

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2007～2008

課題番号： 19591601

研究課題名 (和文) 早期肝細胞癌を用いた肝癌多段階発癌における包括的ゲノムコピー数の解析

研究課題名 (英文) Copy number analysis for stepwise hepatocarcinogenesis using early hepatocellular carcinoma

研究代表者

緑川 泰 (MIDORIKAWA YUTAKA)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：10292905

研究成果の概要：わが国における肝細胞癌の90%以上の症例は肝炎ウイルス罹患による慢性肝疾患を発生母地としており、前癌病変である再生結節や腺腫様過形成から早期肝癌へと移行する。本研究では SNP アレイを用いたコピー数解析法により早期肝癌から進行肝癌へと進展する過程での染色体変化を明らかにし、また肝癌進展に寄与する癌抑制遺伝子 CSMD1 を同定し、同遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化による不活化が重要であることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：遺伝子、癌、ゲノム、病理学、マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

わが国における肝細胞癌の90%以上の症例は肝炎ウイルス罹患による慢性肝疾患を発生母地としており、前癌病変である再生結節や腺腫様過形成から早期肝癌へと移行する。早期肝癌の多くは肉眼的には腫瘍径が2cm以下の境界不明瞭な病変であり、組織学的には核異型は乏しいが構造異型を伴う。また、腫瘍内に門脈域が残存することも早期肝癌の組織学的特徴の一つであり、臨床的な予後は古典的肝細胞癌と比較して良好である(Takayama T, et al. *Hepatology*.1998)。

早期肝癌の一部の細胞は時間の経過とともに脱分化を来し、その腫瘍内に比較的分化度の低い肝細胞癌が生じて結節内結節像を呈する(Kojiro M, et al. *Intervirology*.2004)。その後内側の腫瘍は分化度の高い早期肝癌に相当する腫瘍に対して置換性に増殖することにより古典的肝細胞癌となる。

以上のように肝発癌は多段階発癌であり、結節内結節像を呈する肝細胞

(hepatocellular carcinoma with nodule-in-nodule appearance = NIN) は癌進展における経時的变化を反映すると言え

る。我々は外科的に切除されたNINについて包括的遺伝子解析を行うことにより肝癌の進展に伴う遺伝子群を同定し得たが(Midorikawa Y, *et al. Jpn J Cancer Res.*2002)、発現解析に加えてマイクロアレイ技術を利用した包括的ゲノムコピー数解析が可能となり(Pinkel D, *et al. Nat Genet.*1998)、さらにプロモーター領域のメチル化などの癌化における重要性が唱えられている近年、同一サンプルを用いた転写・コピー数・エピゲノム解析による総合的な解析が必要である。

## 2. 研究の目的

US・CT・MRI・血管造影などの画像診断や血清学的診断の技術的な進歩にもかかわらず、早期肝細胞癌の術前診断は古典的肝細胞癌と比較して困難であることが多い。さらに、生検・切除標本を用いた臨床病理学的な検査においても病理医によって診断が異なる症例が依然として存在し、早期肝細胞癌の確定診断が困難であることが少なくない。NINの各病変の染色体数を包括的に解析することにより肝硬変内の再生結節・早期肝細胞癌・古典的肝細胞癌と順次進行してゆく病変での共通した段階的なコピー数変化を同定し、早期肝細胞癌診断への臨床応用の一助とすることを本研究における目的とする。また、遺伝子発現プロファイルは染色体変化の影響を強く反映するという事実を明らかにしており (Midorikawa Y, *et al. Cancer Res.*2004)、早期肝細胞癌での染色体変化領域を同定することにより、早期肝癌診断用マーカーの候補遺伝子についての選定も可能であると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) 結節内結節像を示す肝細胞癌における外側腫瘍(早期肝癌)と内側腫瘍(進行肝癌)をGIMを用いて比較することにより肝癌多段階発癌におけるコピー数変化を調べた。

(2) 以上のように外側腫瘍と内側腫瘍の比較を結節内結節像を呈する肝癌5症例に対して行ったところ、25領域で肝癌脱分化に際し染色体変化が生じていることが認められた。また、これら結節内結節像を呈する肝癌とは独立した早期肝癌14例、進行肝癌25例からなるサンプルセットについてもGIMによるコピー数解析を行い、図のような変化領域を同定し得た。

(3) 結節内結節像を呈する肝癌において同定された肝癌多段階発癌においてコピー数が変化していた25領域を変数として早期肝癌14例と進行肝癌25例を分類する決定木を作成し、肝癌進展に寄与する染色体変化領域を同定しえた。

(4) 上記の解析で同定した領域でわれわれは進行肝癌において8p23.2に高頻度(進行肝癌32例中2例、および以前の解析で36例中1例)にホモ欠失領域を認め、3例に共通する領域に*CSMD1*を同定した

## 4. 研究成果

(1) 外側腫瘍から脱分化して発生したと考えられる内側腫瘍は、すべて肝発癌の初期段階である外側腫瘍の染色体変化を包含し、さらに数か所の変化が加わることにより進行肝癌へ移行したものと考えられた。

(2) 5q11.1-35.3、8q11.1-24.3の増加と4q11-34.3、8p11.21-23.3のLOHの肝癌進展への関与が考えられた。一方で1q21.3-44における増加とp36.21-36.32と17p13.1-13.3におけるLOHは肝発癌に関与していることが示された

(3) *CSMD1*は頭頸部癌で以前に癌抑制遺伝子として報告されているが、その他の癌での報告例はなく、またその機能も明らかにされていない。肝細胞癌では*CSMD1*の機能喪失により早期肝癌から進行肝癌へ進展するものと考えられた。

## 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9件)

①Midorikawa Y, Tang W, Sugiyama Y. High-resolution mapping of copy number aberrations and identification of target genes

in hepatocellular carcinoma.  
*Bioscience Trends*. 2007; 1:  
26-32.

②Yamakawa T, Tianhua Z,  
Midorikawa Y, Ishiyama J,  
Takahashi K, Sugiyama Y. A case  
of cystic duct drainage into the  
left intrahepatic duct and the  
importance of Laparoscopic  
Fundus-First-Cholecystectomy  
for prevention of bile duct  
injury. *J Laparoscopic Adv Surg  
Tech*. 2007; 17: 662-5.

③Takamoto K, Midorikawa Y,  
Minagawa M, Makuuchi M.  
Inflammatory pseudotumor of the  
spleen: clinical impact in  
surgical treatment. *Bioscience  
Trends*. 2007; 1: 113-6.

④Torisu Y, Watanabe A, Nonaka A,  
Midorikawa Y, Makuuchi M,  
Shimamura T, Sugimura H, Niida A,  
Akiyama T, Iwanari H, Kodama T,  
Zeniya M, Aburatani H. A human  
homolog of Notum,  
over-expressed in  
hepatocellular carcinoma, is  
transcriptionally regulated by  
 $\beta$ -catenin/TCF. *Cancer Sci*.  
2008; 99: 1139-46.

⑤Midorikawa Y, Sugiyama Y,  
Aburatani H. Screening of  
liver-targeted drugs. *Expert  
Opin Drug Discov*. 2008; 3:

643-54.

⑥Xu H, Inagaki Y, Tang W, Guo Q,  
Wang F, Seyama Y, Midorikawa Y,  
Gai R, Kokudo N, Sugawara Y,  
Nakata M, Makuuchi M. Elevation  
of serum KL-6 mucin levels in  
patients with  
cholangiocarcinoma.  
*Hepatogastroenterology*. 2008;  
55:2000-4.

⑦Midorikawa Y, Yamamoto S,  
Tsuji S, Kamimura N, Ishikawa S,  
Igarashi H, Makuuchi M, Kokudo N,  
Sugimura H, Aburatani H. Allelic  
imbalances and homozygous  
deletion on 8p23.2 for stepwise  
progression of  
hepatocarcinogenesis.  
*Hepatology*. 2009; 49: 513-22.

⑧Suzuki M, Nagura K, Igarashi H,  
Tao H, Midorikawa Y, Kitayama Y,  
Sugimura H. Copy number  
estimation algorithms and  
fluorescence in situ  
hybridization to describe copy  
number alterations in human  
tumors. *Pathol Int*. 2009; 59:  
218-28.

⑨緑川 泰, 村田宣夫, 杉山保幸:  
非代償性肝硬変患者の栄養治療.  
日門亢会誌、14(2): 164-166,  
2008.

〔学会発表〕（計 3 件）

①Stepwise progression of allele imbalance in hepatocarcinogenesis with special reference to nodule-in-nodule appearance using decision tree analysis.  
Yutaka Midorikawa, Shogo Yamamoto, Shingo Tsuji, Naoko Kamimura, Shumpei Ishikawa, Masatoshi Makuuchi, Hisaki Igarashi, Haruhiko Sugimura, Hiroyuki Aburatani.  
99th, American Association for Cancer Research (San Diego)

②Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations in liver cancer.  
Genta Nagae, Atsushi kaneda, Shuichi Tsutsumi, Shumpei Ishikawa, Yutaka Midorikawa, Hiroyuki Aburatani.  
99th, American Association for Cancer Research (San Diego)

③Prediction of efficacy of FOLFOX therapy for colorectal cancer patients using random forests analysis.  
Yutaka Midorikawa, Yasuyuki Sugiyama, Shingo Tsuji, Koichi Yagi, Shogo Yamamoto, Kazuhiro Yoshida, Takao Takahashi, Hiroyuki Aburatani.  
100th, American Association for Cancer Research (Denver)

〔図書〕（計 1 件）

緑川 泰、杉山保幸：肝臓のアレイ解析. 遺伝子医学MOOK、258-64, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緑川 泰 (MIDORIKAWA YUTAKA)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：10292905

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし