

図 4.  $^{125}\text{I}$  標識抗体 (scFvLC) の局在の経時変化

## 2. 担がんマウスでの低分子量標識抗体 (048-006 scFvLC) の体内分布評価

In-111 標識抗体の体内分布の検討では、多くの臓器、および EGFR 陽性 HuH-7 腫瘍の放射能は時間と共に緩徐に減少した。血中クリアランスは非常に早く、腫瘍と血液の集積比は投与 1 時間後の  $1.3 \pm 0.5$  から、投与 12 時間後には  $6.4 \pm 2.7$  まで上昇した。しかし、肝臓への集積は 5% 前後と腫瘍より高く、さらに  $150\% \text{ID/g}$  を越える腎臓への非常に高い集積がみられた。(図 5)。

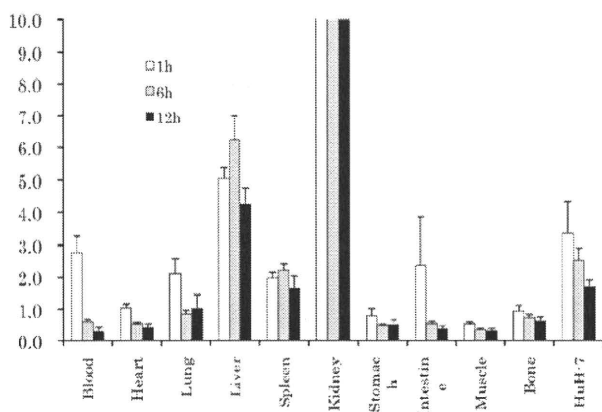


図 5. In-111 標識 scFvLC の体内分布

## II: 血管新生イメージング研究

### 1. 肝がん細胞移植腫瘍における $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現と血管新生についての検討

SK-Hep および HuH-7 ヒト肝がん細胞をヌードマウスに皮下投与して作製した移植腫瘍では、両者とも腫瘍細胞に  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンの発現は認められなかった。両腫瘍の血管は CD31 に対する抗体により明瞭に染色され、両者を比較すると、HuH-7 細胞の皮下移植腫瘍でより血管が豊富な傾向が見られた。

### 2. $^{64}\text{Cu}$ 標識環状 RGD ペプチド 4 量体の肝がん細胞移植腫瘍への集積および腫瘍内分布

$^{64}\text{Cu}$  標識環状 RGD ペプチド 4 量体は投与後 1 時間から HuH-7 移植腫瘍に低〜中程度の集積を示した (図 6)。腎臓等への高い集積は以前に  $\alpha_v\beta_3$  インテグリン高発現腫瘍移植モデルで経験した傾向と同様であった。 $^{64}\text{Cu}$  標識環状 RGD ペプチド 4 量体の HuH-7 移植腫瘍内の分布は不均一で、その分布を近隣切片にて観察した血管の CD31 染色像と比較したところ、 $^{64}\text{Cu}$  標識環状 RGD ペプチド 4 量体の集積が高かった部位と血管が多くみとめられる部位は重なる部分が多いことが観察された。

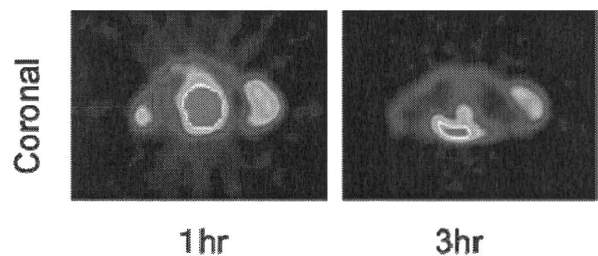


図 6. HuH-7 担がんマウスの PET イメージング

### 3. $^{125}\text{I}$ 標識 VEGF の肝がん細胞への結合および担がんマウスでの体内分布についての検討

$^{125}\text{I}$  で標識した、マウス VEGF<sub>120</sub>, ヒト VEGF<sub>121</sub> および VEGF<sub>165</sub>, の HuH-7, SK-HEP, 2H-11 細胞との結合率はいずれの細胞の場合も数%以下と

低かった。また、 $^{125}\text{I}$  標識ヒト VEGF<sub>121</sub> の HuH-7 皮下腫瘍担当がんマウスの体内動態は、投与後 2 時間で腫瘍/血液比が 0.5 と低く、また、高い腎臓 (23.11.8 %ID/g) と胃 (34.5±5.0) への集積が観察された。

#### 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と期待される。本年度は、昨年度に引き続き、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、特に抗体の低分子量化によって IgG で観察された肝臓への高い集積の改善や血中からのクリアランスの促進による早期のイメージングの実現が可能かについての検討を中心に行った。肝がん細胞株の中で高い EGFR 発現を示す HuH-7 細胞を用いた検討より、放射性標識 scFvLC は IgG に比べ、若干親和性が低下しているものの IgG と同程度の HuH-7 細胞に対する結合能有し、細胞に結合後は内在化することがわかった。細胞への内在化が認められたことから scFvLC においてもイメージングには In-111 のような金属核種による標識が適すると判断された。HuH-7 を皮下に移植した担当がんマウスの体内動態から、In-111 標識 scFvLC では IgG に比べて血中からのクリアランスの早さを反映して、早期に高い腫瘍/血液比が実現できることが明らかとなった。しかし HuH-7 腫瘍への集積量は IgG では投与 1 日後で 10 %ID/g、2 日後では 20 %ID/g に達したのに対し、scFv-LC では投与 1 時間後でも 5 %ID/g に満たなかったものが経時的に減少するなど、IgG に比べて低く、しかも scFvLC にすることに

よっても肝臓への集積の低減はみられなかった。また、腎臓に対する集積が非常に高いなど、腫瘍イメージングにとって好ましい体内挙動は実現されなかった。一種類の抗体についての知見であるため一般化はできないが、少なくとも本抗体に関する限り、IgG から scFvLC への低分子量化は EGFR 発現のイメージングにとって有利には働かないと考えられた。

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りとされ、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は予後予測、治療効果判定への有効性が期待される。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 量体の  $^{64}\text{C}$  標識体は、昨年度までの検討において  $\alpha_v\beta_3$  インテグリン高発現腫瘍に特異的に高集積を示すことが確認されたことから、 $\alpha_v\beta_3$  インテグリンを高発現する新生血管内皮の PET イメージングにも応用可能と期待された。がん細胞には細胞自体が  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンを発現するものも存在するが、今回の検討では、本化合物による新生血管イメージングの可否をより明確にとらえるため、細胞自体には  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンの発現が認められない肝がん細胞株をモデルに選定した。 $\alpha_v\beta_3$  インテグリンの発現が低く、腫瘍結節内の血管形成が比較的豊富であった HuH-7 皮下移植腫瘍の PET 撮像では、 $^{64}\text{C}$  標識環状 RGD ペプチド 4 量体の投与後、1 時間および 3 時間後において、 $\alpha_v\beta_3$  インテグリンを高発現細胞の移植腫瘍での結果に比較するとかなり集積は低いものの、明瞭な腫瘍の描出が可能であった。さらにこの腫瘍結節を摘出後に組織切片を作製、オートラジオグラフィにて検出した腫瘍内の  $^{64}\text{C}$  標識環状 RGD ペプチド 4 量体の分布を近隣の切片を用いて免疫組織染色によって検出した新生血管の分

布と比較すると、おおむね重なる傾向がみられ、本標識体により腫瘍内の血管新生を反映した腫瘍イメージングが可能であると示唆された。

血管新生をターゲットとするイメージングについては放射性標識した VEGF による VEGFR イメージングについての検討も昨年引き続き行ったが、残念ながら、in vivo での細胞への結合も低く、in vitro での移植腫瘍への集積も少ない結果に終わり、標識方法の改善等多くの検討が必要と考えられる。

#### E. 結論

本年度は、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継続して行った。

放射性標識したヒト抗 EGFR 抗体 048-006 は、IgG から低分子量化した scFvLC においてもインビトロで HuH-7 細胞に結合し、その後内在化した。In vivo では scFvLC は早期に高い腫瘍/血液比を与えるものの、EGFR 発現腫瘍への集積量は IgG に比較して 2 分の 1 以下に低下し、scFvLC への低分子量化は必ずしもイメージングに有利には働かないものと判断された。

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 Cu-64 標識体は細胞自体には  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンの発現が認められない移植腫瘍に低～中程度の集積を示し、また、その腫瘍内分布が申請血管の分布とおおむね重なることから、本標識体は腫瘍における新生血管のイメージングに有効である可能性が示唆される。

#### 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

- Galibert M, Jin ZH, Furukawa T, Fukumura T, Saga T, Fujibayashi Y, Dumy P, Boturyn D. RGD-cyclam conjugate: synthesis and potential application for positron emission tomography. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010 15;20:5422-5.

##### 2. 学会発表

- Chizuru Sogawa, Atsushi Tsuji, Takako Furukawa, Mitsuru Koizumi, Yoshikazu Kurosawa, Tsuneo Saga, et.al. Molecular Imaging of Hepatocellular Carcinoma using Human Anti-EGFR Monoclonal Antibody. World Federation of Nuclear Medicine and Biology 2010. Cape Town, South Africa. 2010.9.18-23.
- Chizuru Sogawa, Atsushi Tsuji, Takako Furukawa, Mitsuru Koizumi, Yoshikazu Kurosawa, Tsuneo Saga, et.al. Evaluation of a Novel Human Anti-EGFR Monoclonal Antibody as an Imaging Probe. World Molecular Imaging Congress 2010. Kyoto, Japan. 2010.9.8-11.
- Zhao-Hui Jin, Takako Furukawa, Toshimitsu Fukumura, Tsuneo Saga, Yasuhisa Fujibayashi, et.al. PET-Imaging of Tumor  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression with a Novel Probe  $^{64}\text{Cu}$ -cyclam-RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>. World Molecular Imaging Congress 2010. Kyoto, Japan. 2010.9.8-11.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

- 特許取得：なし
- 実用新案登録：なし
- その他：特になし

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 肝細胞癌においては、TGF- $\beta$  シグナル伝達関連分子の遺伝子変異は見つかっておらず、TGF- $\beta$  シグナルの役割は明らかにされていない。マイクロアレイ解析並びに免疫組織学的解析により、肝細胞癌において TGFBR2 の発現低下は、肝内転移や術後再発など、癌悪性化と関連しており、頻度は少ないながらも小型の肝癌で高悪性度の癌を検出するうえでも有用である可能性を示した。MAPK シグナルのクロストークや TGF- $\beta$  スーパーファミリー全体の詳細は明らかとなっていないが、TGFBR2 の発現低下が、主に TGF- $\beta$  による細胞増殖抑制効果の阻害に貢献していると考えられた。

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。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

#### 肝細胞癌の悪性度と TGF- $\beta$ シグナル伝達系の異常

肝細胞癌細胞株を免疫不全マウスの肝臓へ移植した際の肝内転移能により、細胞株を、高転移株 (KYN-2, Li7) および低転移株 (KIM-1, HepG2, PLC/PRF/5) の二群に分類した。これら細胞株を移植したマウス肝臓内で形成された腫瘍をマイクロアレイ解析にかけ、二群間で発現量に差のある遺伝子を抽出した結果、II 型 TGF- $\beta$  受容体 (TGFBR2) 遺伝子の発現低下が高転移株で見出された。RT-PCR およびウエスタンブロット法により、高転移株での TGFBR2 発現は mRNA およびタンパクレベルで減少していることが確認された。

肝細胞癌臨床検体の免疫組織染色を行った結果、TGFBR2 の膜局在が検出された背景の肝細胞と比べ、約 25% の結節では TGFBR2 の染色性低下が認められた。TGFBR2 の染色性と臨床病理学的データとの比較により、TGFBR2 発現の低下した症例は、腫瘍径が大きく、分化度が低く、門脈侵襲が陽性であり、肝内転移が陽性であるなど、肝細胞癌の悪性度因子と有意に相関していることが示された。さらに、これらの症例は、切除術後の再発期

間が短いことも示された。

さらに、腫瘍径が 2 cm 以下の肝細胞癌で TGFBR2 の発現低下が認められた 6 結節 (5 症例) に注目すると、2 年以内に再発している症例が 2 例存在した。その内の 1 症例では、肝移植後に、骨および肝臓への転移が確認された。

肝細胞癌高転移株の Li7 および低転移株 PLC/PRF/5 を用い、TGF- $\beta$  に対する応答性を検証した。PLC/PRF/5 において見られる TGF- $\beta$  による細胞増殖抑制効果は、TGFBR2 の発現が低下している Li7 においては認められなかった。また、TGF- $\beta$  によって発現が誘導される遺伝子である、SERPINE1 (PAI-1) や CDKN1A (p21)、SMAD7 の発現増加が PLC/PRF/5 でのみ認められた。PLC/PRF/5 では、上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) のマーカーである Vimentin の TGF- $\beta$  による発現誘導も確認されたが、細胞運動能は TGF- $\beta$  処理によって低下した。SMAD3 のリンカー領域のリン酸化に特異的な抗体を用いたウエスタンブロットにより、PLC/PRF/5 および Li7 のどちらからも SMAD3 のリン酸化が検出された。肝細胞癌臨床検体の免疫組織染色から、がん細胞における SMAD4 の核移行と TGFBR2 の発現とは相関が見られなかった。

### D. 考察

TGF- $\beta$  シグナル伝達関連分子である SMAD4 は膵がんなどで、TGFBR2 は大腸がんなどで遺伝子変異が見つかっていることから、これらの遺伝子はがん抑制遺伝子として認識されている。しかし TGF- $\beta$  は、細胞増殖を抑制する他に免疫抑制や EMT 誘導などを

行うことから、がん悪性化への関与も指摘されている。肝細胞がんにおいて、TGF- $\beta$  シグナル伝達関連分子の遺伝子変異は見つからず、TGF- $\beta$  シグナルの役割は明らかにされていない。

我々は、約 25%の肝細胞がん症例において TGFBR2 の発現が低下しており、これが肝内転移や術後再発などと相関していることを見出した。腫瘍径が 2 cm 以下の結節では TGFBR2 の発現低下は稀(約 10%)であることから、TGFBR2 の発現は、肝細胞癌の悪性化進展にともない減少してゆくと思われる。しかし TGFBR2 の発現低下が見られる腫瘍径 2 cm 以下の小型肝細胞癌では、5 症例中 2 症例で術後 2 年以内に再発していることから、TGFBR2 低下症例では早期の段階で悪性度が高いと考えられる。

TGF- $\beta$  と結合した TGFBR2 は、TGFBR1 とともに、SMAD2 または SMAD3 の C 末端セリン残基をリン酸化することにより細胞内へシグナルを伝達する役割を担っている。リン酸化を受けた SMAD2 や SMAD3 は、SMAD4 とともに核内へ移行し、様々な遺伝子の転写調節を行う。CDKN1A (p21) は TGF- $\beta$  によって発現が誘導される遺伝子のひとつであり、細胞増殖抑制に寄与している。TGFBR2 を発現する肝細胞癌細胞株では、TGF- $\beta$  刺激による p21 の発現上昇および細胞増殖抑制が見られたが、TGFBR2 の発現が低下している細胞株ではどちらも見られなかった。肝細胞癌細胞株における TGF- $\beta$  応答性は、TGFBR2 の発現に依存していると思われる。TGF- $\beta$  は、EMT を誘導することによりがん細胞の運動能を亢進していることが、多種のがんで報告されている。EMT のマーカー分

子である Vimentin は、TGFBR2 を発現する肝細胞癌細胞株でのみ TGF- $\beta$  によって誘導された。しかしトランスウェルを用いて TGF- $\beta$  処理した細胞の運動能を評価した結果、EMT が誘導されているはずの TGFBR2 発現細胞の運動能は見かけ上減少していた。

これは、TGF- $\beta$  による増殖抑制と EMT 誘導が同時に起こったが、増殖抑制効果が優勢だったために移動細胞数が減少した結果と考えられる。これらのことから、肝細胞癌における TGFBR2 の減少は、TGF- $\beta$  による増殖抑制効果の低減に関与していると推測される。

SMAD3 は、TGF- $\beta$  受容体からリン酸化を受ける以外に、MAPK シグナル経路を介して ERK や JNK からリン酸化を受けることが知られている。その際は、SMAD3 の C 末端ではなく、リンカー領域(SMAD3 アミノ酸配列の中央付近)にあるセリン残基がリン酸化を受ける。肝細胞癌細胞株における SMAD3 リンカー領域のリン酸化状態を調べたところ、TGFBR2 の発現に依存せず、SMAD3 リンカー領域がリン酸化を受けることが確認された。また、肝細胞癌臨床検体において、TGFBR2 の発現低下しているがん細胞の核内に SMAD4 が検出された。TGF- $\beta$  スーパーファミリーには、TGF- $\beta$  の他にアクチビンや BMP などが存在し、TGFBR2 を介さずにシグナル伝達を行う経路が存在している。SMAD4 の核移行は、このようなシグナル伝達の結果を反映しているのかもしれない。肝細胞がんにおける MAPK や TGF- $\beta$  スーパーファミリーの詳細な解析は行っていないが、肝細胞癌における TGF- $\beta$  シグナル全体の役割を把握するには、分子レベルでのさらなる研究が必要と考えられる。

## 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。「肝細胞癌」において TGFBR2 の発現低下は、肝内転移や術後再発など、癌悪性化と関連しており、頻度は少ないながらも小型の肝癌で高悪性度の癌を検出するうえでも有用である可能性が示唆された。

## E. 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. Sakamoto M, Effendi K, Masugi Y. Molecular diagnosis of multistage hepatocarcinogenesis. Jpn J Clin Oncol. 40(9): 891-6, 2010

2. Mamiya T, Yamazaki K, Masugi Y, Mori T, Effendi K, Du W, Hibi T, Tanabe M, Ueda M, Takayama T, Sakamoto M. Reduced transforming growth factor-beta receptor II expression in hepatocellular carcinoma correlates with intrahepatic metastasis. Lab Invest. 90(9): 1339-45, 2010
3. 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 101: 666-672, 2010

## H. 知的財産の出願・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。(PCT出願) PCT/JP2010/054184、2010

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の探索研究

研究分担者 井本 逸勢（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部人類遺伝学 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網羅的に探索し統合解析することで、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 MZB1 を同定した。MZB1 発独立予後の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

肝癌細胞株（Hep 3B、Hep G2、HuH7）と非腫瘍部肝組織を用い、(a)methylated-DNA immunoprecipitation (MeDIP) 法で得られたDNA断片をCpG island array (Agilent社)で検出し、肝癌細胞株特異的高メチル化領域をゲノムワイドにスクリーニングすると共に、(b)非腫瘍部肝組織で発現があるが肝癌細胞では発現消失しかつ5-aza 2'-deoxycytidine (5-aza-dCyd)処理で発現回復が認められる

遺伝子を発現アレイ（Whole Human Genome 4x44K、Agilent社）で網羅的に抽出することで、癌細胞特異的にCpGアイランドのメチル化で発現が低下する肝癌抑制遺伝子候補を選別した。候補遺伝子の、肝癌臨床検体におけるメチル化[bisulfite シークエンス法やcombined bisulfite restriction analysis (COBRA)法]、発現消失(リアルタイムRT-PCR、免疫染色)を確認し、臨床病理学的因子との相関を検討すると共に、強制発現形を構築して肝癌癌細胞に発現回復させたときの生物学的意義を*in vitro*、*in vivo*で検討した。

（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16年文部科学省・厚生労働・経済産業省告示第1号)」に沿い、倫理委員会の審査を経て実施してい



る。動物実験に関しても、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年文部科学省告示第71号）に沿い、実験動物委員会の審査を経て実施している。

### C. 研究概要

肝癌細胞株の統合的エピゲノム解析の結果、肝癌細胞特異的にDNAメチル化を生じることで発現が抑制される常染色体上の遺伝子候補11個が同定された（下表）。これらの遺伝子

Gene symbol	Name	Location
ANGPT2	angiotensinogen 2	8p23.1
CCK	cholecystokinin	3p22-21.3
DERL3	Der1-like domain family, member 3	22q11.23
RADIL	Rap GTPase interactor	7p22.1
KCNK6	potassium channel, subfamily K, member 6	19q13.1
L1TD1	LINE-1 type transposase domain containing 1	1p31.3
MZB1 (PACAP)	marginal zone B and B1 cell-specific protein	5q31.2
FAR1 (MLSTD2)	fatty acyl CoA reductase 1	11p15.2
OCIAD2	OCIA domain containing 2	4p11
PBX4	pre-B-cell leukemia homeobox 4	19p12
SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	8p11.21

に関して、肝癌細胞株パネルを用いて CpG island の DNA メチル化 (COBRA 法) と発現低下 (Taqman PCR) が高頻度かつ一致して認められる遺伝子として MZB1 と FAR1 が同定され、さらに臨床検体を用いて同様の検討をすると、MZB1 が最も高頻度にメチル化に伴い発現消失していた。

免疫染色により 162 例の肝癌検体で MZB1 の発現を検討すると、MZB1 発現消失例は有意に全生存で予後不良であり、多変量解析によっても独立した予後因子であることが確かめられた (図 1)。

肝癌細胞株に MZB1 を強制発現すると、細胞増殖は *in vitro* (図 2)、*in vivo* で抑制され、癌抑制活性が確認された。

### D. 考察

肝癌細胞株のゲノムワイドなエピゲノム解

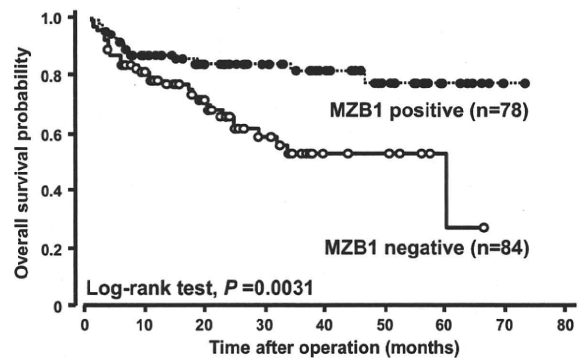


図1 肝癌でのMZB1発現は有意な予後予測マーカーになる

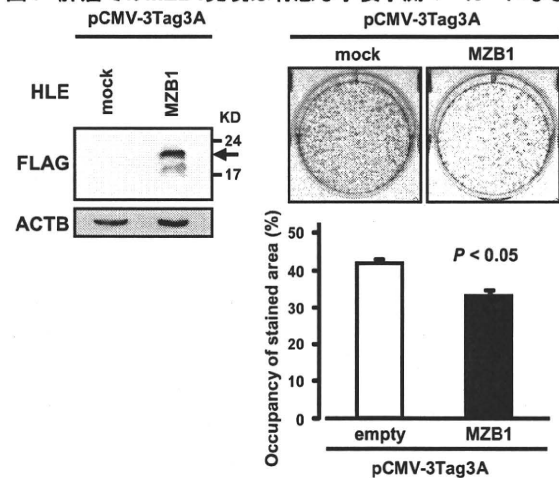


図2 肝癌細胞にMZB1を強制発現すると細胞増殖を抑制する (一時的強制発現後のコロニー形成アッセイ)

析を DNA メチル化と発現の両面から統合的に  
行い、さらに臨床検体で癌部特異的メチル化  
に伴う発現抑制を検証することで、肝癌特異  
的 DNA メチル化異常標的遺伝子が同定でき  
た。実際に最も高頻度で DNA メチル化によ  
り発現抑制される遺伝子として同定された  
MZB1 は、臨床検体で認められた発現抑制  
が独立した有意な予後規定因子であり、  
発現回復により肝癌細胞の増殖抑制効果  
が確認されたことから、肝癌抑制遺伝子  
である可能性が示された。今後、予後予  
測マーカーとしての意義の大型コホートを  
用いた検証や、小胞体に局在する本遺伝  
子の生物学的機能の分子機構の解明が必  
要である。さらに、同定された他の遺伝子

についても分子マーカーとしての意義が期待でき、今後同様の検討が必要である。

#### E. 結論

肝癌細胞株のゲノムワイドなエピゲノム解析により、予後予測に有用な可能性のある肝癌抑制遺伝子候補が同定できた。

#### 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. Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. **Carcinogenesis**, 2010;31(5):766-776.

##### 2.学会発表

1. Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. 101th annual meeting of American Association for Cancer Research, Washington, DC, USA, 2010.4.19

2. 松村聡、井本逸勢、小崎健一、田中真二、有井滋樹、稲澤譲治. 肝細胞癌における CpG アイランドの過剰メチル化により発現抑制される新規がん抑制遺伝子の同定. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.9.23.

3. 古田繭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤譲治. Functional スクリーニングを用いた肝細胞癌抑制性 microRNA の同定. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.9.24.

4. Furuta M, Kozaki KI, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J. Functional genomics-assisted approach identifies candidates for tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010.12.8

#### 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。

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

術中造影超音波画像および網羅的遺伝子解析による肝癌悪性度および再発の予測

研究分担者 田中真二 東京医科歯科大学医歯学総合研究科 准教授

**研究要旨** 肝癌外科手術症例に対して、術中造影超音波検査による血流動態パターンを解析し、  
相関する分子群を同定した。さらに網羅的遺伝子発現解析により、発癌ポテンシャルを予測す  
る分子マーカー候補を同定し、多施設研究による検証によって確定した。

**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。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。本研究では画像診断および分子マーカー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) 術中超音波画像による血流動態解析**

肝癌外科手術症例に対して Perflubutane を用いた術中造影超音波検査により血流動態を解析し、網羅的遺伝子発現との相関解析を行なった。

**(2) 再発予測遺伝子の網羅的解析と検証**

肝癌切除標本の癌部および非癌部組織を用いた網羅的解析によって同定した早期再発相関遺伝子群に対して、多施設症例のティッシュ・マイクロアレイにより検証した。

**(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) 術中超音波画像の血流動態パターンと網羅的遺伝子発現解析**

肝癌の術中造影超音波画像により描出された血流動態パターン分類は癌分化度や再発と有意に相関した。cDNA マイクロアレイの結果、遺伝子発現パターンが異なることを見出し、血流動態と相関する分子群を同定した。

## (2) 再発予測分子マーカーの同定

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、肝癌の早期再発と相関する非癌部遺伝子群を同定し、多施設症例のティッシュ・マイクロアレイを用いたコホート検証により、非癌部における CYP1A2 発現低下が再発を予測する分子マーカーとなることが確定した。

## D. 考察

肝癌の術中造影超音波画像解析の結果、非侵襲的画像検査によって血流動態パターンが癌の悪性度が相関する可能性が示されたが、その分子生物学的背景と相関分子群を見出した。さらに、早期再発に関連する非癌部遺伝子群を、多施設ティッシュ・マイクロアレイによって検証し、ついに CYP1A2 を同定しえた。興味深いことに、酸化ストレスによって CYP1A2 発現が抑制されること、かつ CYP1A2 低下によって酸化ストレスが増強することが報告されており、非癌部慢性肝障害の酸化ストレス蓄積、発癌ポテンシャルと相関する可能性を持つ極めて重要な分子マーカーと考えられる。今後、CYP1A2 の分子生物学的解析を進めるとともに、慢性肝炎、肝硬変患者における発癌予測を検証する大規模研究への展開が期待される。

## E. 結論

非侵襲的画像検査による肝癌の血流動態パターンと癌悪性度を解析し、相関分子群を同定した。さらに、肝組織の発癌ポテンシャルを予測する分子マーカー CYP1A2 を多施設研究によって検証しえた。

## 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, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Ito K, Miki Y, Inazawa J, Tanaka H, Arii S. Gene expression phenotypes for vascular invasiveness of hepatocellular carcinomas. *Surgery*, 147(3):405-414, 2010.
2. Tanaka S, Arii S. Novel molecular- targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *J Hepato-Biliary Pancreat Surg*, 7(4):413-9, 2010
3. Tanaka S, Arii S. Current status of molecularly targeted therapy for hepatocellular carcinoma: basic science. *Int J Clin Oncol*, 15(3):235-41, 2010
4. Aihara A, Tanaka S, Yasen M, Matsumura S, Mitsunori Y, Murakata A, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Ito K, Arii S. The selective Aurora B kinase inhibitor AZD1152 as a novel treatment for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 52(1):63-71, 2010
5. Murakata A, Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Arii S. Gene expression signature of the gross morphology in hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*, 253(1): 94-100, 2011
6. Yoshitake Y, Tanaka S, Mogushi K, Aihara A, Murakata A, Matsumura S, Mitsunori Y, Yasen M, Ban D, Noguchi N, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Arii S.

Importin-alpha1 as a novel prognostic target for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*, in press

## G2. 学会発表

1. Tanaka S, Mogushi K, Aihara A, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Miki Y, Inazawa J, Tanaka H, Arii S. Gene expression signature of the non-cancerous liver tissue associated with the early recurrence of hepatocellular carcinoma. 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2010年4月19日)
2. 田中真二, 藍原有弘, 野口典男, 入江 工, 工藤 篤, 中村典明, 有井滋樹. パネルディスカッション「オンコロジストとして外科医に求められる基礎研究とは何か」 外科臨床に基づいた難治性消化器癌の分子標的治療の開発. 第110回日本外科学会定期学術集会(2010年4月8日)
3. 田中真二, 村形綾乃, 有井滋樹. シンポジウム「肝細胞癌の分子標的探索と臨床応用」 外科臨床に基づく肝癌分子標的の解析と臨床展開. 第46回日本肝臓学会総会(2010年5月28日)
4. 田中真二, 田中真二, 藍原有弘, 伴 大輔, 野口典男, 入江 工, 工藤 篤, 中村典明, 稲澤譲治,

田中 博, 有井滋樹. シンポジウム「消化器癌転移のメカニズムに基づいた新たな治療標的分子の探索」 臨床検体オミックス解析に基づく転移分子ネットワークの同定と分子標的治療への展開. 第65回日本消化器外科学会総会(2010年7月15日)

5. 田中真二, 中村典明, 有井滋樹. シンポジウム「肝細胞癌治療のこれからの展開」 肝細胞癌治療における外科治療の位置付けと方向性. 第14回日本肝臓学会大会(2010年10月13日)
6. 田中真二, 茂籟 薫, Mahmut Yasen, 伴 大輔, 野口 典男, 入江 工, 工藤 篤, 中村典明, 稲澤譲治, 田中 博, 有井滋樹. パネルディスカッション「肝細胞がん治療アルゴリズムの再考：薬剤療法の位置づけ」 肝細胞癌治療における外科治療の位置付けと方向性. 第48回日本癌治療学会学術集会(2010年10月29日)

## 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。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

[研究代表者 有井 滋樹]

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Ito K, Miki Y, Inazawa J, Tanaka H, Arii S.	Gene expression phenotypes for vascular invasiveness of hepatocellular carcinomas.	<i>Surgery,</i>	147 (3)	405-14	2010
Tanaka S, Arii S.	Current status of molecularly targeted therapy for hepatocellular carcinoma: basic science.	<i>Int J Clin Oncol,</i>	15 (3)	235-41	2010
Aihara A, Tanaka S, Yasen M, Matsumura S, Mitsunori Y, Murakata A, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Ito K, Arii S.	The selective Aurora B kinase inhibitor AZD1152 as a novel treatment for hepatocellular carcinoma.	<i>J Hepatol,</i>	52 (1)	63-71	2010
Murakata A, Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Arii S.	Gene expression signature of the gross morphology in hepatocellular carcinoma.	<i>Ann Surg,</i>	253 (1)	94-100	2011
Tanaka S, Arii S.	Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma in the current and next strategies.	<i>J Gastroenterol,</i>			in press
Yoshitake Y, Tanaka S, Mogushi K, Aihara A, Murakata A, Matsumura S, Mitsunori Y, Yasen M, Ban D, Noguchi N, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Arii S.	Importin- $\alpha$ 1 as a novel prognostic target for hepatocellular carcinoma.	<i>Ann Surg Oncol,</i>			in press

[研究分担者 松井 修]

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsui O, Kobayashi S, Sanada J, Kouda W, Ryu Y, Kozaka K, Kitao A, Nakamura K, Gabata T.	Hepatocellular nodules in liver cirrhosis: hemodynamic evaluation (angiography-assisted CT) with special reference to multi-step hepatocarcinogenesis.	<i>Abdom Imaging.</i>		Jan 26. [Epub ahead of print]	2011
Okumura E, Sanada S, Suzuki M, Takemura A, Matsui O.	Effectiveness of temporal and dynamic subtraction images of the liver for detection of small HCC on abdominal CT images: comparison of 3D nonlinear image-warping and 3D global-matching techniques	<i>Radiol Phys Technol.</i>		Jan 13. [Epub ahead of print]	2011
Miyayama S, Yamashiro M, Hattori Y, Orito N, Matsui K, Tsuji K, Yoshida M, Matsui O.	Angiographic Evaluation of Feeding Arteries of Hepatocellular Carcinoma in the Caudate Lobe of the Liver.	<i>Cardiovasc Intervent Radiol.</i>		Nov 18. [Epub ahead of print]	2010
Miyayama S, Yamashiro M, Yoshie Y, Nakashima Y, Ikeno H, Orito N, Yoshida M, Matsui O.	Hepatocellular carcinoma in the caudate lobe of the liver: variations of its feeding branches on arteriography.	<i>Jpn J Radiol.</i>	23 (8)	555-562	2010
Sonoda A, Nitta N, Nitta-Seko A, Ohta S, Takamatsu S, Ikehata Y, Nagano I, Jo J, Tabata Y, Takahashi M, Matsui O, Murata K.	Complex comprised of dextran magnetite and conjugated cisplatin exhibiting selective hyperthermic and controlled-release potential.	<i>Int J Nanomedicine.</i>	5	499-504	2010
Yoneda N, Sato Y, Kitao A, Ikeda H, Sawada-Kitamura S, Miyakoshi M, Harada K, Sasaki M, Matsui O, Nakanuma Y.	Epidermal growth factor induces cytokeratin 19 expression accompanied by increased growth abilities in human hepatocellular carcinoma.	<i>Lab Invest.</i>	91 (2)	262-272	2011
Pugacheva O, Matsui O, Kozaka K, Minami T, Ryu Y, Koda W, Kobayashi S, Gabata T.	Detection of small hypervascular hepatocellular carcinomas by EASL criteria: Comparison with double-phase CT during hepatic arteriography.	<i>Eur J Radiol.</i>		2010 Sep 18. [Epub ahead of print]	
Tsuda N, Matsui O.	Cirrhotic rat liver: reference to transporter activity and morphologic changes in bile canaliculi--gadoxetic acid-enhanced MR imaging.	<i>Radiology.</i>	256 (3)	767-773	2010



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kitao A, Zen Y, <u>Matsui O</u> , Gabata T, Kobayashi S, Koda W, Kozaka K, Yoneda N, Yamashita T, Kaneko S, Nakanuma Y.	Hepatocellular carcinoma: signal intensity at anced MR Imaging--correlation with molecular transporters and histopathologic features.	<i>Radiology.</i>	256 (3)	817-826	2010
Miyayama S, Yamashiro M, Okuda M, Yoshie Y, Nakashima Y, Ikeno H, Orito N, <u>Matsui O</u> .	Detection of corona enhancement of hypervascular hepatocellular carcinoma by C-arm dual-phase cone-beam CT during hepatic arteriography.	<i>Cardiovasc Intervent Radiol.</i>	34 (1)	81-86	2011

[研究分担者 佐田 通夫]

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
鳥村拓司, <u>佐田通夫</u>	肝・胆道系症候群(第2版) - その他の肝・胆道系疾患を含めて - II. 肝臓編(下)Ⅷ 肝細胞癌 肝細胞癌の類似病変(肝細胞の結節性病変)肝細胞腺腫		別冊日本臨床新領域別症候群シリーズ	日本臨床社	東京都	2010	154-158
黒松亮子, 隈部 力, <u>佐田通夫</u>	6) 硬化型肝細胞癌	工藤正俊, 山雄健次	見逃し、誤りを防ぐ! 肝・胆・膵癌画像診断アトラス	羊土社	東京都	2010	118-124

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iizuka N, Oka M, Sakaida I, Moribe T, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Yamashita S, Okita K, Sakata K, Karino Y, Toyota J, Ando E, Ide T, <u>Sata M</u> , Tsunedomi R, Tsutsui M, Iida M, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Tamesa T, Fujita Y, Hamamoto Y	Efficient detection of hepatocellular carcinoma by a hybrid blood test of epigenetic and classical protein markers	<i>Clin Chim Acta</i>	412	152-158	2010

[研究分担者 青柳 豊]

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tamura Y, Igarashi M, Suda T, Wakai T, Shirai Y, Umemura T, Tanaka T, Kakizaki S, Takagi H, Hiasa Y, Onji M, <u>Aoyagi Y.</u>	Fucosylated fraction of alpha-fetoprotein as a predictor of prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after curative treatment.	<i>Dig Dis Sci.</i>	55 (7)	2095-101	2010
Korita P, Wakai T, Shirai Y, Matsuda Y, Sakata J, Takamura M, Yano M, Sanpei A, <u>Aoyagi Y.</u> , Hatakeyama K, Ajioka Y.	Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma.	<i>Oncology Reports</i>	23 (4)	965-72	2010
Tamura Y, Igarashi M, Kawai H, Suda T, Satomura S, <u>Aoyagi Y.</u>	Clinical Advantage of Highly Sensitive On-Chip Immunoassay for Fucosylated Fraction of Alpha-Fetoprotein in Patients with Hepatocellular Carcinoma.	<i>Dig Dis Sci.</i>	55 (12)	3576-83	2010
<u>Aoyagi Y.</u> , Tamura Y, Suda T.	History and recent progress in evaluation of the fucosylated alpha-fetoprotein fraction	<i>J Gastroenterol Hepatol</i>			2011

[研究分担者 田中 博]

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsubota A, Mogushi K, Nariai K, <u>Tanaka H.</u> , Tada N.	IQGAP1 and vimentin may be key regulator genes in naturally occurring hepatotumorigenesis induced by oxidative stress.	<i>Carcinogenesis</i>	31	504-11	2010

[研究分担者 森安 史典]

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugimoto K, Shiraishi J, <u>Moriyasu F</u> , Doi K	Computer-aided diagnosis for contrast-enhanced ultrasound in the liver.	<i>World J Radiol.</i>	28; 2(6)	215-223	2010
Saito K, Araki Y, Park J, Metoki R, Katsuyama H, Nishio R, Kakizaki D, <u>Moriyasu F</u> , Tokuyue K.	Effect of Gd-EOB-DTPA on T2-weighted and diffusion-weighted images for the diagnosis of hepatocellular carcinoma.	<i>J Magn Reson Imaging.</i>	32(1)	229-234	2010
Liu GJ, Wang W, Xie XY, Xu HX, Xu ZF, Zheng YL, Liang JY, <u>Moriyasu F</u> , Lu MD.	Real-time contrast-enhanced ultrasound imaging of focal liver lesions in fatty liver.	<i>Clin Imaging.</i>	34(3)	211-221	2010
森安史典	超音波"innovation"診断から治療までの最新動向 コントラスト・3D・HIFU	<i>INNERVISION</i>	25(8)	88-90	2010

[研究分担者 川崎 誠治]

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Omori S, Ishizaki Y, Sugo H, Yoshimoto J, Imamura H, Yamataka A, <u>Kawasaki S</u> .	Direct measurement of hepatic blood flow during living donor liver transplantation in children.	<i>J Pediatr Surg.</i>	45(3)	545-8	2010

[研究分担者 角谷 眞澄]

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
角谷眞澄	第 15 章 消化器機能検査 腹部(肝・胆・膵)画像検査.	金井正光監 奥村伸生, 戸塚 実、 矢富 裕	臨床検査法提 要 第33版	金原出版	東京	2010	1364- 1388

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
大彌 歩, 藤永康成, 木藤善浩, 上田 仁, 角谷眞澄	肝腫瘍の造影 3T MRI.	<i>INNERVISION</i>	8月号	82-87	2010
Fujinaga Y, <u>Kadoya M</u> , Ueda K, Kurozumi M, Matsushita T, Ohya A, Kitou Y, Ueda K	Hepatic venous phase of the liver is already affected by hepatobiliary uptake of Gd-EOB-DTPA: comparison between Gd-EOB-DTPA and Gd-DTPA in dynamic MRI on 3.0-T apparatus.	<i>Eur Radiol</i>	20 supplement 1	S52	2010