高く、肝細胞がんの診断においては、抗体の低分子量化(Fabの使用等)や標識方法の変更など、肝への生理的集積の低減に向けての方策が重要となる。

また、肝がん細胞株での検討から、HuH-7細胞が今後の評価に適していると考えられ、次年度以降は、HuH-7細胞と評価の対象として、インビトロ、インビボでの検討を進めていく。

#### E. 結論

EGFRを標的とした肝細胞がんのイメージングに向けた基礎研究をスタートした。ヒト抗体048-006は、EGFRに対して高親

和性を有し、イメージング応用に有望な抗体であることがわかった。肝細胞がんモデルとしては、造腫瘍性および048-006抗体との結合性の良いHuH-7細胞が適しており、今後このモデルを用いて検討を進めていく。

#### F. 健康危険情報

該当せず。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特になし

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発  
分担研究報告書

包括的分子解析に基づく新規早期発見マーカーの開発に関する研究

研究分担者 坂元 亨宇 慶應義塾大学 医学部病理学教室 教授

研究要旨：

幹細胞関連遺伝子 **Bmi-1** が肝細胞癌において過剰発現を示し、特に高分化ないし早期の肝細胞癌で過剰発現を示すことを明らかにした。また、**Bmi-1** の下流で、ABC トランスポーターの1種が発現亢進していることを示し、**Bmi-1** が肝発癌早期に関与している可能性を示した。早期肝細胞癌で過剰発現を示す新規遺伝子 **CAP2** が、小型魚類の発生過程にも重要な役割を果たしていることを示した。また、肝細胞癌細胞株を用いた検討から、間質浸潤にも関連すると考えられる葉状突起の形成に関与している可能性を示した。

A. 研究目的

これまでの解析から慢性障害肝を背景に生じる肝細胞がんの多くは、血管新生を伴わない早期肝細胞癌、その脱分化過程に相当する結節内結節型の肝細胞癌、そして転移能を有する進行肝細胞癌へと多段階的に発生・進展することが示されてきた。そして、わが国において多数の罹患者を有するC型肝炎は、発癌のリスクが極めて高いが、発癌機構、特に早期の異常に関しては未だ十分には解明されていない。本研究では、早期肝細胞癌ならびにその脱分化過程の分子異常を一層明らかにし、早期診断・悪性度診断の分子マーカーの開発を行う。

B. 研究方法

(1)多段階発癌過程に対応する肝細胞癌組織に発現する遺伝子・蛋白を網羅的に解析する。幹細胞関連遺伝子の多段階発癌過程における発現異常を解

析する。

(2)上記にて同定された分子につき、肝細胞癌細胞株を用い *in vitro* における機能を解析する。同時に、肝細胞癌の病理像を模倣する同所移植モデルならびに小型魚類を用い *in vivo* における機能を解析する。同定された分子を遺伝子導入あるいは **knock-down** し、*in vitro* と *in vivo* での機能解析を行うことで、分子の病態への直接的関与を明らかにする。

(3)臨床・病理材料を用いたレトロスペクティブ解析による、肝細胞癌の早期診断・悪性度診断への有用性を検証する。

(倫理面への配慮)

本研究計画では、がん組織で新たに生じた遺伝子の変化、発現の変化の解析ならびにがん組織の移植による機能解析を目的としており、三省合同指針

にあるヒトゲノム・遺伝子解析研究は含まれない。ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同による「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」及び科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当大学の倫理審査委員会の承認を得て実施する（承認番号 16-34）。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」ならびに「慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン」を遵守する。

### C. 研究結果

#### 1) 肝多段階発癌における Bmi-1 の発現異常

Bmi-1 の mRNA 発現を、肝細胞がん細胞株 5 株にて調べたところ、最も分化型の細胞株である KIM1 において、発現が最も亢進していた。また肝細胞癌切除例を用いた、定量的 RT-PCR 解析においても、腫瘍部において背景肝に比して発現が有意に亢進しており、分化度が高いほど発現も高い傾向が認められた。共焦点蛍光顕微鏡ならびに免疫電顕を用いた解析から、Bmi-1 蛋白は腫瘍細胞の核内にドット状に陽性所見を認めることが示され、免疫組織学的検討においては、明瞭なドット状のシグナルを核内に認めるものを陽性と判断し解析することとした。154 結節の免疫組織学的解析では、背

景肝ならびに異型結節では明瞭な陽性所見を認めないのに対して、早期ないし高分化肝細胞癌では 87% に、中分化肝細胞癌では 60% に、低分化肝細胞癌では 46% に、陽性所見を認めた。さらに、*in vitro* での検討から、Bmi-1 の発現と相関して発現の変化する分子として ABC トランスポーターの 1 種に着目し、現在検討を進めている。切除例を用いた遺伝子発現解析、免疫組織化学的検討においても、両者が相関を示していることから、その意義につきさらに検討を行っている。

#### 2) 新規早期肝細胞癌マーカー CAP2 の機能解析

小型魚類においても CAP2 は比較的良好に保存されており、その発現はヒトと同様、神経・筋組織に多く、上皮系にはほとんど発現を認めなかった。ゼブラフィッシュを用い、CAP2 ノックダウンのための複数のアンチセンスオリゴ配列を作成、導入し定量的 PCR、コントロールとの比較による評価を行った。その結果、ノックダウンした群では、有意に高頻度かつ高度の short body phenotype を認めた。また、CAP2 の発現亢進を示す肝細胞癌細胞株に対して、si-RNA による発現抑制を行ったところ、葉状突起の形成が抑制され、細胞増殖も抑制される傾向が認められた。

### D. 考察

#### 1) 肝多段階発癌における Bmi-1 の発

現異常

**Bmi-1** は、**c-myc co-operating gene** としてマウスリンパ腫から同定された遺伝子であるが、その後、造血幹細胞や神経幹細胞の維持・**self-renewal** に重要な働きをしていることが報告されている。今回の検討からは、肝細胞癌においても **Bmi-1** は発現の亢進を認め、特に発癌の早期に関与している可能性が示唆された。**Bmi-1** は、**polycomb-group gene** の一つで、これまで **p16** の発現抑制やテロメレースの活性化に関与していることが報告されている。上記の所見から我々は、肝細胞癌において他にも重要な遺伝子の発現を制御している可能性を考え、マイクロアレイ解析に基づくターゲット分子の探索を行った。その結果、**ABC** トランスポーターの 1 種が、良好な相関を示し発現亢進していることを見出し、この知見は、肝発癌のメカニズムを解明する上でも有用であると考え、現在研究を続けている。

## 2) 新規早期肝細胞癌マーカー **CAP2** の機能解析

我々が、新規に見いだした肝癌関連分子 **CAP2** (adenylate cyclase-associated protein2) は、発癌早期から発現が見られ進行に比例し発現が亢進するが、非がん部での発現は認められず、早期肝細胞癌マーカーとして期待されている。**CAP** は酵母からヒトまでその構造の多くが維持されている分子であり、その分子構造から **adenylate cyclase** 結合ドメイン

と **アクチン結合ドメイン**、**SH 結合ドメイン** を有するアダプター分子で、**Ras-Actin** を結ぶ働きへの関与や発生段階においても重要な機能を有している可能性が高い。しかしながら **CAP2** は、癌との関連した研究のみならずノックアウト動物も国内外で作成・報告はされておらず、その機能は未知である。今回の結果は、**CAP2** が発生過程においても重要な役割を果たしている可能性を示唆している。肝癌細胞における機能解析と合わせて、さらに検討を進める。

## E. 結論

多段階発癌過程に対応する病理組織を用いた解析ならびに肝細胞関連遺伝子に着目した解析を行うことで、肝発癌早期の遺伝子・分子異常を明らかにし、病態の解明に加えて、臨床応用可能な新しい早期診断・悪性度診断マーカーを開発することを目的に研究を行った。肝多段階発癌における **Bmi-1** の発現異常、新規早期肝細胞癌マーカー **CAP2** の機能解析については、順調に成果が出ており、今後研究を一層推進する。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tanese K, Fukuma M, Yamada T,

- Mori T, Yoshikawa T, Watanabe W, Ishiko A, Amagai M, Nihsikawa T, Sakamoto M: G-Protein-Coupled Receptor GPR49 is Up-regulated in Basal Cell Carcinoma and Promotes Cell Proliferation and Tumor Formation. *Am J Pathol*, 2008; 173: 835-843.
2. Kamiya K, Hayashi Y, Douguchi J, Hashiguchi A, Yamada T, Izumi Y, Watanabe M, Kawamura M, Horinouchi H, Shimada N, Kobayashi K, Sakamoto M: Histopathological features and prognostic significance of the micropapillary pattern in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 2008 21: 992-1001.
  3. Hanada S, Maeshima A, Matsuno Y, Ohta T, Ohki M, Yoshida T, Hayashi Y, Yoshizawa Y, Hirohashi S, Sakamoto M: Expression Profile of Early Lung Adenocarcinoma: Identification of MRP3 as a Molecular Marker for Early Progression. *J Pathol*, 2008; 216: 75-82.
  4. Kuwabara Y, Yamada T, Yamazaki K, Du W, Banno K, Aoki D, Sakamoto M: Establishment of an ovarian metastasis model and possible involvement of E-cadherin down-regulation in the metastasis. *Cancer Sci*, 2008; 99: 1933-1939.
  5. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A: Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*, 2008; 26:1695-1704.
  6. Du W, Hozumi N, Sakamoto M, Hata J, Yamada T: Reconstitution of Schwannian Stroma in Neuroblastomas Using Human Bone Marrow Stromal Cells. *Am J Pathol*, 2008; 173: 1153-1164.
  7. Yamazaki K, Takamura M, Masugi Y, Mori T, Du W, Hibi T, Hiraoka N, Ohta T, Ohki M, Hirohashi S, Sakamoto M. Adenylate cyclase-associated protein 1 overexpressed in pancreatic cancers is involved in cancer cell motility. *Lab Invest*, 2009; in press.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
該当なし。

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
 肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発  
 分担研究報告書

研究分担者 井本逸勢 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝 准教授

研究要旨： 肝細胞癌臨床検体を対象に、自作 BAC アレイによるゲノムコピー数解析を施行し、集計の終了した肝細胞癌の多くにコピー数異常が検出されたが、その程度、領域は症例間で差があった。また、肝細胞癌細胞株・臨床検体を対象に、CpG island の過剰メチル化をゲノムワイドに探索することで、メチル化異常により高頻度に発現が抑制される肝癌抑制遺伝子候補を同定した。

### A. 研究目的

年間約 4 万人が死亡している肝疾患は我が国の国民病であり、その多くがウイルス性慢性肝障害を基盤とする肝細胞癌（肝癌）である。肝癌の高危険群が明らかになりつつあるが、適切な治療時期を失した患者も多く、より精緻で効率のよい早期診断法の開発が喫緊の課題である。本研究では、課題のうち、肝癌の細胞株ならびに臨床検体の包括的分子解析に基づく新規早期発見マーカーの開発を含む肝癌関連遺伝子マーカーの同定とその検出法の開発を目的とする。

### B. 研究方法 (図 1)

B 1. 肝癌臨床検体におけるゲノム一次構造の解析と臨床・病理学的因子との比較検討： 肝癌臨床検体例を対象に自作 bacterial artificial chromosome (BAC) アレイ (MCG Cancer Array-800 ならびに MCG Cancer Array-1500) を用いて、既報の方法に従いアレイ



図 1. 肝癌のゲノム・エピゲノム解析による分子標的探索 comparative genomic hybridization (CGH) 法を施行し、ゲノム一次構造異常 (ゲノムコピー数異常) の評価を試みた。

B 2. 肝癌における異常メチル化の検出とその標的肝癌抑制遺伝子候補の同定： 肝癌細胞株を test に非腫瘍部肝組織を reference に用いることにより、自作 BAC アレイ (MCG Whole Genome Array-4500) を用いた BAC-array based Methylated CpG-island Amplification (BAMCA) 法を既報の方法に従い施行し、肝癌細胞株における異常高メチル化領域をゲノムワイドにスクリーニングし

た。これにより検出された異常領域内に座位しかつ CpG アイランドを有する遺伝子をデータベースにより選別し、肝癌細胞株ならびに臨床検体での遺伝子発現を定量 PCR により評価することで、癌部特異的発現低下を示す遺伝子を同定した。さらに、発現低下細胞株の 5-aza 2'-deoxycytidine (5-aza-dCyd) 処理による発現回復の評価ならびに CpG アイランドのメチル化状況の bisulfite シークエンス法や combined bisulfite restriction analysis (COBRA) 法での評価により、DNA メチル化による発現抑制の確認を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究においては、事前に患者に対して十分なインフォームドコンセントを交わし、標本データの匿名化と孤立化によりプライバシーの完全な保護を図っている。「ヘルシンキ宣言」、「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する指針」その他を遵守し、遺伝子研究に際しては科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守するとともに「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 文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示）及び平成 13 年 3 月 29 日 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿い、倫理委員会の審査を経て実施している。

### C. 研究結果

#### C1. 肝癌臨床検体におけるゲノム一次構造の解析と臨床・病理学的因子との比

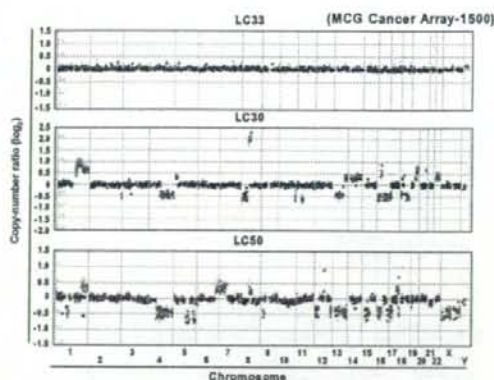


図2. BAC array-CGHによる肝癌臨床検体でのコピー数異常検出  
較検討： 自作 BAC アレイ (MCG Cancer Array-800) ならびに MCG Cancer Array-1500) により、肝癌臨床検体においてゲノムコピー数変化が検出された (図2)。

ゲノムコピー数異常としては、1q、5p、6p、8q、17q などにコピー数増加、1p、4p、4q、8p、13q、14q、8q、17p などにコピー数減少を認めた (図3) が、症例によりほとんど異常を認めない腫瘍から著明なコピー数増加・減少を示す腫瘍まで様々であった (図2)。分担研究者らは、アレイ CGH で検出したコピー数異常領域の全ゲノム領域に対する割合 (fraction of genome altered, FGA) により評価したゲノム不安定性あるいはクラスタリングにより 2 群に分けたコピー数異常パターンにより、予後の評価が可能なることを見出してきており (論文発表 1、その他)、詳細なコピー数異常領域の検出が、早期発見や病態の推定

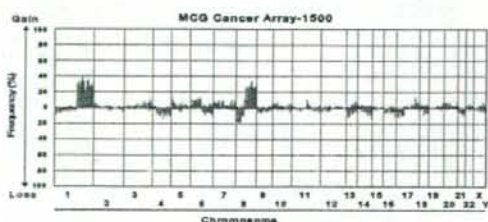


図3. BAC array-CGHによる肝癌臨床検体でのコピー数異常検出



に有用なマーカー領域やその標的遺伝子の同定につながる可能性がある。

C. 2. 肝癌における異常メチル化の検出とその標的肝癌抑制遺伝子候補の同定: BAMCA 法を用いて Hep3B、Huh-7 のゲノム DNA における異常メチル化領域を検出し、共通して認められた領域から CpG アイランドをプロモーター領域に持ち、その異常メチル化が発現消失に関与する遺伝子候補として MeHCC1 (Lab. name) を同定した。MeHCC1 は、肝癌細胞株パネル (19 種類) において正常肝に比較して高頻度に発現が低下しており、特に 6 細胞株では発現がほぼ消失していた (図 4 左)。これら 6 細胞株では COBRA 法でも CpG アイランドが高度にメチル化されており、発現消失のパターンと一致していた (図 4 左)。また、肝癌臨床検体においても、癌部が非癌部に比べてメチル化されている症例では、発現が癌部で非癌部に比べより低下していたことから (図 4 右)、MeHCC1 が癌部特異的なプロモーターの DNA メチル化により発現が抑制される肝癌抑制遺伝子候補であることが示唆された (未発表データ)。

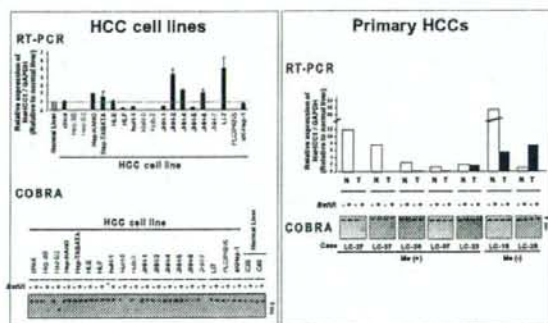


図 4. 肝細胞癌における新規メチル化標的遺伝子候補の同定

## D. 考察

図 1 に示した全体研究計画のもとで、肝癌細胞株ならびに臨床検体のゲノム・エピゲノム解析をゲノムワイドに行うことで、肝癌の悪性形質獲得に関わる可能性のあるゲノムコピー数異常や肝癌特異的 DNA メチル化異常とその標的領域、標的遺伝子が同定できることが明らかになった。これらの領域や遺伝子から、早期発見や病態と関連するマーカーが同定できる可能性があることから、各領域における更に多数の候補遺伝子決定を進めるとともに、各遺伝子の臨床病理学的意義や機能の解明、多数の遺伝子群の異常パターンのマーカーとしての意義の解析を引き続き行っている。特に、本課題における目標である、早期発見や病態と関連するマーカーとなる遺伝子や遺伝子群の同定と異常の検出方法・キットの開発が、今後の課題である。

## E. 結論

肝癌細胞株ならびに臨床検体のゲノム・エピゲノム解析を行うことで、肝癌特異的あるいは肝癌の悪性形質と関連するゲノムコピー数異常や DNA メチル化異常とその標的領域、標的遺伝子を同定した。今後これらの中から、早期発見や病態と関連するマーカーとなる遺伝子を同定し、さらに検出方法の開発を実現する。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

## G. 研究発表

### G1. 論文発表

1. Tanaka S, Arii S, Yasen M, Mogushi K, Su NT, Zhao C, Imoto I, Eishi Y, Inazawa J, Miki Y, Tanaka H. Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. Br J Surg 2008;95(5):611-619.

### G2. 学会発表

特になし。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H1. 特許取得

特になし。

### H2. 実用新案登録

特になし。

### H3. その他

特になし。

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発  
分担研究報告書

研究分担者 田中真二 東京医科歯科大学情報処理センター 特任准教授

### 研究要旨

肝癌外科手術症例の切除標本を用いて、網羅的遺伝子発現解析、包括的微小ゲノム情報解析の pilot test analysis を行なった。さらに、術中造影超音波検査により、肝癌の血流動態、血管構築、腫瘍形態、肝組織の微小循環を解析している。

#### A. 研究目的

年間約4万人が死亡している肝疾患は我が国の国民病であり、その多くがウイルス性慢性肝障害を基盤とする肝細胞癌（肝癌）である。高危険群が明らかになりつつあるが、適切な治療時期を失した患者も多く、より精緻で効率のよい早期診断法の開発が喫緊の課題である。本研究では分子マーカーと画像診断的手法により臨床に有用な肝癌早期発見システムを構築することを目的とする。

#### B. 研究方法

##### (1) 新規分子マーカー解析

肝癌の外科手術症例の切除標本を用いて、cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析および高精度 CGH マイクロアレイによる包括的微小ゲノム情報解析の pilot test analysis を行なった。

##### (2) 術中超音波画像の病理学的解析

Perflubutane を用いた術中造影超音波検査によって、肝癌の血流動態、血管構築、腫瘍形態の画像解析を行い、病理組

織像との比較による pilot test analysis を行なった。

##### (倫理面への配慮)

本研究においては、事前に患者に対して十分なインフォームドコンセントを交わし、標本データの匿名化と孤立化によりプライバシーの完全な保護を図っている。「ヘルシンキ宣言」、「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する指針」その他を遵守し、遺伝子研究に際しては科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守するとともに「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 文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示）及び平成13年3月29日12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿い、倫理委員会の審査を経て実施している。

#### C. 研究結果

##### (1) 新規分子マーカー解析

外科手術症例の切除標本を用いた cDNA マイクロアレイの結果、肝癌の再発を規

定する新しい分子マーカー候補を同定した。高精度 CGH マイクロアレイの結果、ゲノム不安定性との有意な相関を認めた。

#### (2) 術中超音波画像の病理学的解析

肝癌の術中造影超音波画像と病理組織像との比較により、①癌の血流動態パターン分類が癌分化度と有意に相関すること、②腫瘍形態を明瞭に描出し周囲組織や血管への浸潤能を示すという新しい知見を得られた。

#### D. 考察

肝癌切除標本の解析により、再発を規定する新しい分子マーカーを同定した。この分子に対する特異的阻害剤が既に開発されており、本研究により肝癌の分子マーカーのみならず、予防治療への応用が示唆された。また、肝癌の術中造影超音波画像の解析により、非侵襲的画像検査によって癌の悪性度、進展様式を予測できる可能性が示された。今後は分子マーカー候補および超音波画像解析を validation analysis によって検証し、さらに新規分子標的の評価解析を行なう方針である。

#### E. 結論

肝癌外科手術症例の切除標本を用いた pilot test analysis により、再発を規定する新しい分子マーカー候補を同定した。さらに術中造影超音波検査画像により、非侵襲的に癌の悪性度、進展様式を予測できる可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

#### G. 研究発表

##### G1. 論文発表

1. Tanaka S, Aarii S, Yasen M, Mogushi K, Su NT, Zhao C, Imoto I, Eishi Y, Inazawa J, Miki Y, Tanaka H. Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Br J Surg* 2008;95(5):611-619.
2. Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Kurokawa T, Nakamura N, Inazawa J, Tanaka H, Aarii S. Surgical contribution to recurrence-free survival in patients with macrovascular invasion-negative hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg*, in press
3. Tanaka S, Aarii S. Molecularly targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, in press

##### G2. 学会発表

1. 田中真二、藍原有弘、有井滋樹  
シンポジウム「肝癌の分子標的治療」  
肝細胞癌の再発規定分子解析に基づく  
新規分子標的の同定  
第12回日本肝臓学会大会（2008年10月1日）
2. 田中真二、藍原有弘、Mahmut Yasen、  
茂櫛 薫、野口典男、工藤 篤、中村典  
明、伊東浩次、三木義男、稲澤譲治、田