

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

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 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。

A.研究目的

肝細胞癌の発生進展に関わる血管新生関連遺伝子の発現を網羅的に検索した。

B.研究方法

2008年10月よりミラノ基準を満たす肝細胞癌と診断した12例切除例。男性10例、平均年齢68歳。全例術前にEOB-MRI検査を行ない、多血性肝細胞癌と診断した。手術時に癌部および非癌部組織を新鮮凍結保存し、新鮮凍結標本から全RNAを抽出しcDNAを合成、遺伝子発現をリアルタイムPCRを用いて解析した。測定はTaqMan Array Gene Expression 96-Well Plate Humanを用いた。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」、「易学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する指針」を遵守した。

C.研究概要

癌部の遺伝子発現が非癌部より亢進していた血管新生に関わる遺伝子が6遺伝子

認められた。癌部の遺伝子発現が非癌部より低下していた遺伝子は7遺伝子であった。

D.考察

早期肝細胞癌は乏血性であるが、進行肝細胞癌は多血性である。今回癌部と非癌部で遺伝子発現量に差がみられた血管新生に関わる13遺伝子は、乏血性から多血性肝細胞癌に変化する過程で関与する血管新生関連遺伝子の可能性がある。

E.結論

肝細胞癌の血管新生に関与する可能性のある遺伝子を同定した。

F.健康危険情報

総括研究報告書参照。

G.研究発表

1.論文発表

1) Yamamoto M, Ariizumi S, Katagiri S, Kotera Y, Takahashi Y. The value of anatomical liver sectionectomy for patients with a solitary hepatocellular carcinoma from 2 to 5 cm in greatest diameter. J Surg Oncol. 2009. Dec 1; 100 (7): 585-588.

2) Ariizumi S, Yamamoto M, Takasaki K.  
Right hepatectomy for hepatocellular carcinoma in patients with an indocyanine green retention rate at 15 minutes of 10% or higher. Dig Surg 2009; 26 (2): 135-142.

## 2. 学会発表

- (1) 肝細胞癌の肉眼型診断における Gd-EOB 造影 MRI の有用性. 第 21 回日本肝胆膵外科学会. 2009. 有泉俊一, 北川光一, 小寺由人, 高橋豊, 片桐聡, 山本雅一
- (2) 異なる Gd-EOB-DTPA 造影 MRI 所見を呈したいわゆる Green hepatoma の 2 例. 第 71 回日本臨床外科学会. 2009. 北川光一, 有泉俊一, 小寺由人, 高橋豊, 加藤孝章, 高崎淳, 片桐聡, 中野雅行, 山本雅一.
- (3) Relativity of gene expressions and availability for S-1 therapy in hepatocellular carcinoma. International College of Surgens, Asian/Pacific Federation Congress, Beijing, China, 2009. Okano Y, Yamamoto M.

## H. 知的財産の出願・登録状況

なし

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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

研究分担者

飯島尋子（兵庫医科大学 内科肝胆膵科 教授・超音波センター センター長）

研究要旨 肝癌の高リスク群である肝硬変を非侵襲的に判定する方法はこれまで確立していなかったが、ARFIを用いた肝硬度判定により高精度に判別できることを報告した。更にこれに影響する因子についても明らかとした。また造影超音波検査を用いた肝腫瘍微細血管構築パターンと Kupffer 相を組み合わせた悪性度分類が、境界病変と肝細胞癌の判別および肝癌組織学的分化度の推測に有用であることを報告した。

A.研究目的

(1) 肝癌の早期発見を行うためには、高リスク群を明らかにする必要がある。肝癌の高リスク群は肝硬変であるが、この非侵襲的診断には確立された方法がないため、新たな超音波検査技術を用いた判定法を確立する。

(2) 肝内に新たな結節を認めた際、境界病変と肝細胞癌判別および組織学的分化度を造影超音波により推定する方法を検討する。

B.研究方法

(1) 非侵襲的な硬度測定を可能とする新たな技術である Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) を用いて、肝硬変 (F4) と非肝硬変を判別する方法を ROC 解析等により検討する。さらに線維化グレード別の測定値を明らかとし、線維化が推測可能な方法を確立する。

(2) 造影超音波による肝腫瘍微細血管構築パターンと Kupffer 相を組み合わせた悪性度分類を手術標本や腫瘍生検で得られた組織学的分化度と対比検討する。

(3) 乏血性肝細胞癌から境界病変の診断を、Sonazoid 造影の血管相および

Kupffer 相を EOB-MRI 検査、CT 検査、組織診断と検討し明らかとする。

（倫理面への配慮）

本研究はいずれも非侵襲的な検討であり、実際の臨床に沿って行われるものであるが、倫理面については当院の倫理委員会においても了承済みである。

C.研究概要

(1) ARFI を使用した肝硬度測定により、肝硬変 (F4) と非肝硬変を ROC 曲線下面積 0.925 と良好に判別可能であったことを報告した。さらにそれぞれの平均線維化グレード別 Vs 値 (m/sec) は、F1 1.19、F2 1.24、F3 1.54、F4 2.21 であることを明らかとすることで、非侵襲的に線維化グレード診断を行うことによる発癌リスク予測の可能性を見出した。また脂肪化や炎症により測定値に影響を与える可能性が示唆された。

(2) 我々の提唱した悪性度分類を用いると、Grade 1 では全て高分化肝癌あるいは Dysplastic Nodule (DN)、Grade 4 ではほとんどが中分化肝癌、Grade 5 では全てが中分化以上で低分化を多く認めるなど、組織学的分化度の推測に有用であった。更に腫瘍マーカーとの関連も検討す

ることで、L3分画との組み合わせによる効率的な検査方法も提案できた。

(3)乏血性肝細胞癌から境界病変の診断では、EOB-MRIは前癌病変まで拾い上げてしまうことが明らかとなったが、造影超音波検査の血管相・Kupffer相を詳細に評価することで、治療を要すべき結節を指摘し得る可能性が判明した。

#### D. 考察

ARFIを用いた肝線維化診断は、非侵襲的な検査にもかかわらず、高精度に肝癌高リスク群である肝硬変患者の拾い上げに期待できる。しかし炎症や脂肪化などの背景に影響する可能性が示唆され、今後これらを十分に検討し、実際の臨床において有用な使用方法を提案してゆくことが必要である。

また肝癌悪性度については、我々の悪性度分類で、良好に層別化可能となった。しかし問題は境界病変の診断に関して、Golden standardである組織診断のコンセンサスがまだ確立していない点である。そこで画像診断はミクロのレベルでなく、結節単位で判定するため、更なる検討により組織診断を凌駕できる可能性があると考えられた。その点でも、血流と肝機能の両面を最も高精度に判定できる造影超音波の研究が望まれる。

#### E. 結論

ARFIは肝硬変を非侵襲的に判定可能であった。肝癌悪性度分類は組織学的分化度を良好に反映し臨床的に有用な方法である。今後はさらに境界病変の診断法の確立が必要である。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 飯島尋子. 肝疾患の造影超音波診断—その変遷と新しい展開—. 肝臓 2009 ; 50 : 105-21.

2. Yamamoto T, Nakamura H, Liu W, Cao K, Yoshikawa S, Enomoto H, Iwata Y, Koh N, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Iijima H, Hada T, Nishiguchi S. Involvement hepatoma-derived growth factor in the growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells by vitamin K<sub>2</sub>. J Gastroenterol 2009 ; 44 : 228-35.

3. 田中弘教, 飯島尋子, 齋藤正紀, 會澤信弘, 坂井良行, 吉川昌平, 山本晃久, 榎本平之, 岩田恵典, 康典利, 今西宏安, 下村壯治, 中村秀次, 廣田誠一, 辻村亨, 藤元治朗, 西口修平. Sonazoid 造影超音波による新しい肝癌悪性度分類法の試み. 肝臓 2009 ; 50 : 397-399.

4. Sasaki S, Iijima H, Moriyasu F, Waki H. Definition of contrast enhancement phases of the liver using a perfluoro-based microbubble agent, perflubutane microbubbles. Ultrasound Med Biol 2009 ; 35 : 1819-27.

5. 飯島尋子, 田中弘教, 吉田昌弘, 池田直人, 山本晃久, 岩田恵典, 榎本平之, 齋藤正紀, 今西宏安, 下村壯治, 中正恵二, 廣田誠一, 辻村亨, 西口修平.

Acoustic Radiation Force Impulseによる非侵襲的肝線維化診断法の有用性. 肝臓 2010 ; 51 : 54-55.

##### 2. 学会発表

1. Enomoto H, Inoue S.I, Yamada D, Sakai Y, Aizawa N, Yoshikawa S,

- Yamamoto T, Ishii A, Koh N, Iwata Y, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Iijima H, Nakamura H, Matsuhisa A, Nishiguchi S. Detection of the causative pathogen using the in-situ hybridization kit in a patient with spontaneous bacterial peritonitis. 19<sup>th</sup> Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2009.2 Hong Kong
2. Liu W.d, Nakamura H, Cao K, Yamamoto T, Enomoto H, Iwata Y, Koh N, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Iijima H, Nishiguchi S. Vitamin K2 suppresses the expression of fibroblast growth factor receptor 3 in Hepatocellular carcinoma cell. 9<sup>th</sup> Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2009.2 Hong Kong
3. Tanaka H, Iijima H, Saito M, Aizawa N, Yamamoto T, Enomoto H, Iwata Y, Imanishi H, Shimomura S, Hirota S, Hirota S, Yamanaka J, Iimuro Y, Fujimoto J, Nishiguchi S. New malignancy grading system for hepatocellular carcinoma using sonazoid contrast enhanced ultrasonography. 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2009) 2009.10 Boston
4. Iijima H, Tanaka H, Saito M, Aizawa N, Yamamoto T, Enomoto H, Iwata Y, Imanishi H, Shimomura S, Yamanaka J, Fujimoto J, Hirota S, Tsujimura T, Nishiguchi S. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis using virtual touch tissue quantification. 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2009) 2009.10 Boston
5. Yamanaka J, Sugimoto T, Iijima H, Tanaka H, Hirano T, Kuroda N, Okada T, Saito S, Asano Y, Uyama N, Satake M, Yoshida Y, Suzumura K, Nishiguchi S, Fujimoto J. Usefulness of contrast-enhanced intraoperative ultrasonography in cirrhotic patients undergoing liver resection for hepatocellular carcinoma. 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2009) 2009.10 Boston
6. Enomoto H, Tsujimura T, Nakamura H, Imanishi H, Saito M, Yamamoto T, Iwata Y, Tanaka H, Shimomura S, Iijima H, Nishiguchi S. Analyses of the antiangiogenic and antitumor effects of interferons. 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2009) 2009.10 Boston
7. 田中弘教, 飯島尋子, 西口修平. Sonazoid 造影超音波による肝細胞癌および前癌病変の診断. (ワークショップ) 第95回日本消化器病学会総会 日本消化器病学会雑誌 (106) ; A126 2009
8. 田中弘教, 飯島尋子, Aoki Noriaki, 下村壯治, 今西宏安, 齋藤正紀, 康典利, 榎本平之, 岩田恵典, 中村秀次, 西口修平. C型肝炎患者に対する造影超音波検査による肝癌サーベイランスの費用効果分析. 第95回日本消化器病学会総会 日本消化器病学会雑誌 (106) ; A197 2009
9. 田中弘教, 飯島尋子, 東浦晶子, 下村壯治, 齋藤正紀, 藤元治朗, 廣田誠一, 廣田省三, 西口修平. 造影超音波検査を

用いた肝癌の悪性度分類. (シンポジウム) 日本超音波医学会第 82 回学術集会 超音波医学 (36) Suppl ; S163 2009

10. 飯島尋子, 田中弘教, 西口修平. ARFI による肝疾患診断. (シンポジウム) 日本超音波医学会第 82 回学術集会 超音波医学 (36) Suppl ; S178 2009

11. 吉田昌弘, 田中弘教, 山平正浩, 吉本直喜, 東浦晶子, 柴田陽子, 橋本眞里子, 會澤信弘, 齋藤雅博, 平山秀男, 齋藤正紀, 辻村亨, 廣田誠一, 西口修平, 飯島尋子. 肝線維化診断における ARFI の有用性. 日本超音波医学会第 82 回学術集会 超音波医学 (36) Suppl ; S403 2009

12. 田中弘教, 飯島尋子, 齋藤正紀, 下村壯治, 今西宏安, 康典利, 榎本平之, 岩田恵典, 山本晃久, 會澤信弘, 坂井良行, 山田大輔, 中村秀次, 西口修平. Sonazoid 造影超音波による肝癌分化度診断の試み. 第 45 回日本肝臓学会総会 肝臓 (50) Suppl.1 ; A124 2009

13. 田中弘教, 飯島尋子, 齋藤正紀, 下村壯治, 今西宏安, 康典利, 榎本平之, 岩田恵典, 山本晃久, 會澤信弘, 坂井良行, 山田大輔, 中村秀次, 廣田誠一, 辻村亨, 西口修平. 造影超音波検査を用いた輝度解析による慢性肝炎進展度の推定の試み. 第 45 回日本肝臓学会総会 肝臓 (50) Suppl.1 ; A372 2009

14. 田中弘教, 飯島尋子, 西口修平. 非侵襲的肝病態評価法の進歩 Virtual Touch Tissue Quantification による肝疾患診断. 第 13 回日本肝臓学会大会 肝臓 (50) Suppl.2 ; A450 2009

15. 田中弘教, 飯島尋子, 西口修平. 早期肝細胞癌の診断ストラテジー 早期肝癌の診断における造影超音波検査の位置づけ. (ワークショップ) 第 13 回日本肝臓学会大会 肝臓 (50) Suppl.2 ; A481 2009

16. 田中弘教, 飯島尋子, 西口修平. 早期肝細胞癌の診断ストラテジー 早期肝癌の診断における造影超音波検査の位置づけ. 第 47 回日本消化器がん検診学会大会 (JDDDW2009) 日本消化器がん検診学会雑誌 (47) ; 110 2009

17. Tanaka H, Iijima H, Higashiura A, Saito M, Aizawa N, Sakai Y, Yoshikawa S, Yamamoto T, Enomoto H, Iwata Y, Imanishi H, Shimomura S, Nakamura H, Hirota S, Tujimura T, Nishigami T, Yamanaka J, Fujimoto J, Nishiguchi S. New malignancy grading system for hepatocellular carcinoma using sonazoid contrast enhanced ultrasonography. 3<sup>rd</sup> International Kobe Liver Symposium on HCC with a JSH-ILCA joint Scientific Session. 3<sup>rd</sup> International Kobe Liver Symposium on HCC with a JSH-ILCA joint Scientific Session Program 138 2009

18. 飯島尋子. 肝疾患の造影超音波診断—現状と展望—. (ランチョンセミナー) 日本超音波医学会東北地方会第 38 回学術集会 日本超音波医学会 東北地方会第 28 回学術集会プログラム・抄録集 2009

19. 飯島尋子. 肝臓超音波診断の進歩. (ランチョンセミナー) 日本超音波医学会第 45 回中国地方学術集会・第 8 回中国地方会講習会 2009

20. 東浦晶子, 田中弘教, 山平正浩, 吉田昌弘, 柴田陽子, 橋本眞里子, 藤元治朗, 廣田誠一, 西口修平, 飯島尋子. Sonazoid kupffer イメージを用いた low MI と high MI による肝細胞癌診断の試み. 日本超音波医学会第 36 回関西地方会学術集会 2009.10 大阪

21. 橋本眞里子, 田中弘教, 東浦晶子, 柴田陽子, 西村純子, 松永桃子, 山平正浩,

吉田昌弘, 西口修平, 飯島尋子. Sonazoid 造影超音波検査の臨床検査値に及ぼす影響. 日本超音波医学会第 36 回関西地方会学術集会 2009.10 大阪

22. 吉田昌弘, 田中弘教, 山平正浩, 東浦晶子, 柴田陽子, 橋本真里子, 平山秀男, 廣田誠一, 西口修平, 飯島尋子. 肝線維化診断における Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) の有用性. 日本超音波医学会第 36 回関西地方会学術集会 2009.10 大阪

23. 吉田昌弘, 田中弘教, 山平正浩, 東浦晶子, 柴田陽子, 橋本真里子, 齋藤雅博, 藤元治朗, 西口修平, 飯島尋子. 肝腫瘍性病変における Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) の検討. 日本超音波医学会第 36 回関西地方会学術集会 2009.10 大阪

24. 吉田昌弘, 田中弘教, 橋本真里子, 柴田陽子, 西村純子, 松永桃子, 吉本直喜, 廣田誠一, 西口修平, 飯島尋子. 慢性肝疾患の線維化診断における肝生検組織所見と ARFI の乖離例の検討. 日本超音波医学会第 36 回関西地方会学術集会 2009.10 大阪

25. 田中弘教, 飯島尋子. 肝腫瘍における Fundamental B mode と造影超音波の比較. 日本超音波医学会第 36 回関西地方会学術集会 2009.10 大阪

26. 田中弘教, 飯島尋子, 西口修平. Virtual Touch Tissue Quantification 法を用いた肝線維化の非襲的評価法. 第 38 回日本肝臓学会西部会 肝臓 (50) ; A665 2009

27. 助永憲比古, 田中弘教, 飯島尋子, 石井昭生, 高嶋智之, 坂井良行, 會澤信弘, 山本晃久, 岩田恵典, 榎本平之, 齋藤正紀, 今西宏安, 下村壯治, 西口修平, 中正恵二, 廣田誠一, 中井紀博, 麻野泰包,

山中潤一, 藤元治朗. EOB-MRI の肝細胞造影相で high intensity を呈した HCC の 1 例. 第 38 回日本肝臓学会西部会 肝臓 (50) Suppl.3 ; A751 2009

H.知的財産の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1.特許取得

特になし

2.実用新案登録

特になし

3.その他

特になし

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  
(分担研究テーマ：EGFR・新生血管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継続して行った。種々のヒト肝がん細胞株でのEGFRの発現を検討し、その中から、EGFRを高発現し、ヌードマウスで造腫瘍性のあるHuH-7細胞を選択した。放射性標識したヒト抗EGFR抗体048-006は、インビトロでHuH-7細胞に結合し、その後内在化した。In-111標識048-006はHuH-7移植腫瘍に特異的な高集積を示し、移植腫瘍のイメージングに成功した。

また、これと並行して、血管新生を標的とした肝がんイメージング法の研究を開始した。新生血管内皮細胞に高発現する $\alpha v \beta 3$ インテグリンに特異的に結合する環状RGDペプチド4量体の放射性標識法を確立し、標的を高発現するマウス移植腫瘍への集積を確認した。さらに、血管内皮細胞増殖因子受容体(VEGFR)を標的とするイメージングに向けて、VEGFの放射性標識の基礎検討を行った。

#### A. 研究目的

上皮成長因子受容体(EGFR)の過剰発現や変異は、種々のがん細胞で認められ、抗体や関連するキナーゼ阻害剤など、EGFR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。

一方、血管新生はがんの増殖のみならず、浸潤・転移形成に深く関わっており、治療の重要な標的であり、肝がんに対する抗血管新生療法も行われている。癌組織内の血管新生の情報は、がんの診断のみならず、抗血管新生治療の奏功する患

者の選択や治療モニタリングにも重要な意義を有する。そこで、今年度より、がんの血管新生を標的とするイメージング法の研究を追加して行うこととした。

#### B. 研究方法

##### I : EGFR イメージング研究

##### 1. ヒト肝がん細胞株および移植腫瘍でのEGFR発現の検討

4種類のヒト肝がん細胞株(HepG2, SK-Hep1, HuH-7, Li-7)を含む7種のがん細胞株のEGFR発現量をウェスタンブロット法にて比較検討した。さらに、いくつかの細胞株をヌードマウス皮下に移植し、移植腫瘍を摘出し、ホルムアルデヒド固



定の後、パラフィン切片を作成、市販の抗EGFR抗体を用いて免疫組織染色を行い、インビボでのEGFRの発現を検討した。

## 2. ヒト肝がん細胞株と放射性標識抗体とのインビトロでの結合性と内在化

ヒト抗EGFR抗体048-006(藤田保健衛生大学黒澤教授より供与)をクロラミンT法でI-125標識、CHX-A"-DTPAを用いてIn-111標識して、種々の濃度のHuH-7細胞と、4°Cで1時間反応、その後細胞を洗浄し、細胞に結合した放射能を測定した。

次いで、標識抗体がHuH-7細胞に結合した後に細胞を洗浄、標識抗体を含まないメディウムに変え、37°Cでインキュベート、経時的に放射能の局在(細胞内に存在、膜に結合した状態で存在、メディウム中で蛋白結合した状態で存在、メディウム中で蛋白から遊離した状態で存在)の変化を調べ、内在化の有無を検討した。

## 3. 担がんマウスでの標識抗体の体内分布評価とイメージング

HuH-7細胞 $2 \times 10^6$ 個をマトリゲルと共にヌードマウスに皮下投与し、移植腫瘍を作成した。同じマウスの対側にはEGFR陰性のコントロール細胞としてcolon26を皮下投与した。担がんマウスにIn-111標識抗体(37kBq/5 $\mu$ g)を静脈内投与し、投与24、48、96時間後にマウスを屠殺し、血液を採取、腫瘍、各臓器を摘出し、それぞれ放射能を計測し、抗体の体内分布・腫瘍集積性を評価した。さらに、担がんマウスにIn-111標識抗体(1.85MBq/26 $\mu$ g)を投与し、経時的なイメージングを行った。

## II：血管新生イメージング研究

### 1. 血管新生モデルの作製

高濃度(20mg/ml)、通常濃度(10mg/ml)のマトリゲルにVEGF、ヘパリン、およびbFGFを添加したもの、添加しないものを調整し、約300 $\mu$ lをヌードマウスの皮下に注入した。7-10日後、マトリゲルを摘出し、血管の構築を検討した。

### 2. 肝がん細胞移植腫瘍での血管形成

ヌードマウス皮下にHuH-7細胞 $2 \times 10^6$ 個またはSK-HEP1細胞 $2 \times 10^6$ 個をマトリゲルとともに投与、4-6週間後、腫瘍を摘出、ホルマリン固定の後、パラフィン切片を作成、CD34に対する抗体を用いて免疫組織染色を行い血管の形成を観察した。

### 3. 環状RGDペプチド4量体の $\alpha v \beta 3$ インテグリン高発現腫瘍への集積

環状RGDペプチド4量体にサイクロムを結合した化合物(グルノーブル大学Dumy教授らにより合成)の1mM水溶液と $^{64}\text{CuCl}_2$ のクエン酸アンモニウム溶液(約740MBq/ml)を1:1で混和、37°Cで1時間インキュベートし、ほぼ100%の放射化学的純度で $^{64}\text{Cu}$ 標識環状RGDペプチド4量体を得た。 $\alpha v \beta 3$ インテグリンを高発現する $\beta 3$ インテグリン遺伝子導入HEK293細胞およびコントロールとして $\beta 1$ インテグリン遺伝子を導入したHEK293細胞をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍の形成を待つて、約11MBqの $^{64}\text{Cu}$ 標識環状RGDペプチド4量体を尾静脈より投与、1、3、6、20時間後に小動物PETにより撮像し、腫瘍および他の臓器への $^{64}\text{Cu}$ 標識環状RGDペプチド4量体の集積を検討した。

#### 4. VEGF の放射性標識と血漿中安定性

マウス VEGF<sub>120</sub> 溶液 (0.2mg/ml, 30mM リン酸緩衝液, pH7.5) 20 $\mu$ l に 3.7MBq の <sup>125</sup>I-NaI 溶液を加え、さらに 1 $\mu$ g のクロラミン T 溶液を付加、5 分間室温にて反応させた。反応後、Sephadex G25 spin カラムにより、標識 VEGF と遊離 <sup>125</sup>I を分離、標識率と VEGF 1 分子あたりに結合した <sup>125</sup>I の数を検討した。マウス血漿 60 $\mu$ l と約 6 kBq の <sup>125</sup>I 標識 VEGF を 37°C で一定時間培養し、セルロースアセテート電気泳動と PD10 カラム抽出により、<sup>125</sup>I 標識 VEGF の安定性を検討した。

(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

##### I : EGFR イメージング研究

##### 1. ヒト肝がん細胞株および移植腫瘍での EGFR 発現の検討

ウェスタンブロット法では、A431 細胞で最も強い EGFR の発現が確認された。4 種の肝細胞がん株の中では、HuH-7 が最も高い発現を示し、SK-Hep1 がこれに続いた (図 1)。Li-7 でもわずかな発現が認められたが、HepG2 では殆ど発現を認めなかった。

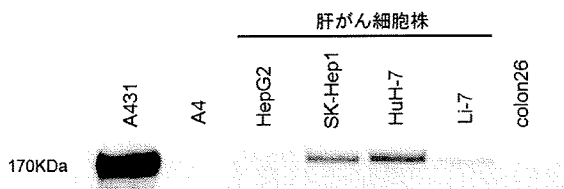


図 1. がん細胞株の EGFR 発現

次いで、免疫組織染色により、移植腫

瘍での EGFR 発現を見たところ、インビトロで EGFR 発現の高かった A431、HuH-7 腫瘍において、EGFR ががん細胞膜に高発現していることが確認された。一方、インビトロで発現の認められなかった A4 腫瘍では、インビボでも EGFR の有意な発現を認めなかった (図 2)。

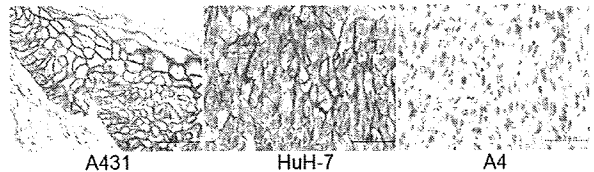


図 2. 移植腫瘍の免疫組織染色

##### 2. ヒト肝がん細胞株と放射性標識抗体とのインビトロでの結合性と内在化

以上の結果より、HuH-7 細胞を EGFR 陽性のヒト肝がん細胞として、放射性標識抗体での検討に用いることとした。

I-125 標識、In-111 標識抗体を、種々の濃度 (~10<sup>7</sup> 個) の HuH-7 細胞と、4°C で 1 時間反応させたところ、標識抗体の高い細胞結合性が確認された (図 3)。

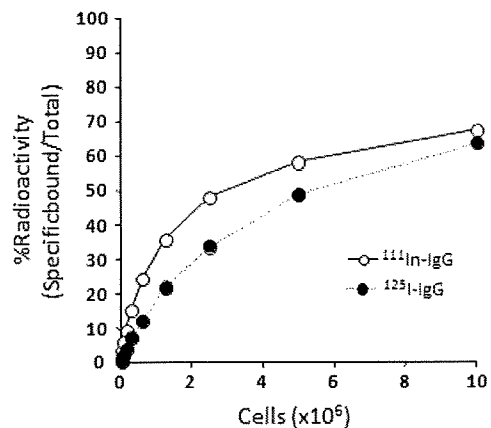


図 3. インビトロ細胞結合実験

次いで、標識抗体が HuH-7 細胞に結合した後の放射能の局在の経時変化を追った。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4)、一方、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5)。

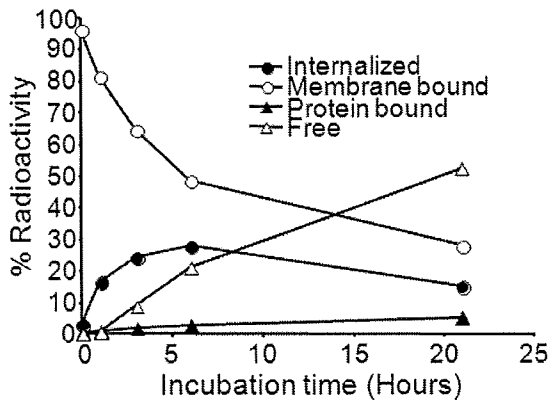


図4. I-125 標識抗体の内在化

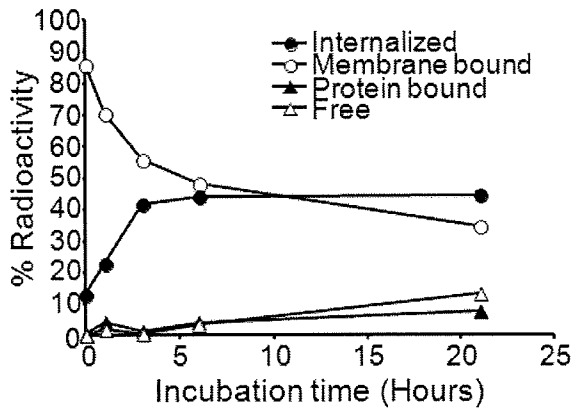


図5. In-111 標識抗体の内在化

### 3. 担がんマウスでの標識抗体の体内分布評価と SPECT イメージング

HuH-7 細胞をマトリゲルと共にヌードマウスに皮下投与することにより、投与4~5週間で直径8~10mmの皮下腫瘍が形成された。In-111 標識抗体の体内分布の検討では、血液や主要臓器の放射能は時間と共に徐々に減少したのに対し、EGFR 陽性 HuH-7 腫瘍への集積は時間と共に増加した(24 時間後:  $10.8 \pm 1.8\%ID/gram \rightarrow 48$

時間後:  $22.4 \pm 4.5\%ID/gram \rightarrow 96$  時間後:  $32.4 \pm 6.1\%ID/gram$ )。これにより、腫瘍と血液の集積比は投与24時間後の0.9から、投与96時間後には4.2まで上昇した。一方、EGFR 陰性のコントロール腫瘍への集積は低く、時間と共に減少した(図6)。

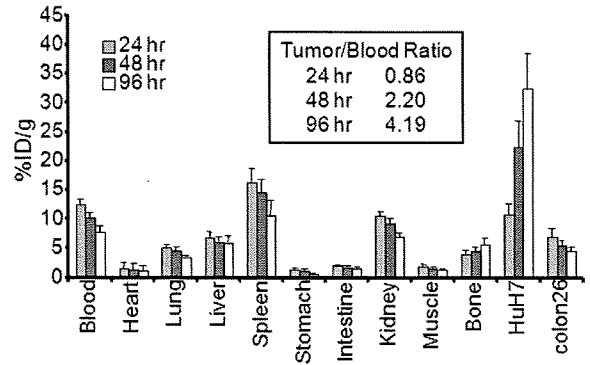


図6. In-111 標識抗体の体内分布

経時的に撮像したプランナー像でも、EGFR 陽性腫瘍が経時的に明瞭に描出され、体内分布の結果を裏付けるものであった(図7)。

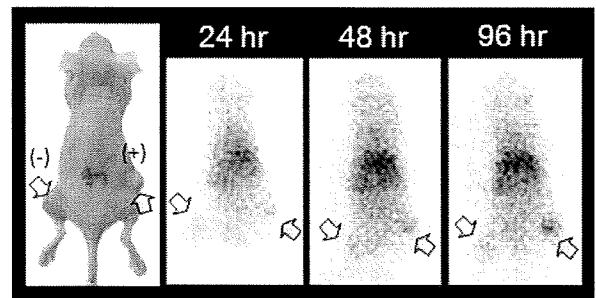


図7. 担がんマウスのイメージング

## II: 血管新生イメージング研究

### 1. 血管新生モデルの作製

VEGF、ヘパリン、およびbFGFを添加した高濃度および通常濃度のマトリゲルではヌードマウスの皮下に注入7-10日後に血管の形成が観察されたものが存在したが、その程度は様々であった。高濃度と通常濃度のマトリゲルでは、高濃度のものではもろさが目立ち、また、通常濃度

のものではマトリゲルが皮下に広がり、いずれの場合もモデルとして好ましい条件を十分満たすことは出来なかった。

## 2. 肝がん細胞移植腫瘍での血管形成

ヌードマウスの皮下に作製した SK-HEP1 細胞由来の腫瘍では、血管は周辺部分に多く観察された。これに対し、HuH-7 細胞由来の腫瘍においては、血管は腫瘍の内部に豊富に認められた。

## 3. 環状 RGD ペプチド 4 量体の $\alpha v \beta 3$ インテグリン高発現腫瘍への集積

$^{64}\text{Cu}$  標識環状 RGD ペプチド 4 量体は投与後 1 時間から  $\alpha v \beta 3$  インテグリン高発現腫瘍および腎臓に高い集積を示した。時間とともに他臓器から放射能が減少するに従い、 $\alpha v \beta 3$  インテグリン高発現腫瘍はより鮮明に描出されたが、腎臓の放射能は終始高く、投与 20 時間後においても腫瘍より高い集積を示した。コントロールの腫瘍では放射能の集積は低く、 $^{64}\text{Cu}$  標識環状 RGD ペプチド 4 量体は  $\alpha v \beta 3$  インテグリン高発現腫瘍に特異的に集積し、その描出に有用であることが示された。

## 4. VEGF の放射性標識と血漿中安定性

標識効率は約 28% で、VEGF 1 分子あたり 0.5 個の  $^{125}\text{I}$  が導入された。また放射化学的純度は 95% 以上であった。マウス血しょう中での安定性を調べたところ、培養 72 時間後でも 95% 以上が安定に存在していた。

## D. 考察

EGFR は肝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。本年度は、放射性標識したヒト抗 EGFR 抗体 048-006 を用いた肝がんイメージングの基礎的検討を行った。種々の肝がん細胞株の中で、最も高い EGFR 発現を示す HuH-7 細胞を用いた検討より、放射性標識抗体は HuH-7 細胞に結合し、その後内在化することがわかった。ヨード標識抗体は内在化の後に脱ヨード化を受け細胞外に逸脱してしまうことから、イメージングには内在化の後にも細胞内に放射能が留まる In-111 等の金属核種での標識が適していると考えられる。実際に、In-111 標識抗体は EGFR 発現肝がん移植腫瘍に高集積を認め、そのイメージングにも成功した。しかし、肝臓への生理的集積が比較的高く、肝 1 グラムあたりの放射能集積量は腫瘍よりは低いものの、イメージング上は肝への集積が目立つ結果となり、肝内に存在する腫瘍の検出には、肝の生理的集積の低減が必須である。そこで次年度は、肝集積の低減に向けて、抗体の低分子量化 (Fab や scFv の応用) や感度・定量性に優れる PET イメージングへの展開に向けた研究を行うこととする。

腫瘍組織内の血管新生は、がんの浸潤・転移形成に深く関わるとされ、肝がんに対する抗血管新生療法もはじまっていることから、血管新生をターゲットとした肝がんイメージングの可能性についても検討を開始した。まず、新生血管のモデルとしてこれまでも報告のあるマトリゲルをもちいたモデルについて検討

したが、強度、形態など十分に満足できるものを実現するには至らず、さらなる検討が必要と思われた。ヒト肝がん細胞の腫瘍モデルでは、HuH-7 細胞、SK-HEP 細胞が異なった血管形成の特徴を示したことから、異なる性質を持つ新生血管のモデルとして利用できるものと期待できる。新生血管内皮に発現する  $\alpha v \beta 3$  インテグリンに高い特異性を持って結合することが知られる環状 RGD ペプチド 4 量体は、温和な標識条件で 100%に近い標識率で  $^{64}\text{C}$  標識が可能であった。この標識環状 RGD ペプチド 4 量体は  $\alpha v \beta 3$  インテグリン高発現腫瘍に特異的に高集積し、 $\alpha v \beta 3$  インテグリンを高発現する新生血管内皮の PET イメージングにも有効である可能性が示された。VEGF を分子プローブとする新生血管のイメージングは、現在行われている血管新生を標的とする治療薬の直接のターゲットとなる VEGFR を描出しようとするもので、治療薬の効果判定、効果予測に有効でと期待される。今回は今後モデルとして使用が予定されるマウスの VEGF について  $^{125}\text{I}$  による標識条件の検討を行い、VEGF の活性の維持が十分期待できる標識条件を決定することが出来た。今後、マウスの血管新生モデルを用いて、 $^{64}\text{C}$  標識環状 RGD ペプチド 4 量体や  $^{125}\text{I}$  標識 VEGF による新生血管の検出や、血管新生抑制薬剤の効果判定のための分子プローブとしての有用性についての基礎検討をさらに進めていく予定である。

#### E. 結論

EGFR と血管新生というがんの診断・治療に重要な二つの因子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

を行っている。

放射性標識したヒト抗 EGFR 抗体 048-006 は、インビトロで HuH-7 細胞に結合し、その後内在化した。In-111 標識 048-006 は HuH-7 移植腫瘍に特異的な高集積を示し、移植腫瘍のイメージングに成功し、EGFR を標的とする肝がんイメージングの可能性が示された。

血管新生イメージングについては、マウスにおける血管新生モデルの作製に取り組んだ。また、 $\alpha v \beta 3$  インテグリンに特異的に結合する標識環状 RGD ペプチド 4 量体の  $^{64}\text{C}$  標識条件、VEGFR に結合する VEGF の  $^{125}\text{I}$  標識条件を決定することができた。 $^{64}\text{Cu}$  標識環状 RGD ペプチド 4 量体を用いてマウスモデルに移植した  $\alpha v \beta 3$  インテグリン高発現腫瘍の PET イメージングに成功し、今後、新生血管をターゲットとするイメージングに期待が持たれる。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

#### 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

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、特に早期の肝癌で過剰発現を示すことを見出し、Bmi-1 の下流で、ABC トランスポーターの 1 種 ABCB1(MDR1)が発現亢進していることを示した。ABCB1 も特に早期肝癌で発現亢進を認め、早期癌の治療を考える上で重要な所見と考えられた。登録施設において切除された肝細胞癌症例から作製された Tissue Microarray 検体（腫瘍部・非腫瘍部）について、悪性度マーカー候補分子である Cytokeratin19 発現を検討した。178 例中 22 例（12.4%）が陽性であり、分化度が低いほど陽性率が高い傾向がみられた。現在嚴重な経過観察中である。

#### 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。登録施設において切除された肝細胞癌症例（腫瘍部・非腫瘍部）から Tissue Microarray (TMA)を作製し、同様に検討する。

（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. 研究概要

#### 1) 肝多段階発癌における Bmi-1 の発現異常

前年度までの検討から、Bmi-1 は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。Bmi-1 の下流のターゲット分子として既に報告されている p16 以外の分子につき、マイクロアレイ解析から候補分子として ABC トランスポーターの 1 種 ABCB1(MDR1)を抽出し、さらに検討した。in vitro での Bmi-1 の過剰発現並びに発現抑制と相関して ABCB1 発現が変化することを示した。さらに細胞株並びに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、両者が有意に相関を示しており、ABCB1 発現は、早期肝癌で特に高いことを示した。

#### 2) TMA による Cytokeratin (CK)19 陽性肝細胞癌の検討

登録施設において切除された肝細胞癌症例から作製された TMA 標本（腫瘍部・非腫瘍部）について、CK19 発現を検討した。CK19 発現については、肝細胞癌組織中 5%以上の CK19 陽性腫瘍細胞を認める症例を CK19 陽性肝細胞癌症例とした。その結果、178 例中 22 例（12.4%）が、CK19 陽性肝細胞癌であった。肝細胞癌分化度別 CK19 陽性肝細胞癌の内訳は、低分化肝細胞癌(10/29, 34.5%)、中分化肝細胞癌(12/124, 9.7%)、高分化肝細胞癌(0/25, 0%)であり、分化度が低いほど発現が高い傾向がみられた。施設毎の陽性率は、7.7%–19.0%であった。CK19 陽性肝細胞癌該当症例については各施設へ連絡済みであり、現在嚴重な経過観察中である。

### D. 考察

#### 1) 肝多段階発癌における Bmi-1 の発現異常

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ズの活性化に関与していることが報告されている。我々の検討からは、肝細胞癌においても Bmi-1 は発現の亢進を認め、特に発癌の早期における肝細胞の不死化へ関与している可能性が示唆された。一方で、肝細胞癌においては、p16 は他の機序によっても不活化していることから、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 ABCB1 が、良好な相関を示し発現亢進していることを見出した。ABCB1 は発癌早

期における種々のストレス抵抗性に関与している可能性が示唆され、また、早期癌の治療戦略を考える上でも重要な所見と考えられた。以上の知見は、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られ、その制御機構並びに意義につき研究を続けている。

## 2) TMAによるCytokeratin (CK)19陽性肝細胞癌の検討

CK19は、肝臓のヘリング管に存在する肝前駆細胞(Hepatic progenitor cell)を認識する有用なマーカーの一つである事が近年の報告でわかってきている。また5-15%の肝細胞癌にCK19陽性を示すこと、CK19陽性肝細胞癌はCK19陰性肝細胞癌に比べ、高率に再発をきたし、予後不良である事が多施設から報告されている。今までの報告は、外科切除検体を用いたretrospective studyであるのに対し、本研究班では、外科切除の際に採取されたTMA検体を用いたprospective studyをおこなっている。TMA検体は、外科切除検体と比較すると約50分の1程の少量検体であるが、本研究班でのTMA検体におけるCK19陽性率は、既報告の外科切除検体での検討とほぼ同様であることから、CK19陽性の有無を確認する上で十分有用ではないかと考えられる。今後prospective studyを継続して行う事で、現在未だ不明瞭であるCK19陽性肝細胞癌症例の転移、再発様式の解明につながると期待される。

## 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の発現異常とそれに伴うABCB1の発現、肝細胞癌悪性度マーカーCK19の有用性解析については、順調に成果が出ており、今後研究を一層推進する。

## G.研究発表

### 1.論文発表

1. Effendi K, Mori T, Komuta M, Masugi Y, Du W, Sakamoto M. Bmi-1 gene is upregulated in early-stage hepatocellular carcinoma and correlates with ATP-binding cassette transporter B1 (ABCB1) expression. *Cancer Sci*, in press.
2. Sakamoto M. Early HCC: diagnosis and molecular markers. *J Gastroenterol.* 2009;44 Suppl 19:108-11.
3. 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;89(4):425-32.
4. International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia.



Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology*. 2009;49(2):658-64.

5. Ojima H, Kanai Y, Iwasaki M, Hiraoka N, Shimada K, Sano T, Sakamoto Y, Esaki M, Kosuge T, Sakamoto M, Hirohashi S. Intraductal carcinoma component as a favorable prognostic factor in biliary tract carcinoma. *Cancer Sci*. 2009;100(1):62-70

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

坂元亨宇、他2名。血中のCAP2の測定方法、肝臓疾患の検出方法及び血中CAP2測定用検出キット。特願2009-060966、2009

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

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：** 肝癌細胞株・臨床検体を対象に、CpG island の過剰メチル化ならびに遺伝子発現をゲノムワイドに網羅的に探索することで、メチル化異常により高頻度かつ癌特異的に発現が抑制される肝癌抑制遺伝子候補を同定した。これらは、発現回復させることで細胞増殖抑制作用を示し、肝癌における診断マーカーならびに治療標的となる可能性がある。

### 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。肝癌の高危険群を分子病理学的に予測する試みがなされ一定の成果をあげてきているが、個性診断に耐えるマーカー群の同定には至らず適切な治療時期を失した患者も多いことから、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な分子病理学的解析に基づき、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：** すでに昨年度に得られている、肝癌臨床検体 100 例を対象にした自作 bacterial artificial chromosome

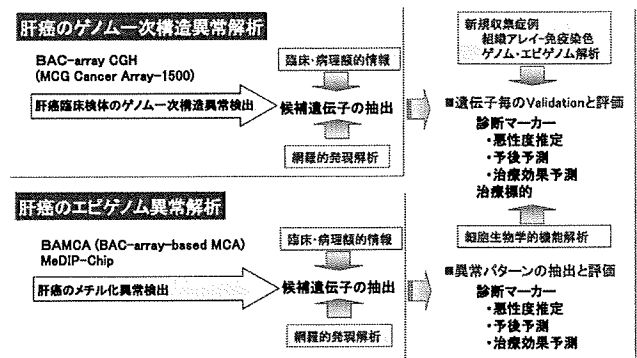


図 1. 肝癌のゲノム・エピゲノム解析による分子標的探索

(BAC)アレイ (MCG Cancer Array-800 ならびに MCG Cancer Array-1500) を用いたアレイ comparative genomic hybridization (CGH) 解析の結果を、その後の追跡調査から得られてきている再発などの臨床病理学的データと比較検討し、各ゲノム一次構造異常 (ゲノムコピー数異常) の臨床病理学的予測因子としての有用性を検討した。

**B 2. 異常メチル化の標的となる肝癌抑制遺伝子候補の同定と評価：** 肝癌細胞株 (Hep 3B、Hep G2、HuH7) と非腫瘍部肝組織を用い Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) 法で得られ DNA を CpG island array (Agilent 社)

を行い、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。一方、非腫瘍部肝組織に比較して肝癌細胞株 (Hep 3B、Hep G2、HuH7) において発現が低下しかつ 5-aza 2'-deoxycytidine (5-aza-dCyd) 処理による発現回復が認められる遺伝子をオリゴアレイ (Whole Human Genome 4x44K、Agilent 社) で網羅的に抽出した。これらの結果を統合することにより、CpG アイランドのメチル化により発現が癌細胞特異的に低下している癌抑制遺伝子候補を選別した (図 2)。

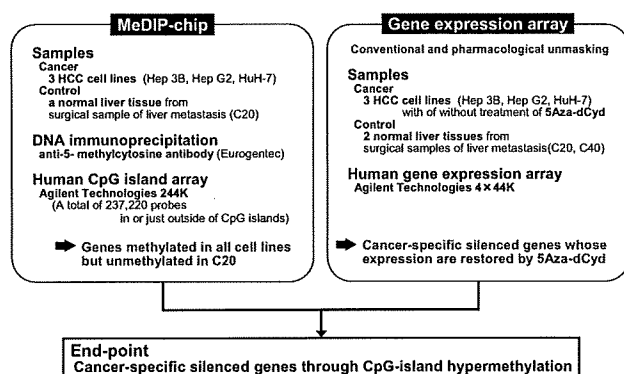


図2. 肝癌特異的にメチル化の標的となる癌抑制遺伝子候補の同定戦略—候補遺伝子については、肝癌臨床検体における腫瘍部・非腫瘍部のセットで、CpG アイランドのメチル化状況の bisulfite シークエンス法や combined bisulfite restriction analysis (COBRA) 法での評価と発現の TaqMan PCR による評価により、癌細胞特異的な DNA メチル化による発現抑制の確認を行った。

#### (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

C 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: 自作 BAC アレイ (MCG Cancer Array-800 ならびに 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領域について、継時的に更新された臨床病理学的データとの比較検討を行うことで、特定の表現型と関連する異常領域とその標的遺伝子候補の選択が可能であることが確認された。

C 2. 異常メチル化の標的となる肝癌抑制遺伝子候補の同定と評価: 図 2 に示した戦略に従い、統合的エピゲノム解析を実施した結果、肝癌細胞特異的に DNA メチル化を生じ発現が抑制される遺伝子候補として、11 個 (遺伝子 1-11 と仮称) の遺伝子が同定された (図 3)。これらの遺伝子に関して、19 種類の肝癌細胞株パネルを用いた CpG island の DNA メチル化 (COBRA 法) ならびに発現解析 (Taqman PCR) により、高

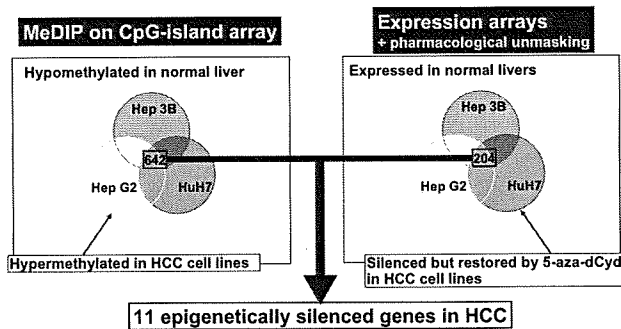


図3. 肝癌特異的にメチル化の標的となり発現抑制を受ける遺伝子候補の抽出頻度のメチル化とそれに伴う発現低下が生じていることが確認された。また、11個の遺伝子うち1つは、既知のメチル化標的癌抑制遺伝子として報告がある遺伝子であったことから、統合解析が有効であることが推測された。

さらに、肝癌臨床検体においても、比較的高頻度の癌部特異的メチル化が認められる3遺伝子について、メチル化と発現とを比べてみると、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）、これら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（学会発表1、2、6）

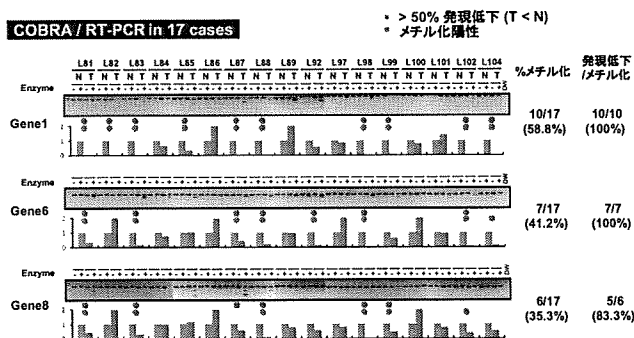


図4. 抽出された肝癌抑制遺伝子候補の肝癌臨床例における癌部特異的なメチル化と発現抑制の確認。3遺伝子(遺伝子1、6、8)では、高率に癌部特異的メチル化とこれに伴う発現低下が認められた。

#### 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。特に、統合的エピゲノム解析により同定された肝癌抑制遺伝子候補群については、メチル化のみでなく、特異抗体を用いた免疫染色などにより発現の大規模解析を行うことで、臨床病理学的因子との関連を今後明らかにしていく必要がある。このようなアプローチは、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・キットの開発につながるものである。

#### 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