

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、および血管新生を標的とした肝がん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した。ヒト肝がん細胞株のうち EGFR を高発現しかつヌードマウスで造腫瘍性のある HuH-7 細胞株をモデルとして選択して検討を進め、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 SPECT イメージングに成功した。048-006 の IgG を低分子化した 048-006 scFvCL はインビトロにおいて放射性標識した scFvCL が HuH-7 細胞に IgG と同様に高い結合性を示したが、担がんマウスでの検討から必ずしも腫瘍イメージングに好ましい体内挙動が実現できないことが明らかとなった。また、血管新生を標的とした肝がんイメージング法については、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 ^{64}Cu -64 標識体についての検討を進め、この標識体が細胞自体には $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現が認められなかった HuH-7 移植腫瘍に低～中程度の集積を示すこと、腫瘍内で標識体の分布が高かった部位と血管が多くみとめられた部位には重なる部分が多いことを明らかにした。

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、がんの血管新生を標的とするイメージング法の基礎検討もあわせて行う。

B. 研究方法

[平成 20 年度]

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（クロロミン T 法）および In-111（CHX-A"-DTPA 法）で放射性標識し、種々の濃度の EGFR 高発現 A431 細胞と、4℃で 1 時間反応させインビトロでの結合親和性を検討した。また、細胞との結合反応の際に種々の濃度の非標識抗体を加える競合阻害実験も行った。さらに、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て、抗体の内化の有無を検討した。

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 (37kBq) を静脈内投与、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。また、In-111 標識抗体 (1.85MBq) を投与してイメージングを行った。

2. 肝がん細胞株の造腫瘍性

移植腫瘍に適した細胞株選択のため、ATCC 等より入手した 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た。必要に応じて、マトリゲルを併用した。

3. 肝がん細胞株との結合性の評価

I-125 標識 048-006 抗体と数種の肝がん細胞を反応 (4°C、1 時間インキュベート) させ、結合放射能を測定、それぞれの細胞との結合性 (%Bound) を比較した。

[平成 21 年度]

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、SK-Hep1, HuH-7 をヌードマウス皮下に移植し、形成された腫瘍塊を摘出し、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

前年度の検討で用いたと同様の方法により、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 I-125 および In-111 標識し、HuH-7 細胞との結合性や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 2×10^6 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 048-006 (37kBq/5 μ g) を静脈内投与し、投与 24、48、96 時間後にマウスを屠殺し、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 048-006 (1.85MBq/26 μ 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 μ 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 2×10^6 個または SK-HEP1 細胞 2×10^6 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 1 mM 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}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、腫瘍の形成を待って、約 11MBq の ^{64}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}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 VEGF₁₂₀ 溶液 (0.2mg/ml, 30mM リン酸緩衝液, pH7.5) 20 μl に 3.7MBq の ^{125}I -NaI 溶液を加え、さらに 1 μg 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 ^{125}I を分離、標識率と VEGF 1 分子あたりに結合した ^{125}I の数を検討した。マウス血漿 60 μl と約 6 kBq の ^{125}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、 ^{125}I 標識 VEGF の安定性を検討した。

[平成 22 年度]

I : EGFR イメージング研究

1. ヒト肝がん細胞株と低分子量放射性標識抗体 (048-006 scFvLC) とのインビトロでの結合性と内在化

ヒト抗 EGFR 抗体 048-006 を低分子量化した scFvLC (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、または、CHX-A"-DTPA を用いて In-111 標識して、HuH-7 細胞との結合実験、結合実験の際に種々の濃度の非標識抗体を加える競合阻害実験を行った。

次いで、標識抗体が細胞に結合した後に細胞を洗浄、標識抗体を含まないメEDIUM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EDIUM中で蛋白結合した状態で存在、メEDIUM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。

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

HuH-7 ヒト肝がん細胞 2×10^6 個をマトリゲルと共にヌードマウスに皮下投与して作製した担がんマウスに、In-111 標識した 048-006 scFvLC (37kBq/5 μg) を静脈内投与し、投与 2, 6, 12 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。

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についての検討

SK-Hep および HuH-7 ヒト肝がん細胞 2×10^6 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製した。4-8 週間後、腫瘍を摘出、固定して腫瘍組織の切片を作製し、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対する抗体を用いて免疫組織染色を行い、腫瘍組織の $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現状態を観察した。

2. ^{64}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についての検討

ヌードマウス皮下に HuH-7 細胞 2×10^6 個をマトリゲルとともに投与、4-6 週間後、腫瘍塊の径が 5-10mm に成長した段階で、 ^{64}Cu 標識環状 RGD ペプチド 4 量体を環状 RGD ペプチド 4 量体約 11MBq を尾静脈より投与、1 および 3 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}Cu 標識環状 RGD ペプチド 4 量体の集積を検討した。また、PET 撮像後に腫瘍を摘出、速やかに凍結し、凍結切片を作製、オートラジオグラフィにより ^{64}Cu 標識環状 RGD ペプチド 4 量体の腫瘍内分布を調べるとともに、近隣切片について CD31 に対する抗体を用いる免疫組織染色を行って血管の分布を調べ、両者を比較した。

3. ^{125}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

マウス VEGF₁₂₀、ヒト VEGF₁₂₁ および

VEGF₁₆₅ 溶液 (マウス VEGF₁₂₀、ヒト VEGF₁₂₁ については 0.2mg/ml, ヒト VEGF₁₂₁ については 0.4mg/ml の 30mM リン酸緩衝液, pH7.5) 20 μl に 3.7MBq の ¹²⁵I-NaI 溶液を加え、さらに 1 μg 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 ¹²⁵I を分離、VEGF 1 分子あたり 0.8~1.6 分子の ¹²⁵I が結合していることを確認した。標識した各 VEGF 約 1kBq を肝がん細胞 (HuH7 および SK-HEP) および内皮由来細胞 (2H-11), それぞれ 1~10×10⁵ 個と 4℃ で 1 時間反応後細胞を洗浄し、細胞に結合した放射能を測定した。

ヌードマウス皮下に HuH-7 細胞 2×10⁶ 個をマトリゲルとともに投与、約 4 週間後、約 40kBq の ¹²⁵I 標識 VEGF₁₂₁ を静脈内投与し、投与 2 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。

(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

[平成 20 年度]

1. EGFR 高発現細胞での抗体の性状評価

抗体 048-006 の I-125 標識体および In-111 標識体は EGFR 高発現 A431 細胞と 4℃ で高い結合性を示した。また、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) と同等の高さであった。標識抗体が A431 細胞と結合した後の局在変化の検討では、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、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。

インビトロでの検討結果を受けて、担癌マウスでの検討には、In-111 標識抗体を用いた。A431 細胞を皮下に移植したヌードマウスでの In-111 標識抗体の体内分布実験では、肝臓・脾臓に高い放射能集積を認めたが、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 1)。

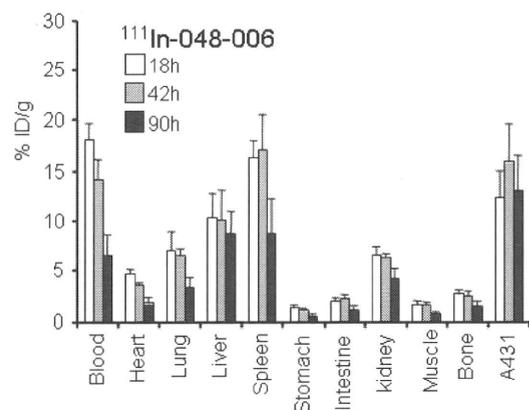


図 1. 担癌マウスでの標識抗体の体内分布

In-111 標識抗体を投与した担癌マウスのイメージングでは、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 2、矢印)。

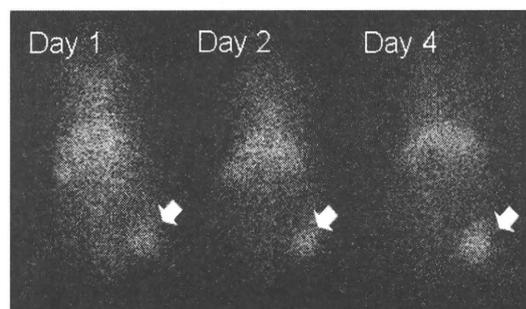


図 2. In-111 標識抗体でのイメージング

2. 肝がん細胞株の造腫瘍性

4 種の肝がん細胞株のうち HuH-7 細胞では、ヌードマウスの皮下に投与後約 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 3)。

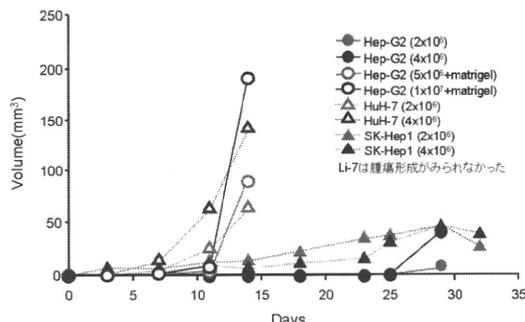


図 3. 肝がん細胞株の造腫瘍性

3. 肝がん細胞株との結合性の評価

今回検討した肝がん細胞株の中では、HuH-7 細胞、SK-Hep1 細胞が標識抗体と良好な結合性を示した。

[平成 21 年度]

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 4)。

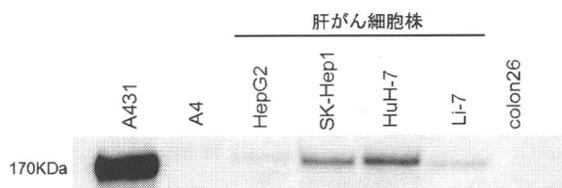


図 4. がん細胞株の EGFR 発現

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 5)。

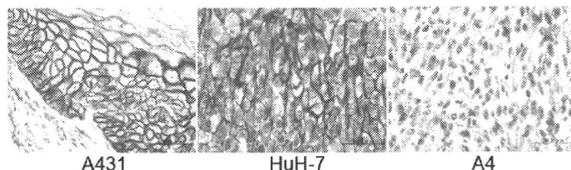


図 5. 移植腫瘍の免疫組織染色

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 標識抗体はともに HuH-7 細胞と、4°C で高い細胞結合性を示した。

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から、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 6)、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 7)。

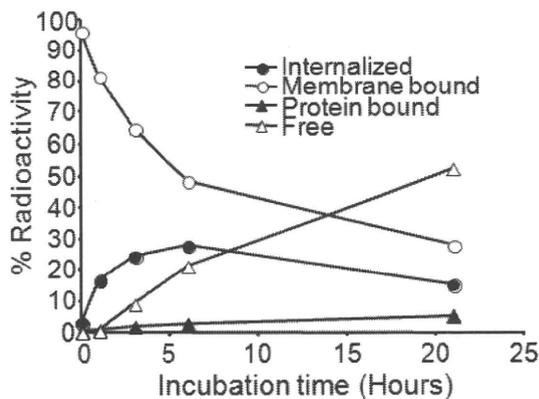


図 6. I-125 標識抗体の内在化

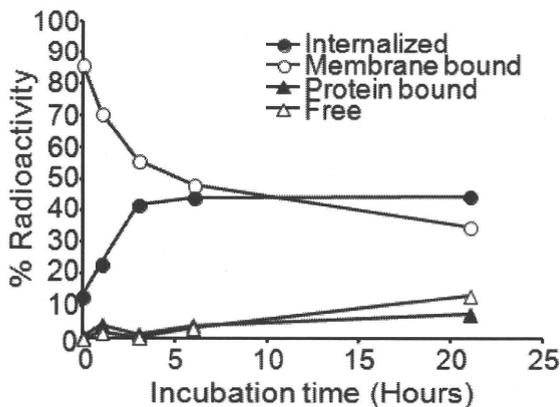


図 7. In-111 標識抗体の内在化

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緩徐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: $10.8 \pm 1.8\%ID/gram$ → 48 時間後: $22.4 \pm 4.5\%ID/gram$ → 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 8)。

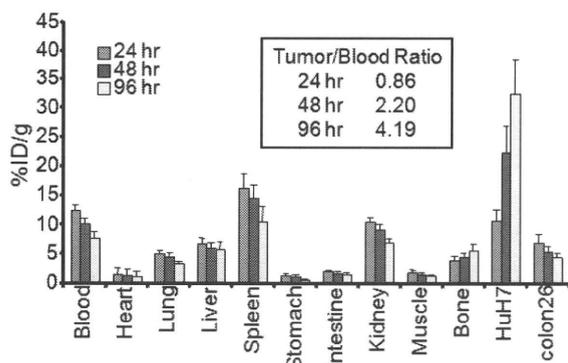


図 8. In-111 標識抗体の体内分布

経時的に撮像したプラナー像でも、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 9)。

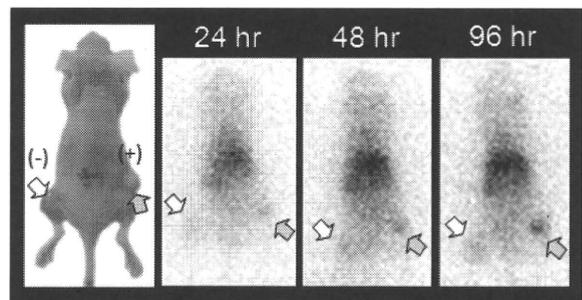


図 9. 担がんマウスのイメージング

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}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}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}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。

[平成 22 年度]

I : EGFR イメージング研究

1. ヒト肝がん細胞株と低分子量標識抗体 (048-006 scFvLC) とのインビトロでの結合性と内在化

I-125 標識および In-111 標識したヒト抗 EGFR 抗体 048-006 の scFvCL は、HuH-7 細胞に対して、IgG と同等の高い結合性を示した (図 11)。競合阻害実験から求めた結合親和性は、 $2.3 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ (I-125 標識)、 $4.2 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ (In-111 標識) となり IgG よりも若干低下した (図 12)。

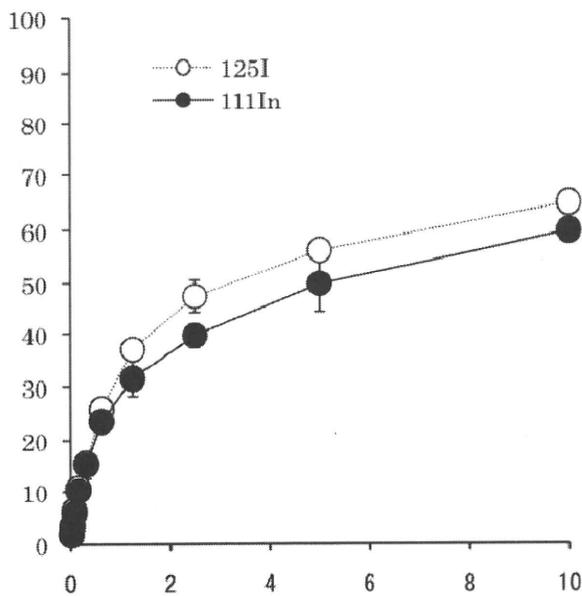


図 11. 放射標識抗体 (scFv-LC) の結合率

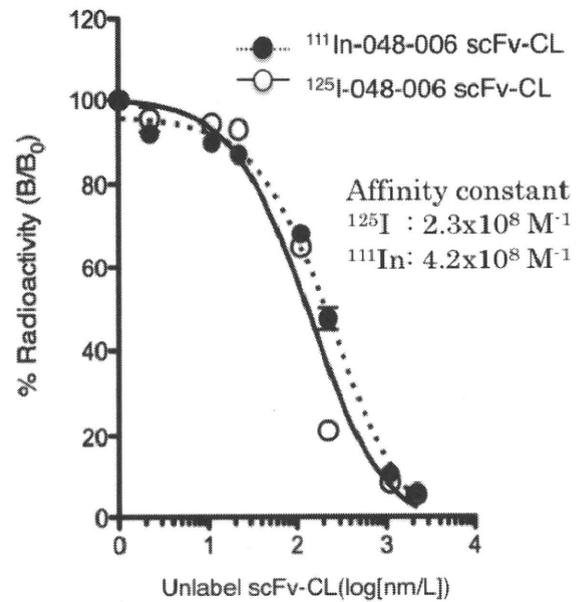


図 12. 放射標識抗体 (scFvLC) の親和性

標識抗体の細胞結合後の挙動については、I-125 標識 048-006 scFvCL 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、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 13,14)。

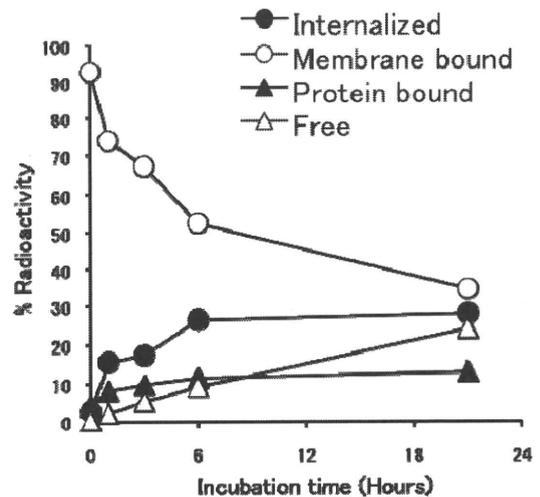


図 13. ^{125}I 標識抗体 (scFvLC) の局在の経時変化

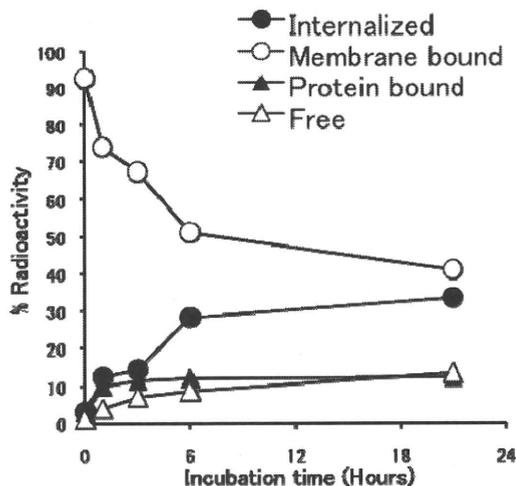


図 14. ^{125}I 標識抗体(scFvLC)の局在の経時変化

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 標識抗体の投与後、血液や多くの臓器、および EGFR 陽性 HuH-7 腫瘍の放射能は時間と共に徐々に減少した。血中クリアランスは早く、腫瘍と血液の集積比は投与 1 時間後の 1.3 ± 0.5 から、投与 12 時間後には 6.4 ± 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 15)。

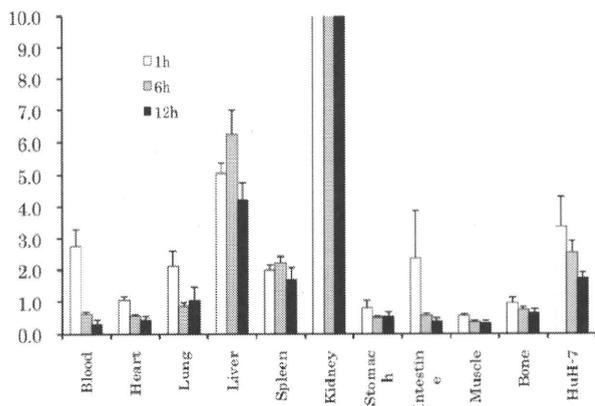


図 15. In-111 標識 scFvLC の体内分布

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みとめられなかった。

2. ^{64}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}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 16)。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と同様であった。 ^{64}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}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。

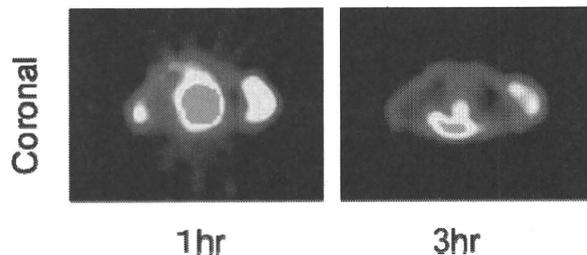


図 16. HuH-7 担がんマウスの PET イメージング

3. ^{125}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}I で標識した、マウス VEGF₁₂₀, ヒト VEGF₁₂₁ および VEGF₁₆₅, 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。 ^{125}I 標識ヒト VEGF₁₂₁ 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 ($23.11.8 \% \text{ID/g}$) 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。本研究課題では、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。はじめに EGFR を高発現することが知られるがん細胞株 A431 を用いた *in vitro*, *in vivo* の検討を行い、本抗体の I-125 および In-111 標識体が EGFR 高発現細胞に特異的に結合し、結合後に細胞内に内在化することを明らかにした。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た。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。この結果を受け、肝がんにおいても EGFR の発現が高いものでは放射性標識 048-006 によるイメージングが可能と考え、種々の肝がん細胞株について EGFR の発現を調べ、これらの細胞がそれぞれレベルは異なるものの EGFR を発現することを確認した。検討した中で最も高い EGFR 発現を示す HuH-7 細胞をモデルに用いて検討を進め、放射性標識抗体が HuH-7 細胞に特異的に結合し、その後内在化すること、In-111 標識抗体が HuH-7 移植腫瘍に高集積し、そのイメージングが可能であることを示した。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望ましいと考えられた。一般に抗体等のタンパク質を放射性同位元素で標識した分子プローブでは、分子量を小さくすることで、血中からのクリアランスが早まり、肝臓等

の臓器への集積が低減される傾向が見られることが知られている。そこで In-111 標識 048-006 (肝集積の低減に於て、抗体の scFvLC への低分子量化を試みた。

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を有し、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、scFvLC 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。このような結果から、少なくとも本抗体に関する限り、IgG から scFvLC への低分子量化は肝がんにおける 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の可能性についても検討を開始した。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}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。肝がん細胞株の皮下移植腫瘍について $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現と血管形成状態を免疫染色により調べたところ、HuH-7移植腫瘍では $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現が認められず、また、血管形成が比較的豊富にみられたため、この腫瘍モデルを用いて ^{64}C 標識環状RGDペプチド4量体による新生血管イメージングの可能性について検討した。担がんマウスに ^{64}C 標識環状RGDペプチド4量体を投与すると、1-3時間後において、集積量は $\alpha_v\beta_3$ インテグリン高発現腫瘍に比べて低いものの、移植腫瘍が明瞭に描出され、本標識体による新生血管イメージングの可能性が示された。

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。本課題ではVEGFの ^{125}I 標識体を用いて基礎的な検討を行ったが、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、今後、標識方法の改善をはじめ、多くの検討が必要と考えられた。

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に取り組んだ。

放射性標識したヒト抗EGFR抗体048-006は、インビトロでEGFR高発現細胞に特異的に結合し、細胞結合後標識抗体は内在化したため、*in vivo*にはIn-111などの金属標識が好ましいと考えられた。In-111標識048-006はHuH-7移植腫瘍に特異的な高集積を示した。移植腫瘍のイメージングにも成功し、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。ヒト抗EGFR抗体048-006のIgGを低分子量化したscFvLCはインビトロではEGFR発現細胞に特異的な結合を示したが、担がんマウスの体内分

布実験結果から、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。

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。 $\alpha_v\beta_3$ 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}C 標識条件を決定し、 ^{64}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、さらに、細胞自体は $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを発現しない肝がん細胞株HuH-7の移植腫瘍のイメージングにも成功した。HuH-7の移植腫瘍において、腫瘍結節内の ^{64}Cu 標識環状RGDペプチド4量体の分布が新生血管の分布に近かったことから、本標識体の利用により新生血管をターゲットとするPETイメージングの可能性が示された。

F. 研究発表

[平成22年度] (2010)

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.

3. Zhao-Hui Jin, Takako Furukawa, Toshimitsu
Fukumura, Tsuneo Saga, Yasuhisa Fujibayashi,
et.al. PET-Imaging of Tumor
alphaVbeta3-Integrin Expression with a Novel
Probe ⁶⁴Cu-cyclam-RAFT-c (-RGDfK-) 4.
World Molecular Imaging Congress 2010.
Kyoto, Japan. 2010.9.8-11.

G. 知的財産の出願・登録状況

なし。

- 1) 特許取得

なし。

- 2) 実用新案登録

なし。

- 3) その他

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 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。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。肝細胞癌において TGF- β シグナル伝達関連分子 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。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。

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

[平成 20 年度～平成 22 年度]

(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. 研究結果

[平成 20 年度～平成 22 年度]

1) 肝多段階発癌における Bmi-1 の発現異常

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。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。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。

[平成 21 年度～平成 22 年度]

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。

3) 肝細胞癌の悪性度と TGF- β シグナル伝達系の異常

肝細胞癌細胞株のマイクロアレイ解析にて、高転移群、低転移群間で発現量に差のある遺伝子を抽出した結果、II 型 TGF- β 受容体 (TGFBR2) 遺伝子の発現低下が高転移株で見出された。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 2cm 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- β に対する応答性を検証した。PLC/PRF/5 において見られる TGF- β 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- β 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- β による発現誘導も確認されたが、細胞運動能は TGF- β 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。

4) 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。

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ラ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) 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 adenylylase 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。

3) 肝細胞癌の悪性度と TGF- β シグナル伝達系の異常

TGF- β 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- β 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- β 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- β 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関連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 2cm 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。TGFBR2 を発現する肝細胞癌細胞株では、TGF- β 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- β 応答性は、TGFBR2 の発現に依存していると思われる。TGF- β 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- β によって誘導された。しかしトランスウェルを用いて TGF- β 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- β 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- β 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。

4) TMA による Cytokeratin (CK) 9 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、新規早期肝細胞癌マーカー CAP2 の葉状突起形成、間質浸潤への関与、肝細胞癌悪性度マーカーとしての TGFBR2 の発現低下、CK19 発現について、肝癌の早期診断・悪性度診断につながる成果が得られた。

F. 研究発表

[平成 20 年度] (2008)

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.

[平成 21 年度] (2009)

1. Sakamoto M. Early HCC: diagnosis and molecular markers. **J Gastroenterol**, 2009;44 Suppl 19:108-11.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

[平成 22 年度] (2010)

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. Uchida H, Yamazaki K, Fukuma M, Yamada T, Hayashida T, Hasegawa H, Kitajima M, Kitagawa Y, Sakamoto M. Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. **Cancer Sci**, 101(7): 1731-7, 2010
 4. Masugi Y, Yamazaki k, Hibi T, Aiura K, Kitagawa Y, Sakamoto M. Solitary cell infiltration is a novel indicator of poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. **Hum Pathol**, 41: 1061-1068, 2010
 5. 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
 6. 16. Tanese K, Fukuma M, Ishiko A, Sakamoto M. Endothelin-2 is upregulated in basal cell carcinoma under control of Hedgehog signaling pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, 391: 486-491, 2010
- G. 知的財産の出願・登録状況
(予定を含む。)
- 1) 特許取得
 1. 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。
 2. 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/JP 2010/054184、2010

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サイエンス研究部人類遺伝学 教授）

研究要旨 肝細胞癌臨床検体を対象にした自作 BAC アレイによるゲノムコピー数解析により、多くのコピー数異常が検出され、癌関連遺伝子の存在を示唆すると共にゲノム不安定性が予後予測指標となっていた。また、肝癌細胞株・臨床検体を対象に CpG island の過剰メチル化と遺伝子発現のゲノムワイドな統合解析アプローチにより、癌特異的な発現抑制が予後予測因子となり発現回復により細胞増殖抑制作用を示す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

[平成 20 年度]

研究 1： 肝癌臨床検体を対象に自作 bacterial artificial chromosome (BAC) アレイ (MCG Cancer Array-800、MCG Cancer Array-1500) を用いて、既報の方法でアレイ comparative genomic hybridization (aCGH) を施行し、ゲノム一次構造（コピー数）異常の評価を行い、臨床・病理学的因子と比較検討した(図 1)。

研究 2： 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。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 で評価することで、癌部特異的な発現低下を示す標的肝癌抑制遺伝子候補を同定した。候補遺伝子は、5-aza 2'-deoxycytidine (5-aza-dCyd) 処理による発現回復の有無、CpG-island のメチル化状況の bisulfite シーケンス法や 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(図 1)。

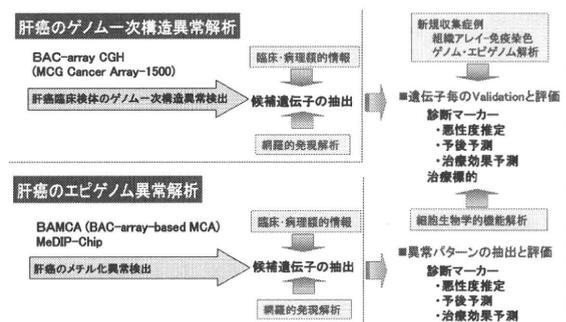


図 1. 肝癌のゲノム・エピゲノム解析による分子標的探索

[平成 21 年度]

研究 1： 平成 20 年度研究 1 により得られたア

レイの結果を、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することで、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(図1)。

研究2: 平成20年度研究2を発展させて、より詳細に異常メチル化の標的となる肝癌抑制遺伝子候補の同定を行うため、オリゴアレイを用いた統合的エピゲノム解析を試みた。具体的には、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) 法で得られる DNA 断片を CpG island array (Agilent 社) により解析し、肝癌細胞株における異常高メチル化領域に座位する遺伝子をゲノムワイドにスクリーニングした。一方、非腫瘍部肝組織と比較して肝癌細胞株で発現が低くかつ 5-aza-dCyd 処理後に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1,2)。

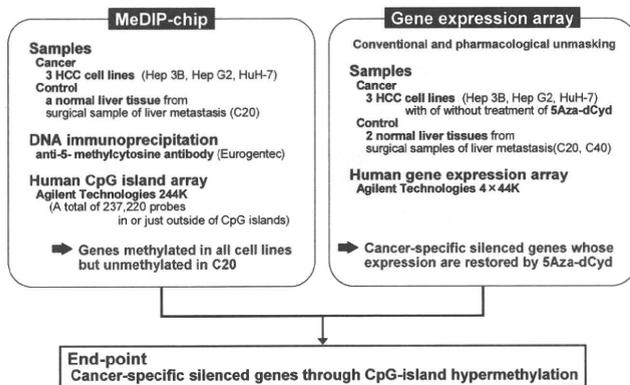


図2. 肝癌特異的にメチル化の標的となる癌抑制遺伝子候補の同定ストラテジー

[平成22年度]

平成20年度研究2で得られた、肝癌細胞株特異的 DNA メチル化により発現消失している肝癌抑制遺伝子候補のゲノムワイドなスクリーニング結果を基に候補遺伝子の、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. 研究結果

[平成20年度]

研究1: 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様々なゲノムコピー数変化が検出された。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あったが、ゲノムコピー数増加としては 1q, 5p, 6p, 8q, 17q など、コピー数減少としては 1p, 4p, 4q, 8p, 13q, 14q, 8q, 17p などを認めた。aCGH 法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が予後指標になる可能性を見

出した (2008 年論文発表 1、その他)。また、コピー数異常領域から、早期発見や病態推定に有用なマーカー領域やその標的遺伝子が同定できる可能性を見出した。

研究 2: 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、肝癌細胞株パネルにおいて正常肝に比較して高頻度に発現が低下し、特に 6 細胞株では発現消失と CpG アイランドの高度メチル化が一致していた。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-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)。しかし、メチル化による発現抑制の頻度が低く、肝癌マーカー候補としての有用性は低いと考えられた。

[平成 21 年度]

研究 1: 平成 20 年度研究 1 において、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で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。

研究 2: 平成 20 年度研究 2 における BAMCA 法による遺伝子同定アプローチを、より詳細かつ体系的に行い候補遺伝子検出を達成するために、オリゴアレイによる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 個の遺伝子が同定された (図 3)。

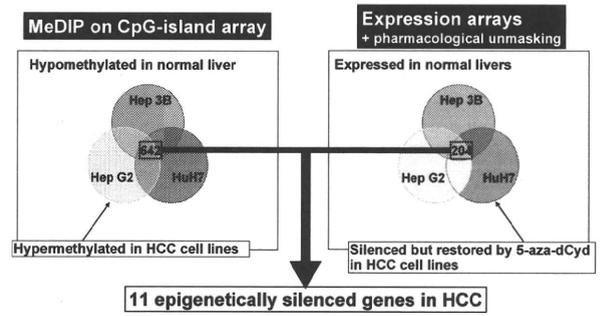


図 3. 肝癌特異的にメチル化の標的となり発現抑制をうける遺伝子候補の抽出

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 (下表)。

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
OClAD2	OClA domain containing 2	4p11
PBX4	pre-B-cell leukemia homeobox 4	19p12
SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	8p11.21

[平成 22 年度]

平成 20 年度研究 2 における肝癌細胞株の統合的エピゲノム解析の結果選択された、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 個について更なる絞込みを行った。肝癌細胞株パネルを用いた CpG island の DNA メチル化 (COBRA 法) と発現低下 (Taqman PCR) の頻度ならびにその一致率を検討した結果、これらの変化が高頻度かつ一致して認められる遺伝子として MZB1 と FAR1 が同定された。さらに臨床検体を用いて同様の検討をすると、MZB1 が最も高頻度に癌部特異的にメチル化に伴い発現消失し