

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390205

研究課題名（和文）：糖鎖表出を指標とした肝癌治療戦略

研究課題名（英文）：Development of treatment strategy for patients with hepatocellular carcinoma using serum glycosylation modification

研究代表者

青柳 豊 (AOYAGI YUTAKA)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00142266

研究成果の概要（和文）：

α 1-6 フコース転移酵素（FUT8）は、肝癌の生物学的悪性度の指標とされるフコシル化 AFP 産生に関与しているが、その分子機構は解明されていない。肝癌細胞の FUT8 遺伝子発現を抑制し、細胞増殖や細胞浸潤能および糖鎖構造の変化に対する基礎的検討を行なった。SiRNA の手法では、FUT8 遺伝子発現抑制を認めたが、細胞増殖や浸潤能の有意な変化は確認できず、糖鎖プロファイリング解析では、細胞内のフコシル化蛋白質の低下を確認できなかった。肝細胞特異的に完全な遺伝子発現抑制を行い、発癌発癌過程における FUT8 蛋白機能を解析する手法として、新たに FUT8 コンディショナルノックアウトマウスを作製した。現在、同マウスの肝組織での FUT8 のメッセージが低下している結果を得、蛋白機能を解析中で、引き続き同マウスの肝発癌実験を準備中である。

研究成果の概要（英文）：

Fucosylated fraction of alpha-fetoprotein, AFP-L3, is the product of α 1-6 fucosyltransferase (FUT8) in the presence of GDP-fucose and is an indicator of unfavorable prognosis in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). The aim of this study is to investigate physiological function of the core fucose in HCC cell lines using not only small interfering RNA (siRNA) but a FUT8 conditional gene knockdown tool. Real-time PCR analysis showed that the FUT8 mRNA level was knocked down 48h after siRNA transfection. On the other hand, we found no significant change in cell growth and infiltration. And no significant reduction in producing intracellular fucosylated proteins was observed by sugar chain profiling analysis using lection microchip. Next, we established conditional FUT8 knockdown mice, and characterized their molecular background of FUT8. We plan to carry out the experiments of hepatocarcinogenesis on the FUT8 knockdown mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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：肝細胞癌，糖鎖， α 1-6 フコース転位酵素(FUT8)，アルファフェトプロテイン

1. 研究開始当初の背景

フコシル化 AFP (AFP-L3) は、青柳らが明らかにした肝癌特異性の高い AFP 糖鎖変異分画で、二分岐複合型糖鎖の還元末端側に α 1-6 フコースを有するものである。現在、AFP-L3 は肝細胞癌 (HCC) の早期診断に用いられており、加えて、肝癌患者の予後を規定する重要な因子である事が確認されている。青柳らによる、この肝癌患者特異的に検出される AFP のフコシル化における酵素学的背景の解析の結果、非癌部組織に比較し肝癌組織においてフコシル化の責任酵素である α 1-6 フコース転移酵素 (FUT8) 活性ならびにその発現が上昇していることが確認されている。他方、青柳らは多分岐型糖鎖を形成する V 型グルコサミン転移酵素 (GnT-V) の肝癌組織における活性ならびに遺伝子発現と肝癌の浸潤能である門脈塞栓ならびに遠隔臓器転移が相関する事を確認している。これらの知見は、フコシル化糖鎖の出現や糖鎖構造の変化が、発癌および癌細胞の生物学的悪性度と密接に関わっていることを示している。

2. 研究の目的

本研究では、肝癌細胞を用いて RNAi の手法により FUT8 遺伝子発現を抑制し、細胞増殖や細胞浸潤能および糖鎖構造と遺伝子発現の変化に対する基礎的検討を行なうこと、肝特異的に FUT8 遺伝子発現が抑制される FUT8 コンディショナルノックアウトマウス (FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-}マウス) を作製し、肝発癌実験を行い、FUT8 蛋白と肝発癌進展の影響を in vivo でも解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SiRNA 導入

ヒト肝癌細胞株として HepG2、PLC/PRF/5、KYN2 の 3 細胞株を、他腫瘍細胞株としてヒト膵癌細胞株である ASPC1 を用いて下記検討を行った。Transient の RNA interference には Dharmacon 社製の FUT8 siRNA (ON-TARGET plus SMART pool for human FUT8) および、Control siRNA (ON-TARGET plus Non-targeting Pool) を使用した。100nM の SiRNA を Dharma FECT transfection reagent (Dharmacon, Inc.) を用いて細胞に transfection し、SiRNA 処理 24・48 時間後および処理後通常培養液中に播種し 24・48・72 時間培養後の培養上清と細胞を回収した。

(2) FUT8 遺伝子発現変化

細胞の Total RNA を RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) で回収し、AMV reverse transcriptase (Takara Bio Inc., Japan) を用いて cDNA を作製した。得られた cDNA を用いて real-time PCR (LightCycler

TaqMan real-time PCR system; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) で mRNA の発現レベルを確認した。FUT8 mRNA の発現レベルは、内部コントロールに glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、SiRNA 未処理の HepG2 細胞の FUT8/GAPDH 発現比を基準に算出した。プライマ・プローブセットは Applied Biosystems (Assays-on-Demand Gene Expression Products) 社製 FUT8 ; Hs00189535-m1)、GAPDH を使用した。SiRNA 処理 24・48 時間後および処理後通常培養液中に播種し 24・48・72 時間培養後の FUT8 mRNA 発現を評価した。KYN2 細胞の SiRNA 処理 48 時間後に細胞を回収し、細胞溶解液中の FUT8 蛋白の Western-blot を行った。

(3) 培養上清中 AFP-L3 濃度変化

KYN2 細胞に 48 時間 FUT8 および Control SiRNA 処理し培養上清を回収した。更に処理後の細胞を 1.5×10^5 cells/ml の細胞密度 (10%FCS/DMEM 培養液中) で再度 6 ウェルプレート Dish に播種し培養。24、48 時間後の培養上清をそれぞれ回収し、AFP 濃度とレクチン分画 (L3) を測定した。

(4) LeeChipTMVer1.0 を用いた糖鎖プロファイリング解析

KYN2 細胞に 48 時間 FUT8 および Control SiRNA 処理した後に、細胞質画分と細胞膜オルガネラ画分に分け、LeeChipTMVer1.0 を用いて糖鎖プロファイリング解析を行った。

(5) SiRNA 導入細胞における細胞増殖

各細胞に FUT8 および Control SiRNA を 48 時間処理した。処理後の細胞を 24 ウェルプレート Dish に 0.5×10^5 cells/ml の細胞密度 (10%FCS/DMEM 培養液中) で播種し 24、48、72 時間培養し細胞増殖能を比較検討した。

(6) FUT8 コンディショナルノックアウトマウスの (FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-}マウス) 作製

マウス FUT8 遺伝子の第 7 エクソンにフレームシフトをおこすように設計した loxP、ネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲティングベクターを組み込んだ FUT8^{loxP/loxP} トランスジェニックマウスを作製する。このマウスにアルブミン遺伝子のプロモーター下に遺伝子組み換え酵素 Cre を発現するトランスジェニックマウス (C57BL/6-TgN-AlbCre; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) を交配することにより、肝細胞特異的に FUT8 遺伝子を抑制させたコンディショナルノックアウトマウス (FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-}マウス) を作製する。

(倫理面への配慮)

本研究は、RNAi の手法による FUT8 遺伝子発現の抑制下における細胞機能・遺伝子発現変化を解析する基礎的研究が中心であるため

倫理面への配慮は必要ない。

4. 研究成果

(1) SiRNA 導入による FUT8 遺伝子発現変化

KYN2 細胞に FUT8 SiRNA を 24、48 時間導入し、FUT8 mRNA 発現量をリアルタイム PCR で確認した。また、FUT8 SiRNA を 48 時間導入後、通常培養条件下 (10%FCS/DMEM 培地) で 24 時間、48 時間継続培養し FUT8 mRNA 発現量を確認した。

FUT8 発現量は Control SiRNA 導入細胞における発現量を 100%として算出した。結果、KYN2 細胞では $10.0 \pm 0.3\%$ 、 $5.9 \pm 0.9\%$ 、 $17.1 \pm 6.8\%$ 、 $45.4 \pm 0.56\%$ にそれぞれ抑制された。同様に、各種細胞株に FUT8 SiRNA を 24、48 時間導入し、FUT8 mRNA 発現量を確認した。その結果、HepG2 細胞では $65.8 \pm 0.6\%$ 、 $45.7 \pm 2.5\%$ 、PLC/PRF/5 細胞では $35.9 \pm 5.0\%$ 、 $30.2 \pm 2.9\%$ 、ASPC1 細胞では $6.8 \pm 0.3\%$ 、 $5.3 \pm 0.1\%$ に FUT8 mRNA 発現が抑制された。

KYN2 細胞の SiRNA 処理 48 時間後に細胞を回収し、細胞溶解液中 FUT8 蛋白の Western-blot (FUT8 抗体は Abnova 社製、Proteintech Group 社製) での確認を試みたが、FUT8 SiRNA 導入細胞および、Control SiRNA 導入細胞のいずれにおいても、FUT8 蛋白の確認は出来なかった。

(2) 培養上清中 AFP-L3 濃度変化

培養上清中の AFP 濃度は Control SiRNA 導入細胞と FUT8 SiRNA 導入細胞で同様の濃度変化を示した。一方、AFP-L3 分画は Control SiRNA 導入細胞に比べ、FUT8 SiRNA 導入細胞では 48 時間の SiRNA 処理後 24 時間 ($p = 0.0072$)、48 時間後 ($p = 0.098$) に有意に低下した。

(3) LeeChip™ Ver1.0 を用いた糖鎖プロファイリング解析

KYN2 細胞に 48 時間 FUT8 および Control SiRNA 処理した後に、細胞質画分と細胞膜・オルガネラ画分とに分け、LeeChip™ Ver1.0 を用いて糖鎖プロファイリング解析を行った結果、フコース認識レクチンである LTL、PSA、LCA、AOL、TJA-II にて両画分ともに、Control SiRNA 導入細胞に比し、FUT SiRNA 導入細胞でコアフコースの発現率が僅かに増加していることが確認された。

(4) SiRNA 導入細胞における細胞増殖

各種細胞株に FUT8 SiRNA と Control SiRNA を 48 時間導入し、処理後の細胞を 0.5×10^5 cells/ml の細胞密度で播種し 72 時間まで通常培養 (10%FCS/DMEM 培地) を継続したが、FUT8 SiRNA 導入による細胞増殖能に有意な変化は認めなかった。

(5) FUT8 コンディショナルノックアウトマウスの (FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-}マウス) 作製

マウス FUT8 遺伝子の第 7 エクソンにフレ

ームシフトをおこすように設計した loxP、ネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲティングベクターを組み込んだ FUT8^{loxP/loxP} トランスジェニックマウスを作製した。この FUT8^{loxP/loxP} マウスは FUT8^{loxP/wt} マウスと FUT8^{wt/wt} マウスと同等に FUT8 活性を有していることを高速液体クロマトグラフィーで確認した。

このマウスにアルブミン遺伝子のプロモーター下に遺伝子組み換え酵素 Cre を発現するトランスジェニックマウス (C57BL/6-TgN-AlbCre; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) を交配することにより、肝細胞特異的に FUT8 遺伝子を抑制させたコンディショナルノックアウトマウス (FUT8^{loxP/loxP} - AlbCre^{+/-}マウス) を作製した。現在、同マウスの肝臓における FUT8 蛋白機能を確認中である。

今回用いた RNAi の手法で、3 種のヒト肝癌細胞株 (HepG2、PLC/PRF/5、KYN2) とヒト膵癌細胞株である ASPC1 細胞において明瞭な FUT8 遺伝子発現抑制を認めた。KYN2 肝癌細胞は、通常培養条件下での培養上清中 AFP-L3 分画が 81-85%と高く十分な FUT8 活性を有していると考え、さらに、mRNA レベルでの高い発現抑制効果が確認できたため、糖鎖プロファイリング解析・細胞増殖解析に用いた。結果、FUT8 SiRNA 導入細胞の分泌蛋白 (AFP) ではフコシル化蛋白の低下は確認できたが、細胞内フコシル化蛋白は、細胞質画分、オルガネラ画分共に、むしろ Control SiRNA 導入細胞よりも増加傾向を示すことが確認された。また、FUT8 遺伝子発現抑制による導入細胞の細胞増殖については、有意な変化を確認できなかった。細胞外分泌蛋白 (AFP) のフコシル化の検討は導入後 48 時間からさらに 24 時間経過した後に解析を行ったのに対し、細胞内フコシル化の検討は導入 48 時間で解析していたため、FUT8 蛋白のフコシル化機能評価では時間的相違が結果に影響を及ぼしていた可能性が考えられる。

今回の検討では、SiRNA による明瞭な FUT8 遺伝子発現抑制を認めたが、それに伴う Western-blot 法による蛋白レベルの発現低下、HPLC での FUT8 酵素活性低下が再現性のある結果として確認できていない。肝癌細胞株における通常培養条件下での FUT8 蛋白発現は僅かなものであることが推測され、完全な FUT8 mRNA 発現抑制が、FUT8 蛋白機能の評価に必須条件であることが推定される。

肝癌細胞株に対する SiRNA の実験結果から、我々は、肝細胞特異的に完全な遺伝子発現抑制を行い、発癌発癌過程における FUT8 蛋白機能を解析する手法として、FUT8 コンディショナルノックアウトマウスを作製することとした。FUT8 ノックアウトマウスの作製・解析は既に、Wang X (Proc. Nat. Aca. Sci. USA,

2005, 102, 15791-6)らにより報告されている。このマウスは生後3日に80%致死で、生存マウスは著しい成長障害をきたすので、肝臓におけるFUT8蛋白質機能と肝発癌についての解析が困難である。我々は、今後、FUT8コンディショナルノックアウトマウスを用いたin vivoでの発癌実験に加え、肝癌組織と非癌部肝組織における網羅的遺伝子解析とレクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリングを行い、肝発癌における腫瘍進展・浸潤に関わる分子機構の解析を行う予定である。

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42件)

1. Kamimura H, Yamagiwa S, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Ohkoshi S, Inoue M, Wakai T, Shirai Y, Nomoto M, Aovagi Y. Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. *J. Hepatol.* 2012 Feb; 56(2):381-8. 査読有
2. Tsuchiya A, Kamimura H, Tamura Y, Takamura M, Yamagiwa S, Suda T, Nomoto M, Aovagi Y. Hepatocellular carcinoma with progenitor cell features distinguishable by the hepatic stem/progenitor cell marker NCAM. *Cancer Lett.* 2011 Oct 1;309(1):95-103. 査読有
3. Aovagi Y, Tamura Y, Suda T, EDITORIAL, History and recent progress in evaluation of the fucosylated alpha-fetoprotein fraction, *J Gastroenterol Hepatol*, 2011 Apr; 26(4):615-6. 査読有
4. Abe S, Nagasaka K, Hirayama Y, Kozuka-Hata H, Oyama M, Aovagi Y, Obuse C, Hirota T. The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* 2011 Apr 15;25(8):863-74. 査読有
5. Kawai H, Nomoto M, Suda T, Kamimura K, Tsuchiya A, Tamura Y, Yano M, Takamura M, Igarashi M, Wakai T, Yamagiwa S, Matsuda Y, Ohkoshi S, Kurosaki I, Shirai Y, Okada M, Aovagi Y Multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis *World J hepatol* 2011 January 27; 3(1): 15-23 査読有
6. Tamura Y, Igarashi M, Kawai H, Suda T, Satomura S, Aovagi Y. Clinical Advantage of Highly Sensitive On-Chip Immunoassay for Fucosylated Fraction of Alpha-Fetoprotein in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2010 Dec;55(12):3576-83. 査読有
7. Tamura Y, Igarashi M, Suda T, Wakai T, Shirai Y, Umemura T, Tanaka T, Kakizaki S, Takagi H, Hiasa Y, Onji M, Aovagi Y. Fucosylated fraction of alpha-fetoprotein as a predictor of prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after curative treatment. *Dig Dis Sci.* 2010 Jul;55(7): 2095-101. 査読有
8. Osaki A, Kubota T, Suda T, Igarashi M, Nagasaki K, Tsuchiya A, Yano M, Tamura Y, Takamura M, Kawai H, Yamagiwa S, Kikuchi T, Nomoto M, Aovagi Y. Shear wave velocity is a useful marker for managing nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2010 Jun 21;16(23):2918-25. 査読有
9. Yamamoto T, Morita S, Go R, Obata M, Katsuragi Y, Fujita Y, Maeda Y, Yokoyama M, Aovagi Y, Ichikawa H, Mishima Y, Kominami R. Clonally expanding thymocytes having lineage capability in gamma-ray-induced mouse atrophic thymus.

- Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010 May 1;77(1):235-43. 査読有
10. Yamamoto T, Morita S, Go R, Obata M, Katsuragi Y, Fujita Y, Maeda Y, Yokoyama M, Aoyagi Y, Ichikawa H, Mishima Y, Kominami R. Clonally expanding thymocytes having lineage capability in gamma-ray-induced mouse atrophic thymus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010 May 1;77(1):235-43. 査読有
 11. Aoyagi T, Takahashi M, Higuchi M, Oie M, Tanaka Y, Kiyono T, Aoyagi Y, Fujii M. The PDZ domain binding motif (PBM) of human T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation. *Virus Genes.* 2010 Apr;40(2):193-9. 査読有
 12. Takamura M, Yamagiwa S, Wakai T, Tamura Y, Kamimura H, Kato T, Tsuchiya A, Matsuda Y, Shirai Y, Ichida T, Ajioka Y, Aoyagi Y. Loss of liver-intestine cadherin in human intrahepatic cholangiocarcinoma promotes angiogenesis by up-regulating metal-responsive transcription factor-1 and placental growth factor. *Int J Oncol.* 2010 Jan;36(1):245-54. 査読有
 13. Tamura Y, Yamagiwa S, Aoki Y, Kurita S, Suda T, Ohkoshi S, Nomoto M, Aoyagi Y. Serum alpha-fetoprotein levels during and after interferon therapy and the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci.* 2009 Nov; 54(11):2530-7. 査読有
 14. Yano M, Ikeda M, Abe KI, Kawai Y, Kuroki M, Mori K, Dansako H, Ariumi Y, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology.* 2009 Sep;50(3):678-88. 査読有
 15. Suda T, Kamimura K, Kubota T, Tamura Y, Igarashi M, Kawai H, Aoyagi Y, Liu D. Progress toward liver-based gene therapy. *Hepatol Res.* 2009 Apr;39(4):325-40. 査読有
 16. Kurita S, Ohkoshi S, Yano M, Yamazaki K, Suzuki K, Aoki YH, Matsuda Y, Wakai T, Shirai Y, Ichida T, Aoyagi Y. Progression of hypermethylation of the p16(INK4A) gene from normal liver to nontumorous liver and hepatocellular carcinoma: an evaluation using quantitative PCR analysis. *Dig Dis Sci.* 2009 Jan;54(1):80-8. 査読有
 17. Watanabe T, Soga K, Hirono H, Hasegawa K, Shibasaki K, Kawai H, Aoyagi Y. Features of hepatocellular carcinoma in cases with autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2009 Jan 14;15(2):231-9. 査読有
 18. Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, Honda Y, Takamura M, Sugahara S, Ishikawa T, Ohkoshi S, Sato Y, Aoyagi Y. Sustained response to interferon-alpha plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is closely associated with increased dynamism of intrahepatic natural killer and natural killer T cells. *Hepatol Res.* 2008 Jul;38(7):664-72. 査読有
 19. Tsuchiya A, Heike T, Baba S, Fujino H, Umeda K, Matsuda Y, Nomoto M, Ichida T, Aoyagi Y, Nakahata T. Sca-1+ endothelial cells (SPECs) reside in the portal area of the liver and contribute to rapid recovery from acute liver disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 ,(365)595-601 査読有

20. Isogawa M, Higuchi M, Takahashi M, Oie M, Mori N, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M. Rearranged NF-kappa B2 gene in an adult T-cell leukemia cell line. *Cancer Sci*. 2008 Apr;99(4):792-8. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Suda T, Yokoo K, Kamimura K, Oda M, Zhang G, Liu D, Aoyagi Y. Development of Electromotor-Driven Injector for Hydrodynamic Gene Delivery. 14th American Society of Gene & Cell Therapy Annual Meeting 2011.2011/5/19.WashingtonStateConvention & Trade Center.
2. Yokoo K, Kamimura K, Suda T, Oda M, Zhang G, Liu D, Aoyagi Y. Development of Electromotor-Driven Injector for Hydrodynamic Gene Delivery. 14th American Society of Gene & Cell Therapy Annual Meeting 2011.2011/5/19.WashingtonStateConvention & Trade Center.
3. Yano M, Ohkoshi S, Aoki Y, Matsuda Y, Aoyagi Y. Interferon-B Prevents HBX-Triggered Hepatocarcinogenesis By Down-Regulating Cytoplasmic P21 Overexpression. 46th Annual Meeting Of The European Association For The Study Of The Liver(EASL 2011) 2011/3/29. 国際会議場 122 ベルリン
4. Kamimura K, Suda T, Fukuhara Y, Osaki A, Aoyagi Y. APM2 is a Candidate of Predictive Marker for Cisplatin Sensitivity in Hepatocellular Carcinoma. 3rd JCA-AACR Special Joint Conference 2011.2011/3/2. 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート
5. Yano M, Matsuda K, Ohkoshi S, Aoyagi Y. Oxidative Stress Induces Anti-HCV Status via the Activation of MEK-ERK1/2 Signaling Pathway. 2009 AASLD. 2009/10/30 Hynes Convention Center

〔図書〕(計 13 件)

1. 青柳 豊, 田村康, 五十嵐正人, 川合弘一, 須田剛士 【外来診療に有用な腫瘍マーカーの知識】 腫瘍マーカーの種類と特徴 AFP 臨牀と研究 88 巻 8 号 Page941-944 (2011.08) 大道学館

2. 青柳 豊, 田村康, 五十嵐正人, 川合弘一, 須田剛士 【腫瘍マーカー--その今日的解釈(理解)と応用】 肝臓癌の腫瘍マーカー 成人病と生活習慣病 41 巻 6 号 Page648-653 (2011.06) 東京医学社
3. 青柳 豊, 田村康, 五十嵐正人, 川合弘一, 須田剛士 【肝疾患における血液生化学検査、肝炎ウイルスマーカー、腫瘍マーカーの見方】 腫瘍マーカー AFP 濃度、AFP L3 分画、PIVKA-II 肝・胆・膵 2010;60:669-679. アークメディア
4. 田村 康, 五十嵐正人, 川合弘一, 須田剛士, 青柳 豊 【早期肝細胞癌の診断ストラテジー】 肝細胞癌診断、予後予測における高感度 AFP-L3 測定法の臨床的有用性 消化器内科 2010;51:504-510. 科学評論社
5. 田村康, 五十嵐正人, 川合弘一, 須田剛士, 青柳 豊 肝癌バイオマーカー研究の現在 血液(血漿・血清)からの探索 The Liver Cancer Journal 2009;1:97-103. メディカルレビュー社
6. 青柳 豊, 須田剛士 【肝細胞癌の治療 2009~2011】 肝細胞癌の血液診断 コンセンサス癌治療 2009;8:131-133. へるす出版
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
青柳 豊 (AOYAGI YUTAKA)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：00142266
 - (2) 研究分担者
内海 利男 (UCHIUMI TOSHIO)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号：50143764
大越 章吾 (OHKOSHI SHOGO)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号：70231199
須田 剛士 (SUDA TAKESHI)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号：10361916