

201207004B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

難治がんの創薬バイオマーカー探索研究

平成20～24年度 総合研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成25（2013）年 5月

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

難治がんの創薬バイオマーカー探索研究

平成20年度～平成24年度  
総合研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成25（2013）年 5月

## 別添 2 (目次)

### I. 総合研究報告

難治がんの創薬バイオマーカー探索研究 . . . . . 1  
山田哲司

I I. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 13

I I I. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 15

厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）

「難治がんの創薬バイオマーカー探索研究」

総括研究報告

氏名	所属	職名
研究代表者 山田哲司	国立がん研究センター研究所	上席副所長
	創薬臨床研究分野	分野長

#### 研究要旨

目的：肝細胞がん、肺がん、胃スキルスがんなどの難治がんの新規治療標的分子と再発や転移、患者の予後やがんの病態を診断するバイオマーカーを同定することを目的として、質の高い臨床情報が付随した患者検体と培養細胞の統合的な所謂オミックス解析を行った。

方法：次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析、ビーズアレイを用いた網羅的 DNA メチル化解析、エクソンアレイを用いた低発現遺伝子のトランスクリプトーム解析、蛍光二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析、逆相タンパク質マイクロアレイ法と絶対定量質量分析を用いたリン酸化タンパク質の網羅的な発現解析を行った。有望な候補分子に対しては培養細胞を用いた機能解析を行い、治療標的として評価した。

結果と考案：肝細胞がんとスキルス胃がんで全エクソンと RNA シーケンス解析を行い、新規の変異や融合遺伝子を同定した。エクソンアレイを用いた網羅的な発現解析で肝細胞がんの治療標的候補分子として AKR1B10、HCAP-G、RRM2、TPX2 の 4 遺伝子を同定した。これらの遺伝子の発現は肝細胞がんにて特異性が高く、肝細胞がん細胞の増殖に必須であり、治療候補分子として有望であると考えられた。逆相タンパク質マイクロアレイ法を用いたリン酸化タンパク質プロファイルにてソラフェニブへの非感受性を予測するバイオマーカーとして p-S6RP を見出した。p-S6RP は mTOR パスウェイの活性化によってもたらされ、ソラフェニブ抵抗性肝細胞がんは mTOR 阻害薬に感受性を示すことを見出した。

今後の方針：ソラフェニブ抵抗性肝細胞がんに対する mTOR 阻害薬の臨床試験の結果が期待される。スキルス胃がん細胞株において発見された新規の非キナーゼ融合変異遺伝子 X（遺伝子名非公開）はアステラス製薬株式会社にて引き続き治療標的分子としての評価を行うとの合意文書を交わした。

## 研究分担者

### 金井弥栄

国立がん研究センター研究所・副所長  
分子病理分野・分野長

### 工藤雅文

アステラス製薬株式会社創薬研究本部・薬理研究所癌研究室・室長

### 中山敬一

九州大学生体防御医学研究所・主幹教授

### 竹内雅博

アステラス製薬株式会社創薬研究本部・薬理研究所癌研究室・専務理事

### 近藤 格

国立がん研究センター研究所創薬プロテオーム研究分野・分野長

### 本田一文

国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野・ユニット長

### 柴田龍弘

国立がん研究センター研究所がんゲノミクス研究分野・分野長

### 浅村尚生

国立がん研究センター中央病院・副院長 呼吸器外科・科長

### 小菅智男

国立がん研究センター中央病院・副院長

### 黒光貞夫

アステラス製薬株式会社創薬研究本部・薬理研究所癌研究室・室長

### 鞍馬岳吏

アステラス製薬株式会社創薬研究本部・薬理研究所癌研究室・主管研究員

## A. 研究目的

肝細胞がん、肺がん、胃スキルスがんなどの難治がんの新規治療標的分子、再発や転移、患者の予後や病態を診断するバイオマーカーを見出すことを目的にゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームの手法を用いた多層オミックス解析を行った。

## B. 研究方法

### シーケンス解析

肝細胞癌臨床検体 20 症例の癌部、非癌部よりゲノム DNA を抽出し、カスタムで作成した SureSelect Array Kit (Agilent) で 511 のキナーゼ遺伝子の全エクソンを選別し、Genome Analyzer IIx (Illumina) を用いてシーケンスした。

スキルス胃がんは臨床検体での遺伝子解析が困難なため、スキルス胃がん細胞株 HSC39, HSC43, HSC44, HSC45, HSC58, HSC59, HSC60, HSC64, NUGC-3, NUGC-4, AZ521, HGC27, Okajima, KATO-III の 14 株の全エクソンをシーケンスした。スキルス胃がん細胞 7 株 (HSC39, HSC43, HSC44, HSC45, HSC58, HSC59, HSC60) の RNA のディープシーケンシング解析データを行った。

独自に作成したキナーゼ活性化変異予測アルゴリズムに、新たな既知キナーゼ遺伝子活性化変異と構造的位相情報を付加し改変したアルゴリズムを開発し、上記の変異配列情報を解析して、活性化変異候補を抽出した。その後、当該変異配列の mRNA レベルで

の発現検討、そして当該変異配列を発見する細胞株での機能解析により、腫瘍増殖ドライバー変異の可能性を検討した。

### エクソンアレイによる発現解析

国立がんセンター中央病院にて切除を受けた肝細胞がんの 20 例のがん組織と背景肝組織、19 種類の全身の正常組織を用いて、ヒト全エクソンにプローブの設計された Human Exon 1.0 ST arrays (Affymetrix 社製) にてゲノム網羅的なエクソンレベルでの遺伝子発現解析を行った。

選択された遺伝子の機能解析は 3 種類の肝細胞がん由来の培養細胞 (KIM-1, Hep3B, HLE) に対して RNA 干渉による細胞増殖を検討した。細胞増殖は Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (Takara Bio) および dye exclusion test にて評価した。

### 逆相タンパク質マイクロアレイ法

(Reverse Phase Protein Array; RPPA)

ガラス基板上に細胞や組織のタンパク抽出液をアレイ化し、様々な抗体を用いて発現の検出を行う逆相タンパク質マイクロアレイ法をリン酸化タンパク質の発現解析に応用し、ウエスタン法に必要とされる 1/10,000 以下の微量な試料でリン酸化タンパク質を網羅的かつ high-throughput に解析できる基盤を確立した。この基盤を用いて 23 種類の肝細胞がん細胞株につ

いて、180箇所のリン酸化部位特異的抗体で、それぞれの細胞のリン酸化タンパク質のプロファイリングを行った。

(倫理面への配慮)

平成19年8月16日改正文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」などに従い、国立がん研究センター倫理委員会に研究の承認を得、倫理面に充分配慮して研究を進めた。手術材料の残余の組織等の研究利用につき文書で同意を得ている。検体は連結可能匿名化し、患者の個人情報保護に充分配慮して進めた。

## C. 研究結果

### 肝細胞がんの新規変異遺伝子

肝細胞癌症例20例の癌部、非癌部における全キナーゼ遺伝子のゲノムDNAディープシーケンシング解析から変異配列候補を抽出した。癌部選択的な発現を示すキナーゼに着目し、改変した予測アルゴリズムにより活性化変異候補としてキナーゼA (V2220G) 変異、キナーゼB (K1172E) 変異を抽出した。

### スキスル胃がんの新規変異遺伝子

スキスル胃がん細胞株14株の全キナーゼ遺伝子のゲノムDNAディープシーケンシング解析から変異配列候補を抽出した。改変したキナーゼ活性化変異予測アルゴリズムにより既知のPIK3CA (E542K) 及びPIK3CA (E545K)

活性化変異がHGC27及びHSC-59細胞株にてコードされていることを検出した。更に、Okajima株におけるキナーゼC (R31G及びL166R) 変異、AZ521株におけるキナーゼD (H176Q) 変異、HSC-59、AZ521株におけるキナーゼE (P469L) 変異、AZ521株におけるキナーゼF (T98M) 変異、HSC-58株におけるキナーゼG (E561G) 変異を抽出した。スキスル胃がん細胞株で見出したキナーゼD (H176Q) 変異、キナーゼE (P469L) 変異、キナーゼF (T98M) 変異、キナーゼG (E561G) 変異は当該発現細胞株での発現抑制、また野生型発現細胞株での発現抑制による細胞増殖阻害の強度の比較を行った結果、いずれの変異ともに強力な腫瘍増殖ドライバー変異として機能していないと結論した。

### スキスル胃がんの新規融合遺伝子

スキスル胃がん細胞株のRNAディープシーケンシング解析データから3個の非キナーゼ融合変異遺伝子を抽出した。RT-PCRにて融合遺伝子の発現が確認された細胞株を用い、siRNAによるノックダウン試験を実施した結果、非キナーゼ融合変異遺伝子Xは、内在発現を示すHSC39での機能検証実験より、当該細胞において腫瘍増殖ドライバーとして機能する可能性が示唆された。

### 肝細胞がんの新規治療標的分子

エクソンアレイ解析にて背景肝組織にくらべ統計学的に有意( $P < 0.001$ ,  $t$

test)で、3倍以上の発現亢進がある9遺伝子(AKR1B10、ANLN、CCNB1、HIST1H3B、HIST1H3C、HIST1H3I、RRM2、TOP2A、TPX2)を選択した。

これらの遺伝子に対し、それぞれ2-3種類のsiRNAを合成し、KIM-1、Hep3B、HLEの3種類の肝細胞がん培養細胞に導入し、2種類以上のsiRNAで20%以上の細胞増殖抑制を示す遺伝子としてTPX2、RRM2、HCAP-G、HIST1H3I、AKR1B10の5遺伝子を選択した。さらに細胞数をカウントし、増殖抑制を確認した。

またエクソアレイに用いたのは別の64例でリアルタイムPCRを行い、肝細胞がんでの発現亢進を検証した。全身の19種類の正常重要臓器のRNAでエクソアレイ解析を行い、TPX2、RRM2、HCAP-Gは胸腺以外で発現が無いことを確認した。AKR1B10は小腸に弱い発現が見られたが、肝細胞がん組織に比べ有意に低値であった。HIST1H3Iは種々の正常臓器で有意な発現をしめしたので、この段階ではずした。

さらに19例の肝細胞がんの切除標本の組織切片で免疫組織染色を行い、TPX2、RRM2、HCAP-G、AKR1B10遺伝子はタンパク質レベルでも肝細胞がんが発現亢進していることを明らかにした。

最後に免疫不全マウスの皮下にKIM-1細胞を注入し、形成させた移植腫瘍に対しsiRNAを投与し、腫瘍の増殖を観察した。KIM-1細胞を注入後1週間で形成された腫瘍に対し、一週間

間隔で2回siRNAを局所投与した。AKR1B10に対するsiRNAは $P < 0.012$ 、TPX2、RRM2、HCAP-Gに対するsiRNAは $P < 0.0001$ の有意差をもって、腫瘍の増殖を抑制した。

#### 肝細胞がんのソラフェニブ抵抗性のバイオマーカー

肝細胞がんの23種の細胞株についてリン酸化プロファイリングとソラフェニブ感受性(IC50)の相関解析を行い、感受性と最も高い相関を示すリン酸化タンパク質としてp-rpS6 S235/236が同定された(スピアマン相関係数0.5791,  $p = 0.0044$ )。p-rpS6 S235/236リン酸化レベルが高くなるに連れてソラフェニブのIC50が高くなることから、p-rpS6 S235/236のリン酸化はソラフェニブ抵抗性の指標となることが予測された。p-rpS6 S235/236抗体を用い、台北医科大学にて、ソラフェニブの治療を受けた肝がん症例の治療前生検試料について免疫組織化学染色を行ったところ、治療効果が見られなかった症例でp-rpS6 S235/236の強い陽性反応が認められた。

ソラフェニブ抵抗性肝細胞がん細胞でp-S6RPはmTORパスウェイの活性化によってもたらされ、ソラフェニブ抵抗性肝細胞がん細胞はmTOR阻害薬AZD8055に感受性を示すことを見出した。

#### D. 考察

改変したキナーゼ活性化変異予測ア



ルゴリズムを用い活性化変異キナーゼを抽出可能であることは示された。しかしながら、現アルゴリズムによる予測においては false-positive も数多く抽出され、ディープシーケンシングにより検出される変異から効率よく活性化変異を予測、抽出する為に、更なるアルゴリズムの改良が必要と考えられた。

我々はバイアスの無い網羅的なゲノム発現解析と独立した症例での検証、正常組織での発現解析、タンパク質レベルでの発現解析、さらに培養細胞と移植腫瘍に対する機能解析で、肝細胞がんの治療標的候補分子として AKR1B10、HCAP-G、RRM2、TPX2 の 4 遺伝子を同定した得ることができた。胸腺組織は成人ではほとんど萎縮していることから、これらの遺伝子の発現は肝細胞がんの特異性が高く、肝細胞がん細胞の増殖に必須であり、治療候補分子として有望である。既に AKR1B10 の肝細胞がんでの特異的な遺伝子発現が報告されていたが、本遺伝子が肝細胞がんの細胞増殖に必須であることは知られていなかった。

HCAP-G、RRM2、TPX2 の 3 遺伝子の肝細胞がんにおける発現や細胞増殖への機能的な関与はまったく新規な知見である。

また、逆相タンパク質マイクロアレイを用いて肝細胞がんにおけるソラフェニブの抵抗性を予測するマーカー候補を見出した。ソラフェニブ抵抗性細胞株では本マーカー候補分子のリン酸化レベルが高く、またソラフェ

ニブ治療を受けた肝細胞がんの患者由来の生検試料においても、治療効果の見られなかった症例で強いリン酸化が認められた。

さらにソラフェニブ抵抗性肝細胞がんは mTOR 阻害薬に感受性を示すことを見出した。ソラフェニブ不応性肝細胞がんに対する mTOR 阻害薬 everolimus のフェーズ III の臨床試験 (EVOLVE-1) の結果が期待される。

## E. 結論

AKR1B10、HCAP-G、RRM2、TPX2 の 4 遺伝子は肝細胞がんの特異性が高く、肝細胞がん細胞の増殖に必須であり、治療候補分子として有望であると考えられた。今後はこれらの遺伝子に対する siRNA を用いた核酸治療、あるいは AKR1B10 と RRM2 は酵素であるため、これに対する阻害化合物の開発に取り組む。肝臓に特異的に siRNA をデリバリーする方法は既にいくつか考案されているものがある。これら 4 遺伝子の発現は背景肝組織での発現が低く、ソラフェニブ治療の対象にならない肝機能の不良症例でも、副作用を抑えた治療が可能であるかもしれない。

スキルス胃がん細胞株において発見された新規の非キナーゼ融合変異遺伝子候補 X はアステラス製薬株式会社にて引き続き更に全長のクローニング、腫瘍特異的な発現、癌化能の有無について検討し、治療標的分子としての評価を行うことになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（抜粋）

【20年度】

**1: Matsubara J, Ono M, Negishi A, Ueno H, Okusaka T, Furuse J, Furuta K, Sugiyama E, Saito Y, Kaniwa N, Sawada J, Honda K, Sakuma T, Chiba T, Saijo N, Hirohashi S, Yamada T.**

Identification of a predictive biomarker for hematologic toxicities of gemcitabine.

*J Clin Oncol.* 2009 May 1;27(13):2261-8.

**2: Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y.**

Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome.

*Carcinogenesis.* 2009 Feb;30(2):214-21.

**3: Orimo T, Ojima H, Hiraoka N, Saito S, Kosuge T, Kakisaka T, Yokoo H, Nakanishi K, Kamiyama T, Todo S, Hirohashi S, Kondo T.**

Proteomic profiling reveals the prognostic value of adenomatous polyposis coli-end-binding protein 1 in

hepatocellular carcinoma.

*Hepatology.* 2008 Dec;48(6):1851-63.

**4: Susaki E, Nakayama K, Yamasaki L, Nakayama KI.**

Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse model.

*Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Mar 31;106(13):5192-7.

**5: Nishiyama M, Oshikawa K, Tsukada Y, Nakagawa T, Iemura S, Natsume T, Fan Y, Kikuchi A, Skoultchi AI, Nakayama KI.**

CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis.

*Nat Cell Biol.* 2009 Feb;11(2):172-82.

【21年度】

**6: Satow R, Shitashige M, Kanai Y, Takeshita F, Ojima H, Jigami T, Honda K, Kosuge T, Ochiya T, Hirohashi S, Yamada T.**

Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma.

*Clin Cancer Res.* 2010 May 1;16(9):2518-28.

**7: Kobayashi E, Masuda M, Nakayama R, Ichikawa H, Satow R, Shitashige M, Honda K, Yamaguchi U, Shoji A, Tochigi N, Morioka H, Toyama Y, Hirohashi S, Kawai A, Yamada T.**

Reduced argininosuccinate synthetase is a predictive biomarker for the development of pulmonary metastasis in patients with osteosarcoma.

*Mol Cancer Ther.* 2010 Mar;9(3):535-44.

**8: Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y.**

Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma.

*Int J Cancer.* 2009 Dec 15;125(12):2854-62.

**9: Kikuta K, Tochigi N, Shimoda T, Yabe H, Morioka H, Toyama Y, Hosono A, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T.**

Nucleophosmin as a candidate prognostic biomarker of Ewing's sarcoma revealed by proteomics.

*Clin Cancer Res.* 2009 Apr 15;15(8):2885-94.

**10: Uemura N, Nakanishi Y, Kato H, Saito S, Nagino M, Hirohashi S, Kondo T.**

Transglutaminase 3 as a prognostic biomarker in esophageal cancer revealed by proteomics.

*Int J Cancer.* 2009 May 1;124(9):2106-15.

**11: Tsukada Y, Ishitani T, Nakayama KI.**

KDM7 is a dual demethylase for histone H3 Lys 9 and Lys 27 and functions in brain development.

*Genes Dev.* 2010 Mar 1;24(5):432-7.

**12: Lin HK, Chen Z, Wang G, Nardella C, Lee SW, Chan CH, Yang WL, Wang J, Egia A, Nakayama KI, Cordon-Cardo C, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP.**

*Skp2* targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence.

*Nature.* 2010 Mar 18;464(7287):374-9.

【 2 2 年度】

**13: Nagashio R, Arai E, Ojima H, Kosuge T, Kondo Y, Kanai Y.**

Carcinogenetic risk estimation based on quantification of DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage.

*Int J Cancer.* 2011 Sep 1;129(5):1170-9.

**14: Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y.**

Copy number alterations in urothelial carcinomas: their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations.

*Carcinogenesis.* 2011 Apr;32(4):462-9.

**15: Arai E, Kanai Y.**

DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status.

*Epigenomics*. 2010 Jun;2(3):467-81.

**16: Kikuta K, Tochigi N, Saito S, Shimoda T, Morioka H, Toyama Y, Hosono A, Suehara Y, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T.**

Peroxiredoxin 2 as a chemotherapy responsiveness biomarker candidate in osteosarcoma revealed by proteomics. *Proteomics Clin Appl*. 2010 May;4(5):560-7.

**17: Onoyama I, Suzuki A, Matsumoto A, Tomita K, Katagiri H, Oike Y, Nakayama K, Nakayama KI.**

Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. *J Clin Invest*. 2011 Jan;121(1):342-54.

**18: Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I, Gao D, Tseng A, Maser RS, Zhai B, Wan L, Gutierrez A, Lau AW, Xiao Y, Christie AL, Aster J, Settleman J, Gygi SP, Kung AL, Look T, Nakayama KI, DePinho RA, Wei W.**

SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction.

*Nature*. 2011 Mar 3;471(7336):104-9.

**19: Wu H, Pomeroy SL, Ferreira M,**

**Teider N, Mariani J, Nakayama KI, Hatakeyama S, Tron VA, Saltibus LF, Spyrapoulos L, Leng RP.**

UBE4B promotes Hdm2-mediated degradation of the tumor suppressor p53. *Nat Med*. 2011 Mar;17(3):347-55.

【 23年度】

**20: Satow R, Shitashige M, Jigami T, Fukami K, Honda K, Kitabayashi I, Yamada T.**

$\beta$ -Catenin inhibits promyelocytic leukemia protein tumor suppressor function in colorectal cancer cells.

*Gastroenterology*. 2012 Mar;142(3):572-81.

**21: Ito H, Honda K, Satow R, Arai E, Shitashige M, Ono M, Sakuma T, Sakano S, Naito K, Matsuyama H, Yamada T.**

Combined functional genome survey of therapeutic targets for clear cell carcinoma of the kidney.

*Jpn J Clin Oncol*. 2011 Jul;41(7):847-53.

**22: Nagashio R, Arai E, Ojima H, Kosuge T, Kondo Y, Kanai Y.**

Carcinogenetic risk estimation based on quantification of DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage.

*Int J Cancer*. 2011 Sep 1;129(5):1170-9.

**23: Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I,**

**Inazawa J, Kanai Y.**

Copy number alterations in urothelial carcinomas: their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations.

*Carcinogenesis*. 2011 Apr;32(4):462-9.

**24: Arai E, Nakagawa T, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, Kanai Y.**

DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma.

*Histopathology*. 2012 May;60(6B):E12-8.

**25: Kikuta K, Kubota D, Saito T, Orita H, Yoshida A, Tsuda H, Suehara Y, Katai H, Shimada Y, Toyama Y, Sato K, Yao T, Kaneko K, Beppu Y, Murakami Y, Kawai A, Kondo T.**

Clinical proteomics identified ATP-dependent RNA helicase DDX39 as a novel biomarker to predict poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumor.

*J Proteomics*. 2012 Feb 2;75(4):1089-98.

**26: Morofuji N, Ojima H, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Asahina D, Ushigome M, Hiraoka N, Nagino M, Kondo T.**

Macrophage-capping protein as a tissue biomarker for prediction of response to gemcitabine treatment and prognosis in

cholangiocarcinoma.

*J Proteomics*. 2012 Feb 16;75(5):1577-89.

**27: Moroishi T, Nishiyama M, Takeda Y, Iwai K, Nakayama KI.**

The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo.

*Cell Metab*. 2011 Sep 7;14(3):339-51.

**28: Matsumoto A, Takeishi S, Kanie T, Susaki E, Onoyama I, Tateishi Y, Nakayama K, Nakayama KI.**

p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells.

*Cell Stem Cell*. 2011 Sep 2;9(3):262-71.

**29: Onoyama I, Suzuki A, Matsumoto A, Tomita K, Katagiri H, Oike Y, Nakayama K, Nakayama KI.**

Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver.

*J Clin Invest*. 2011 Jan;121(1):342-54.

【 24年度】

**1: Miyanaga A, Honda K, Tsuta K, Masuda M, Yamaguchi U, Fujii G, Miyamoto A, Shinagawa S, Miura N, Tsuda H, Sakuma T, Asamura H, Gemma A, Yamada T.**

Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours.

*Ann Oncol*. 2013 Jan;24(1):84-90.

**2: Arai E, Chiku S, Mori T, Gotoh M, Nakagawa T, Fujimoto H, Kanai Y.**

Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas.

*Carcinogenesis*. 2012 Aug;33(8):1487-93.

**3: Sato T, Arai E, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T, Kanai Y.**

DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma.

*PLoS One*. 2013;8(3):e59444.

**4: Huang C, Ding G, Gu C, Zhou J, Kuang M, Ji Y, He Y, Kondo T, Fan J.**  
Decreased selenium-binding protein 1 enhances glutathione peroxidase 1 activity and downregulates HIF-1 $\alpha$  to promote hepatocellular carcinoma invasiveness.

*Clin Cancer Res*. 2012 Jun 1;18(11):3042-53.

**5: Huang C, Wang Y, Liu S, Ding G, Liu W, Zhou J, Kuang M, Ji Y, Kondo T, Fan J.**

Quantitative Proteomic Analysis Identified Paraoxonase 1 as a Novel Serum Biomarker for Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma.

*J Proteome Res*. 2013 Mar 5. [Epub ahead of print]

**6: Kimura K, Ojima H, Kubota D, Sakumoto M, Nakamura Y, Tomonaga T, Kosuge T, Kondo T.**

Proteomic identification of the macrophage-capping protein as a protein contributing to the malignant features of hepatocellular carcinoma.

*J Proteomics*. 2013 Jan 14;78:362-73.

**7: Takeishi S, Matsumoto A, Onoyama I, Naka K, Hirao A, Nakayama KI.**

Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *Cancer Cell*. 2013 Mar 18;23(3):347-61.

**8: Hirano A, Yumimoto K, Tsunematsu R, Matsumoto M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Nakagawa T, Lanjakornsiripan D, Nakayama KI, Fukada Y.** FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes.

*Cell*. 2013 Feb 28;152(5):1106-18.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 発明の名称：「肝臓特異的発現遺伝子による肝臓の検査方法及び肝臓の治療及び予防剤」

①発明者：山田哲司、下重美紀、佐藤礼子、廣橋説雄

②出願日：2009年3月10日(国際PCT出願)

③出願番号：PCT/JP2009/54428

④出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

⑤発明の内容の概略：AKR1B10, HCAP-G, TPX2 が肝細胞がん特異的に発現し、これらの遺伝子の発現を抑制することで、肝細胞がんの増殖抑制をもたらすことを見出した。

2) 発明の名称：「肝細胞癌マーカー及び肝細胞癌の検査方法」

①発明者：近藤格、折茂達也、尾島英知、廣橋説雄

②出願日：2008年12月16日(国際PCT出願)

③出願番号：PCT/JP2008/71495

④出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

⑤発明の内容の概略：肝細胞癌の予後を判断するための新規肝細胞癌マーカー及び当該マーカーを用いた肝細胞癌の検査方法に関する。より詳しくは、肝細胞癌を患う患者の予後を予測するための検査方法に関し、さらには検査のための検査用試薬キットに関する。

別紙4 研究成果の刊行に関する一覧表

**1: Satow R, Shitashige M, Kanai Y, Takeshita F, Ojima H, Jigami T, Honda K, Kosuge T, Ochiya T, Hirohashi S, Yamada T.**

Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma.

*Clin Cancer Res.* 2010 May 1;16(9):2518-28.

**2: Miyanaga A, Honda K, Tsuta K, Masuda M, Yamaguchi U, Fujii G, Miyamoto A, Shinagawa S, Miura N, Tsuda H, Sakuma T, Asamura H, Gemma A, Yamada T.**

Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours.

*Ann Oncol.* 2013 Jan;24(1):84-90.

**3: Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y.**

Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma.

*Int J Cancer.* 2009 Dec 15;125(12):2854-62.

**4: Arai E, Kanai Y.**

DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status.

*Epigenomics.* 2010 Jun;2(3):467-81.

**5: Nagashio R, Arai E, Ojima H, Kosuge T, Kondo Y, Kanai Y.** Carcinogenetic risk estimation based on quantification of DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage.

*Int J Cancer.* 2011 Sep 1;129(5):1170-9.

**6: Orimo T, Ojima H, Hiraoka N, Saito S, Kosuge T, Kakisaka T, Yokoo H, Nakanishi K, Kamiyama T, Todo S, Hirohashi S, Kondo T.**

Proteomic profiling reveals the prognostic value of adenomatous polyposis coli-end-binding protein 1 in hepatocellular carcinoma.

*Hepatology.* 2008 Dec;48(6):1851-63.



**7: Huang C, Ding G, Gu C, Zhou J, Kuang M, Ji Y, He Y, Kondo T, Fan J.**  
Decreased selenium-binding protein 1 enhances glutathione peroxidase 1 activity and downregulates HIF-1 $\alpha$  to promote hepatocellular carcinoma invasiveness.  
*Clin Cancer Res.* 2012 Jun 1;18(11):3042-53.

**8: Huang C, Wang Y, Liu S, Ding G, Liu W, Zhou J, Kuang M, Ji Y, Kondo T, Fan J.**  
Quantitative Proteomic Analysis Identified Paraoxonase 1 as a Novel Serum Biomarker for Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma.  
*J Proteome Res.* 2013 Mar 5. [Epub ahead of print]

**9: Kimura K, Ojima H, Kubota D, Sakumoto M, Nakamura Y, Tomonaga T, Kosuge T, Kondo T.**  
Proteomic identification of the macrophage-capping protein as a protein contributing to the malignant features of hepatocellular carcinoma.  
*J Proteomics.* 2013 Jan 14;78:362-73.

**10: Onoyama I, Suzuki A, Matsumoto A, Tomita K, Katagiri H, Oike Y, Nakayama K, Nakayama KI.**  
Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver.  
*J Clin Invest.* 2011 Jan;121(1):342-54.

## Combined Functional Genome Survey of Therapeutic Targets for Hepatocellular Carcinoma

Reiko Satow<sup>1</sup>, Miki Shitashige<sup>1</sup>, Yae Kanai<sup>2</sup>, Fumitaka Takeshita<sup>3</sup>, Hidenori Ojima<sup>2</sup>, Takafumi Jigami<sup>1</sup>, Kazufumi Honda<sup>1</sup>, Tomoo Kosuge<sup>4</sup>, Takahiro Ochiya<sup>3</sup>, Setsuo Hirohashi<sup>1,2</sup>, and Tesshi Yamada<sup>1</sup>

### Abstract

**Purpose:** The outcome of patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) has remained unsatisfactory. Patients with HCC suffer from chronic hepatitis or liver cirrhosis, and their reserve liver function is often limited.

**Experimental Design:** To develop new therapeutic agents that act specifically on HCC but interfere only minimally with residual liver function, we searched for genes that were upregulated in 20 cases of HCC [namely, discovery sets 1 ( $n = 10$ ) and 2 ( $n = 10$ )] in comparison with corresponding nontumorous liver and a panel representing normal organs using high-density microarrays capable of detecting all exons in the human genome.

**Results:** Eleven transcripts whose expression was significantly increased in HCC were subjected to siRNA-based secondary screening of genes required for HCC cell proliferation as well as quantitative reverse transcription-PCR analysis [validation sets 1 ( $n = 20$ ) and 2 ( $n = 44$ )] and immunohistochemistry ( $n = 19$ ). We finally extracted four genes, *AKR1B10*, *HCAP-G*, *RRM2*, and *TPX2*, as candidate therapeutic targets for HCC. siRNA-mediated knockdown of these candidate genes inhibited the proliferation of HCC cells and the growth of HCC xenografts transplanted into immunodeficient mice.

**Conclusions:** The four genes we identified were highly expressed in HCC, and HCC cells are highly dependent on these genes for proliferation. Although many important genes must have been overlooked, the selected genes were biologically relevant. The combination of genome-wide expression and functional screening described here is a rapid and comprehensive approach that could be applied in the identification of therapeutic targets in any type of human malignancy. *Clin Cancer Res*; 16(9): 2518–28. ©2010 AACR.

Liver cancer is the fifth most common human cancer worldwide and the third most common cause of cancer mortality. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common histologic subtype of liver cancer and is highly endemic in Southeast Asia and sub-Saharan Africa (1). HCC develops mainly in liver affected by chronic hepatitis or cirrhosis caused by persistent infection with hepatitis B or C virus; however, the precise molecular mechanisms that drive the transition from the background liver condi-

tions to cancer are largely unknown. Liver resection, ethanol injection, radiofrequency ablation, and chemoembolization have been used successfully for the local management of HCC; however, no single cytotoxic chemotherapeutic agent has been proven effective for the systemic treatment of HCC; thus, the outcome for patients with locally advanced, multicentric, and/or metastatic HCC who are not eligible for these local treatments has remained unsatisfactory.

An increasing number of therapeutic agents targeting molecular components essential for cancer cell growth have begun to be incorporated into oncological practice: Imatinib, which blocks the Bcr-Abl fusion kinase of chronic myeloid leukemia (CML), is currently the first-line therapy for CML (2). The epidermal growth factor receptor inhibitors gefitinib and erlotinib have been used in the treatment of advanced non-small cell lung cancer (3). Recently, it was shown in a phase III study that sorafenib (BAY 43-9006), a multikinase inhibitor, significantly improved the overall survival of patients with advanced HCC (4, 5), and, consequently, sorafenib has since been approved for the treatment of patients with unresectable HCC by the American Food and Drug Administration. However, most patients enrolled in those studies retained relatively well-compensated

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Chemotherapy Division, <sup>2</sup>Pathology Division, and <sup>3</sup>Section for Studies on Metastasis, National Cancer Center Research Institute; and <sup>4</sup>Hepatobiliary and Pancreatic Surgery Division, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan

**Note:** Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Microarray data from this study have been submitted to the Gene Expression Omnibus database (accession no. GSE12941).

**Corresponding Author:** Tesshi Yamada, Chemotherapy Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan. Phone: 81-3-3542-2511; Fax: 81-3-3547-6045; E-mail: tyamada@ncc.go.jp.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2214

©2010 American Association for Cancer Research.

### Translational Relevance

Liver cancer is the fifth most common human cancer worldwide and the third most common cause of cancer mortality. Recently, a multikinase inhibitor, sorafenib, has been approved as a systemic chemotherapeutic drug for advanced hepatocellular carcinoma (HCC); however, further improvement seems to be necessary. To identify an "Achilles heel" of HCC cells and develop new therapeutic agents that act specifically on HCC but interfere only minimally with residual liver function, we performed an unbiased survey of the whole genome. We finally identified four genes as candidates. siRNA-mediated knockdown of these candidate genes inhibited the proliferation of HCC cells and the growth of HCC xenografts transplanted into immunodeficient mice, confirming their feasibility as therapy targets.

liver function. In reality, the reserve liver function of HCC patients is often limited due to underlying liver conditions. Therefore, the safety and tolerability of sorafenib remain to be determined in HCC patients with compromised liver function. Therapeutic targeting molecules other than protein kinases have also been developed against various tumors of other organs (6–8). To identify a molecule essential for HCC cell growth and develop new therapeutic agents that would act specifically on HCC and only minimally interfere with residual liver function, a survey of the whole genome would be necessary.

In this study, we adopted a combined functional approach. We first searched for genes that were upregulated in HCC in comparison with the background nontumorous liver tissue. This was followed by siRNA-based screening of genes required for HCC cell proliferation. Recently, whole-genome RNA interference (RNAi)-based functional screening has been reported to successfully identify genes that sensitize lung cancer cells to a chemotherapeutic drug and genes required for proliferation and survival of several cancer cell lines; however, in those studies, the expressional specificity of the identified targets was not taken into consideration (9–12). Here, we report the identification of possible therapeutic target molecules of HCC through a combination of genome-wide expression and functional screening.

### Materials and Methods

**Patients and microarray analysis.** Samples of HCC and surrounding nontumorous liver tissue were collected from 84 patients who underwent liver resection for HCC at the National Cancer Center Hospital (Tokyo, Japan) with informed consent. The clinical and histologic data for these patients are summarized in Supplementary Table S1. Total

RNA of normal human organs was obtained from a commercial source (FirstChoice Human Total RNA Survey Panel, Ambion).

One microgram of total RNA was converted to end-labeled cRNA using a Whole Transcript Sense Target Labeling kit (Affymetrix). The fluorescent cRNA probes were hybridized to Human Exon 1.0 ST arrays (Affymetrix), as instructed by the supplier. Data analysis was carried out using the ArrayAssist software package (version 5.5.1, Stratagene). A GC content-based background correction followed by quantile normalization was done with an exonRNA algorithm available in the package. Multiple exon expression data were also summarized into a single value using the same algorithm, as instructed by the supplier (<http://www.stratagene.com/manuals/ArrayAssist.pdf>).

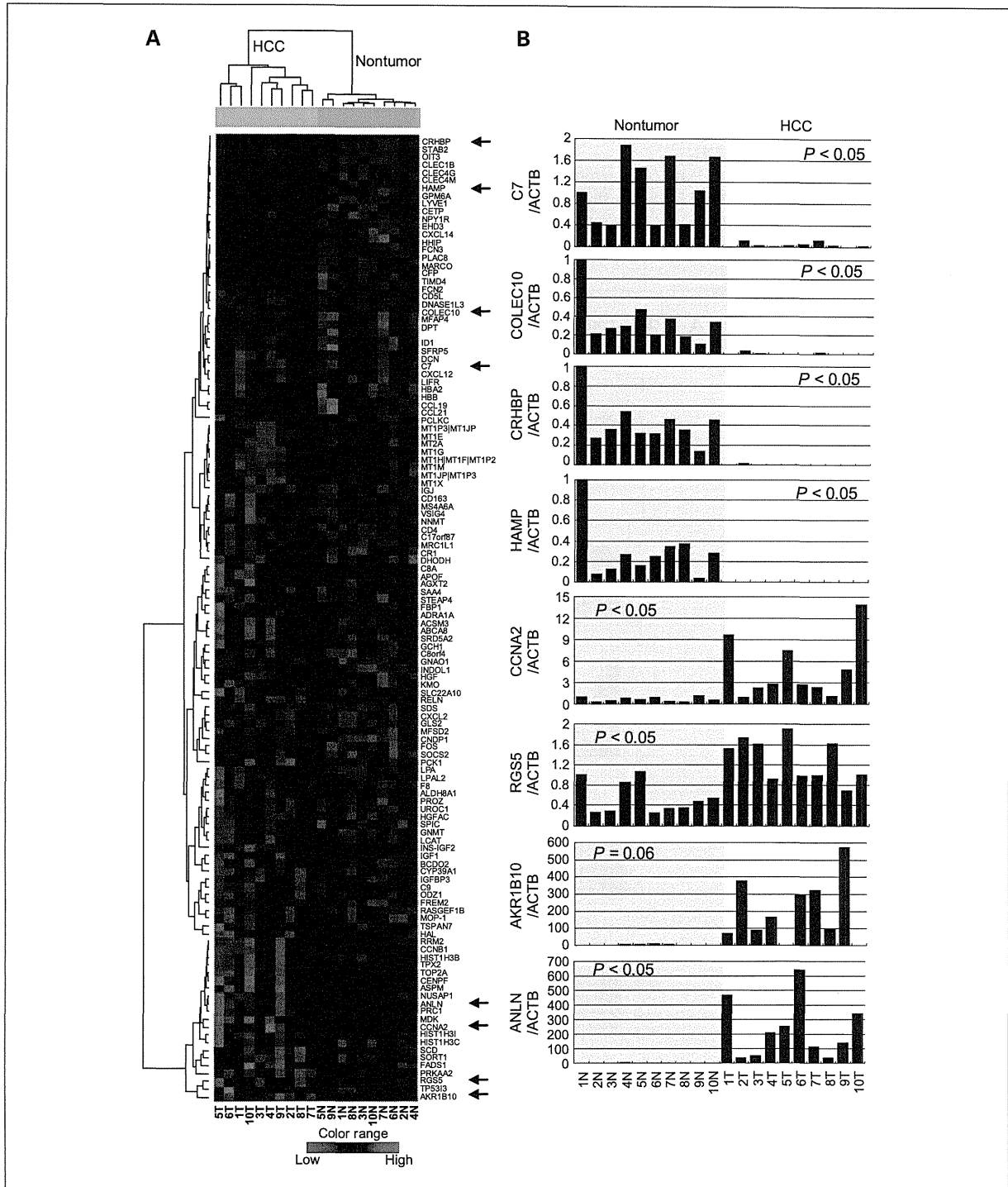
The protocol of this study was reviewed and approved by the ethics committee of the National Cancer Center (Tokyo, Japan).

**Cell lines.** Three human cell lines derived from HCC were used in this study. KIM-1 was kindly provided by Dr. Masamichi Kojiro (Kurume University, Kurume, Japan). Hep3B was obtained from the Cell Resource Center for Biomedical Research, Tohoku University (Sendai, Japan). HLE was obtained from the Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan). KIM-1 and Hep3B were maintained in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum. HLE was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum.

**siRNA-based functional screening.** The day before siRNA transfection, cells were seeded at  $5 \times 10^3$  per well in 96-well plates to obtain 50% to 60% confluency. They were then transfected with siRNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) at a concentration of 10, 20, or 50 nmol/L in KIM1, Hep3B, or HLE cells, respectively. Three days later, the relative proportion of living cells was assessed using a Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (Takara Bio) in accordance with the manufacturer's instructions. The siRNA was synthesized by Ambion, and the identification (ID) numbers of siRNAs used in this study are listed in Supplementary Table S4. Silencer Negative Control #1 siRNA (Ambion) was used as a nontargeting control. siRNA targeting *TOP2A* was described previously (13).

**Real-time PCR.** First-strand cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA using SuperScript reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was done as described previously (14). Primers and probes sets were obtained from Applied Biosystems, and their Assay IDs are provided in Supplementary Table S5. The amplification reaction was done according to the manufacturer's instructions (95°C for 10 minutes followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds, 50°C for 2 minutes, and 60°C for 1 minute).

**Immunohistochemistry and immunoblot analysis.** Anti-AKR1B10 (clone 1A6) and anti-HCAP-G (clone 4B1) monoclonal antibodies were purchased from Abnova. Anti-RRM2 antibody (E-16) was purchased from Santa



**Fig. 1.** Genes differentially expressed between HCC and nontumorous liver. A, hierarchical clustering of 124 genes whose expression differed significantly ( $P < 0.001$  and  $>3$ -fold change) between HCC and adjacent nontumorous liver. Transcriptional signal intensity is shown as a heat map. Red indicates higher signals, whereas blue indicates lower signals. Arrows indicate eight genes selected for validation by real-time PCR (B). B, validation of the microarray data by real-time RT-PCR. The expression levels of eight representative genes whose expression differed significantly between adjacent nontumorous liver (left) and HCC (right) were validated by real-time RT-PCR (shown in arbitrary units). Significant correlation between array (discovery set 1) and real-time RT-PCR data was confirmed by calculating correlation coefficient values in eight randomly selected genes (indicated by arrows in A): C7, 0.96; COLEC10, 0.97; CRHBP, 0.98; HAMP, 0.98; CCNA2, 0.82; RGS5, 0.80; AKR1B10, 0.98; ANLN, 0.92. The significance of differential expression between HCC and adjacent nontumorous liver tissue was assessed using a permutation paired  $t$  test, and Bonferroni-corrected  $P$  values are provided.