

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590717

研究課題名（和文） 高密度マイクロアレイを用いた包括的ゲノム解析による肝細胞癌の発生・再発機構の解明

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of allelic imbalance by using high-density single nucleotide polymorphism array in hepatocellular carcinoma

研究代表者：金井 文彦(KANAI FUMIHIKO)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70334399

研究成果の概要：

我々は、肝細胞癌の細胞株から抽出したゲノム DNA や、肝細胞癌および非癌部肝組織をレーザーマイクロダイセクションにより切り出し、抽出したゲノム DNA について、100 k または 500 k chip を用いて共通の遺伝子増幅および欠失領域や LOH の有無を解析してきた。肝細胞癌において染色体 8q22.3 領域が高頻度に遺伝子増幅をおこし、その染色体領域にコードされる GRHL2 遺伝子増幅が、肝細胞癌の早期再発に相関していることを見出した。RNAi により肝癌培養細胞の内在性 GRHL2 を knock down すると細胞増殖が抑制されることから、GRHL2 の増幅は、肝細胞癌再発の予測因子となる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：マイクロアレイ、ゲノム、肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌はその病理学的特性から、発症すると難治性の経過をたどる予後不良の疾患であり、治療成績向上のための研究と発症予防に対する対策が急務である。肝細胞癌は、世界的に特にアジアやアフリカで発生頻度が高く、日本でも罹患率及び死亡率の高い癌種の1つである。本邦における肝癌の年間死亡者数は約3万4千人で、肺、胃、大腸に次ぎ第4位であるが、そのほとんどが肝細胞癌である。肝細胞癌は、約80%がC型肝炎ウイルス(HCV)、約10%がB型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染による慢性肝炎・肝硬変を母地として発生する。治療法は、手術、肝動脈塞栓療法、経皮的ラジオ波焼灼(RFA)療法、化学療法、放射線療法、肝移植など多岐にわたるが、他の癌種の相対生存率と比較してもその予後は不良である。これは、肝細胞癌が多中心性発生や肝内転移により極めて高い確率で再発することや、多くが肝硬変を伴っていることから、再発病変に治療を繰り返すうちに肝不全が進行することにある。

HCVとHBVによる肝発癌のメカニズムは異なる。HCVではウイルスの持続感染による慢性肝炎から長い年月をかけて肝硬変へ進行し、肝細胞癌が発生する場合が多く(感染から肝癌発生までの期間は一般に30年以上)、繊維化の程度によって発癌率が増えてくる階段状モデルをたどる。一方、HBVでは時に肝硬変をスキッ

プして発癌し、罹患期間や繊維化の程度から発癌率は推定しにくい。HBV遺伝子は宿主染色体遺伝子に組み込まれ、またHBX遺伝子産物が肝細胞の増殖を促進することから発癌性の高いウイルスと考えられる。しかし、これらのウイルスによる肝発癌の分子メカニズムには不明の点も多い。

肝内の再発様式は複雑である。我々の解析では、肝硬変(F4)からの年発癌率が5~7%であるのに対し、初発肝癌に対してRFAを施行した患者集団のその後1年間の再発率は約20%、2年間の再発率は約40%である。初発癌を根治しても次の癌ができる確率が著しく高まり、多発傾向を示すことは、多中心性のde novo発癌のみでは説明しえず、肝内転移がかなりの頻度で起こっていると考えられる。しかし、再発癌が原発癌と同じクローン由来か否かを明らかにすることが従来の手法では必ずしも容易ではなく、再発癌のclonalityに関する明確な報告はない。

遠隔転移のメカニズムも不明な点が多い。肝癌は、一般に他の癌種に比べ増殖は遅く、転移も肝臓内におこることが多い。当施設でRFAを施行した多数症例の解析でも、経過観察中に肝外転移をおこした症例は全症例の10%程度であった。頻度は低いながらも、治療を繰り返すうちリンパ節・肺・骨・副腎・腹膜・脳などの遠隔転移、門脈腫瘍塞栓の出現、癌の急速な増大などの悪性転換を引き起こす。

しかし、これらのさらなる悪性転換にどのような分子が関わっているかは、依然不明の点が多い。これは、肝細胞癌が長らくアジアの特殊な病気であるという認識から、大腸癌に比較し世界的な観点からも研究が遅れていることも一因である。肝細胞癌に関しては、本邦の基礎・臨床研究水準はきわめて高く、高感染地域であるアジアで日本が世界の先頭に立ち、肝細胞癌の予後改善を目指して研究を進めてゆかねばならない立場にある。

2. 研究の目的

ウイルス肝炎・肝硬変からの肝発癌、肝内転移・肝外転移、門脈内浸潤などの肝細胞癌の発生・再発・進展に関わる分子を、近年進歩の著しい高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた網羅的ゲノム解析により明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

GeneChip Human Mapping 100k Set アレイは、SNPs 判定に用いたプローブのシグナル強度とデータ解析ソフトとして CNAG を使用することで、従来の CGH array 等 (1 Mb 程度) より高解像度で、染色体のより小さい増幅、欠失領域の検出が可能であり、さらに、SNP call の有無で LOH の有無が判定できる。我々は、肝細胞癌の細胞株から抽出したゲノム DNA や、肝細胞癌および非癌部肝組織をレーザーマイクロダイセクションにより切り出し、抽出したゲノム DNA について、100 k または 500 k chip を用いて共通の遺伝子増幅および欠失領域や LOH の有無を解析した。

4. 研究成果

肝細胞癌において染色体 8q22.3 領域が高頻度に遺伝子増幅をおこし、その染色体領域にコードされる GRHL2 遺伝子増幅が、肝細胞癌の早期再発に相関していることを見出した。RNAi により肝癌培養細胞の内在性 GRHL2 を knock down すると細胞増殖が抑制されることから、GRHL2 の増幅は、肝細胞癌再発の予測因子となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Tanaka Y et al., Gain of GRHL2 is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 49:746-757, 2008 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 田中康雄ら 高密度オリゴヌクレオチドアレイによる肝細胞癌の生物学的特性・再発に関連するゲノム異常解析 日本肝臓学会 2008 年 6 月 5 日 愛媛県民会館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 文彦 (KANAI FUMIHIKO)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 70334399

(2) 研究分担者

田中 康雄 (TANAKA YASUO)

東京大学・医学部附属病院・寄付講座教員

研究者番号 : 40422290