

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4月25日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390379

研究課題名（和文）メチル化遺伝子を用いた早期肝癌診断システムの開発

研究課題名（英文）Development of diagnostic system of early hepatocellular carcinoma by methylation of multiple genes

研究代表者

岡 正朗 (OKA MASAOKI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70144946

研究成果の概要（和文）：2 cm 以下の肝細胞癌（HCC）の診断は困難である。そこで、血清 cf-DNA における DNA メチル化異常をマーカーとした診断システムを開発した。手術標本により DNA メチル化異常を検索し、7 遺伝子の DNA メチル化異常が HCC 特異的に起こっていた。SPINT2 と SRD5A2 遺伝子の DNA メチル化異常と AFP と PIVKA-II を組み合わせた我々独自の hybrid detector は、血清による HCC 診断において優れた性能（曲線下面積 0.868）を示した。

研究成果の概要（英文）：There are few blood tests for an efficient detection of hepatocellular carcinoma (HCC) associated with hepatitis C virus (HCV) infection. The abilities of quantitative analyses of 7 genes hypermethylation in serum DNA, α -fetoprotein (AFP) and prothrombin-induced vitamin K absence II (PIVKA-II), and various combinations to detect HCC were evaluated. An optimal hybrid detector, built using data for 2 methylated genes (SPINT2 and SRD5A2), AFP, and PIVKA-II, achieved the most satisfactory ability to detect HCC in the training cohort (n=164) and an independent validation cohort (n=258). In the validation cohort, accuracy, sensitivity, and specificity of the hybrid detector for detection of HCC were 81.4%, 73.2%, and 87.7%, respectively. Notably, even when detecting HCC \leq 2 cm in diameter, the hybrid detector maintained markedly high abilities (84.6% accuracy, 72.2% sensitivity, 87.7% specificity). These results show that the optimal hybrid blood detector can detect HCV-related HCC more accurately.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：医歯薬学

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：肝癌、メチル化遺伝子、セルフリーDNA

1. 研究開始当初の背景

肝癌(HCC)は最新の統計では世界で1年間に62万例(Parkin DM CA Cancer J Clin 2005)、日本では毎年2万例の新規発症例(第16回全国原発性肝癌追跡調査報告)が報告され、世界各地で発生増加が問題となっている

(1)2cm以下の小肝癌の治療成功率は極めて高いにもかかわらず、現在使用されている腫瘍マーカー(AFP, AFP-L3, PIVKA-II)では検出感度が低く、小肝癌の診断は困難で治療が手遅れとなるため、多くの小肝癌を確実に検出・診断できるシステムの開発が切望される。

(2)C型肝炎ウイルス(HCV)感染に起因する発症が、全体の約8割を占めるという我が国特有のHCCの疫学的背景を考慮すると、HCV関連小肝癌に対し、精度の高い検出・診断システムの開発が急務である。

(3)小肝癌および早期肝癌の確定診断には、針生検で得られた組織診断で行われているが、病理医の経験に負うところが大きいため、精度、客観性が問題となっている。本申請研究により施設を問わず高精度な検出・診断システムが可能となる。

(4)我々は、今までにゲノム情報を駆使したマイクロアレイ解析により、HCV関連HCCの進展および転移能と関連する多くの遺伝子を同定・解明し、世界でもトップレベルのHCC遺伝子データベース(92症例×12600遺伝子: Cancer Res, 2002; Oncogene, 2003; Cancer Sci 2008)を構築してきた。さらに独自のアルゴリズムを駆使して、僅か12遺伝子による高精度な再発予測システムを確立してきた経緯をもつ(LANCET, 2003)。

2. 研究の目的

今まで蓄積してきた遺伝子データおよびバイオインフォマティクスツールを用いて、複数のメチル化遺伝子によるHCV関連小肝癌の高精度検出および診断システム開発を行う。

3. 研究の方法

(1)小肝癌検出システムの開発

①サンプリング条件の設定(セルフフリーDNAの定量法の確立)。

ソースとして用いるセルフフリーDNA量に影響を及ぼす因子の解明はすでに完了しており、末梢血からの血清回収および血清からの安定したセルフフリーDNAの抽出に引き続くDNA定量法を確立する。DNA定量法はリアルタイムPCR法と蛍光標識を測定する装置EnVisionを用いたDNA定量法を比較し、安定したデータを示す方法を選択する。

②23遺伝子の定量的メチル化解析法の確立。

メチル化遺伝子に対する従来の解析法(定性的PCR法)ではメチル化判定が困難な場合が指摘されている(Zeschnigk M, Nucleic Acids Res 32: 2004)。

この対応策として:

a. 20例のHCV関連小肝癌の癌組織と非癌部肝組織におけるBIS処理後の候補遺伝子プロモーター領域のピロシーケンシングを行い、最適なメチル化解析ポジション(癌と非癌部肝で最も差異のある領域)の同定を行う。

b. 上記の結果に基づきプライマーおよびタックマンプローブを設定し、ライトサイクラー(現有設備)を用いてメチル化候補遺伝子の定量を行う。

c. 癌組織から抽出したDNAと血清中のセルフフリーDNAとのペアサンプルを用いて、両サンプルにおける候補遺伝子のメチル化状態の関連性を検証し、候補を7遺伝子程度に絞り込む。

(2)小肝癌診断システムの開発

①2cm以下かつ高分化癌とHCV感染肝における53遺伝子の定量的発現解析
リアルタイムRT-PCR法を用いて2cm以下かつ高分化型肝癌30サンプル、2cm以上かつ中・低分化型肝癌30サンプルとHCV感染肝40サンプルの計100サンプルで53遺伝子の発現解析を行い、我々独自のアルゴリズム(Fisher criterion; Cancer Res 2002, Lancet 2003)を用いて、ランキングを行い高分化型肝癌と非癌部肝臓との識別に有用な遺伝子5個程度までに絞り込みを行う。

【肝癌の新規診断システムの開発】

(1)小肝癌検出システムの開発

①小肝癌検出用遺伝子の性能評価

2cm以下の小肝癌を発症している患者からの血清20サンプル、HCV感染患者で肝癌未発症の20サンプルを用いて、メチル化候補遺伝子の肝癌診断能力をFisher ratioを用いてランキングする。さらに、これらのメチル化マーカーと従来から使用されてきた腫瘍マーカーの性能と比較する。

②肝癌検出システムの性能評価

上記のマーカー候補のすべての組み合わせパターンをFisher linear classifier (FLC: 総括研究代表者のグループがプログラムしたオリジナルソフト)に投入して、最もロバストな小肝癌検出性能を有す、マーカーコンビネーションを決定する。この最適システムの評価を、多施設で登録された300例の

HCV 感染者からの血清を用いて行う。

(2) 小肝癌診断システムの開発

①小肝癌と dysplastic nodule を含む前癌病変や良性肝腫瘍との鑑別、絞り込まれた 5 遺伝子を用いて小肝癌 (n=30)、前癌病変や良性肝腫瘍 (n=30)、HCV 陽性肝硬変 (n=30) との鑑別において、すべてのマーカーの組み合わせパターン (5C1~5C5) を、上述のごとく Fisher linear classifier (FLC) に投入して、最もロバストな小肝癌診断性能を有す、遺伝子コンビネーションを決定する。

②この最適システムの評価を、多施設で登録された、完全なブラインド状態である 100 例の HCV 感染肝臓由来のサンプルを用いて行う。

4. 研究成果

(1) Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well-differentiated hepatocellular (主な発表論文⑧関連)

肝細胞癌と関連する DNA メチル化を同定するために、25 の HCCs 症例を用いて in silico CpG mapping 及びバイサルファイトシーケンシングを行った。その結果、in silico CpG mapping から 12 の DNA メチル化関連遺伝子をリストし、その内の 7 遺伝子 (RASSF1A, CCND2, SPINT2, RUNX3, GSTP1, APC and CFTR) は、ゲノム DNA のバイサルファイト処理後のパイロシーケンシングから、ステージ I-II で異常にメチル化されていた事が判明した。この 7 遺伝子の異常メチル化を 20HCCs 症例からなる検証グループにおいて、メチル化特異的 PCR により確認した (図 1)。中でも RASSF1A は HCC と non-HCC 肝組織を最も性能良く識別した。さらに、RASSF1A, CCND2, SPINT2 の組合せは、HCC と non-HCC 肝組織の識別において感度 89-95%、特異度 91-100%、正確性 89-97% を示し、加えて全ての早期 HCC を検出した。

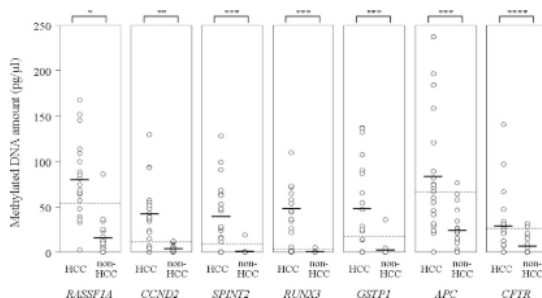


図 1. Discrimination between HCC and non-tumor liver tissues by quantitative real-time MSP assays for 7 genes.

(2) The assessment of methylated BASP1 and SRD5A2 levels in the detection of early HCC (主な発表論文④関連)

BASP1 と SRD5A2 における DNA メチル化を指標としての早期肝癌検出能の改善を試みた。

46 例の HCCs において、BASP1 と SRD5A2 に対してそれぞれ 2 箇所についてメチル化特異的 PCR を行った。その結果、何れの条件においても 50%以上の HCC において BASP1 と SRD5A2 での DNA メチル化異常を確認し、また DNA メチル化レベルと mRNA 発現との間の逆相関を観察した。同じ CpG island 内であっても MSP 部位によって診断能が異なっており、最も優れた BASP1 と SRD5A2 の組合せによる診断能は、ROC 曲線下面積 0.878、感度 84.8%、特異度 91.3%を示した (図 2)。また、この BASP1 と SRD5A2 の組合せは、AFP negative な早期の HCCs も検出した。さらに、細胞株を用いての in vitro 解析から両遺伝子の DNA メチル化とヒストンアセチル化によるエピジェネティックな発現制御を示した。

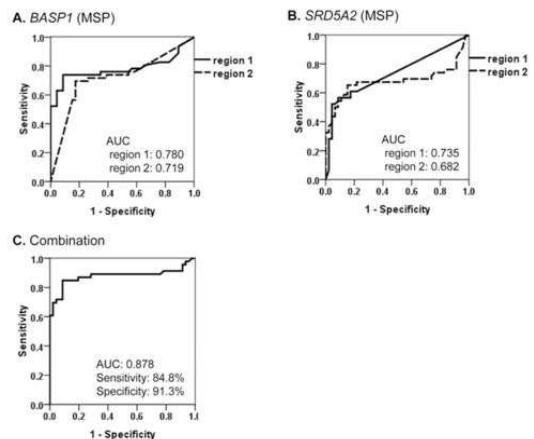


図 2. ROC analysis for discriminating HCC from non-tumor liver tissue.

(3) Efficient detection of HCC by a hybrid blood test of epigenetic and classical protein markers (主な発表論文①関連)

前述の DNA メチル化による早期肝癌検出を基に、血清からの早期肝癌診断システムの開発を行った。Training phase として 164 例の血清サンプルを用いて、血清バイオマーカーである AFP 及び PIVKA-II に加えて 7 遺伝子 (BASP1, CCND2, APC, SPINT2, SRD5A2, CFTR, RASSF1A) の血清 cell-free DNA (cf-DNA) における DNA メチル化レベルを解析した。上記 9 因子の内、SPINT2 と SRD5A2 は、HCC に対する高い特異度と低い感度を示した。RASSF1A は高い感度と低い特異度を示した。単一のマーカーでは Youden index > 0.6 を示さなかったことから、hybrid detector を構築した。In silico にて全ての組合せを計算し、最適な hybrid detector として 4 因子 (SPINT2, SRD5A2, AFP, PIVKA-II) の組合せを決定した (正確性 82.4%、感度 82.1%、特異度 82.3%)。この hybrid detector は Youden index = 0.65 を示し、いずれの単一マーカーよりも優れた性能を示した。

Validation phase として、258 人の血清を用いて解析を行った。training セットと比べて validation セットでは、PIVKA-II 単独は感度が 60.2% から 51.8% へ、AFP 単独は特異度が 85.7% から 71.9% へと低下したのに対して、hybrid detector は正確性 81.4%、感度 73.2%、特異度 87.7% の性能を維持した (図 3)。また、陽性的中率は 82.2%、陰性的中率は 80.8% であった。2 cm 以下の小肝癌に限ってもその性能は、正確性 84.6%、感度 72.2%、特異度 87.7% を維持した。Hybrid detector は training セットでも validation セットでも Youden index > 0.6 を維持した。

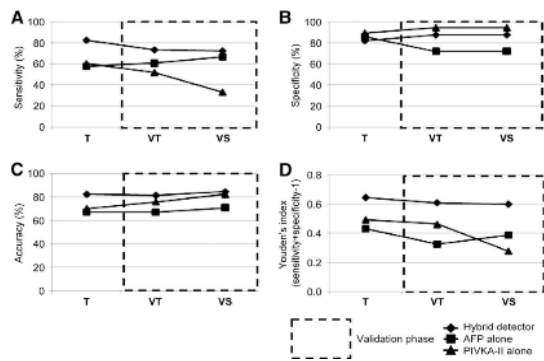


図 3. Performances of the Optimal Hybrid detector (diamond), AFP (square), and PIVKA-II (triangle) in the validation cohort.

ROC 曲線解析から AFP 単独は ROC 曲線下面積 0.739、PIVKA-II 単独は ROC 曲線下面積 0.794、hybrid は ROC 曲線下面積 0.868 を validation cohort で示した (図 4)。SPINT2 と SRD5A2 は non-HCC 患者を最も正確に判別し、AFP は 2 cm 以下の肝癌を、PIVKA-II は 2 cm 以上の肝癌を検出するのに優れていた。血清における Hybrid detector は HCC 組織からの 3 遺伝子 (RASSF1, CCND2, SPINT2) による検出よりも優れていた。

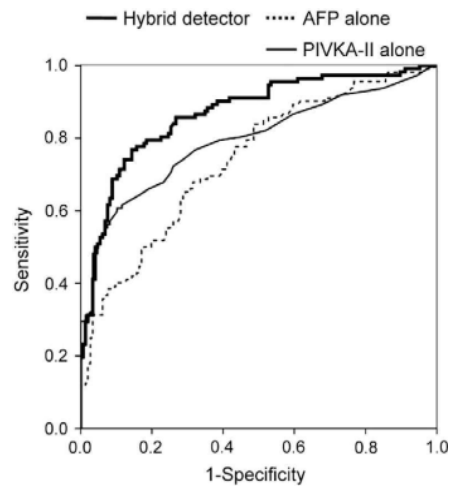


図 4. Receiver operating characteristic curve analysis of the optimal hybrid detector, AFP, and PIVKA-II for the validation cohort.

(4) Methylated cyclin D2 gene circulating in the blood as a prognosis predictor of HCC (主な発表論文⑤関連)

HCC は再発頻度が高いことから、術前の血清中の CCND2 遺伝子のメチル化レベルから予測できないか検討した。1 年以内に再発した HCC 患者における CCND2 mRNA レベルは低かった。また、この低レベルは DNA メチル化に依ることを明らかとした。70 例を用いて解析したところ、CCND2 における cf-DNA メチル化レベルは無再発生存期間と有意な関連が見られた (図 5)。

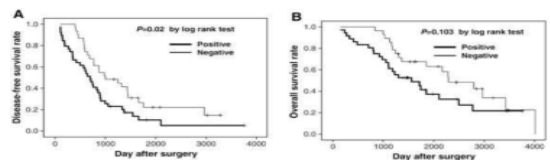


図 5. Disease-free (A) and overall (B) survivals in HCC patients according to serum levels of methylated CCND2 gene.

(5) Increased serum cell-free DNA levels in relation to inflammation are predictive of distant metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (主な発表論文⑥関連)

血清中の cell-free DNA レベルは肝癌の転移・再発との関連が認められたことから、食道扁平上皮癌 (ESCC) の遠隔転移マーカーとしての検討を行った。146 例 (ESCC 患者 101 例、対照群 46 例) からの血清を用いて解析を行った。その結果、対照群と比較して ESCC 患者血清の cf-DNA レベルは有意に高値を示した。また、cf-DNA レベルと正に相関していた因子として、腫瘍経、cytokeratin 19 発現、

及び炎症状態(C-reactive protein levels, neutrophil and monocyte number)が示された。さらに、遠隔転移を伴う ESCC 患者での有意に高い cfDNA level を確認した(図 6)。ロジスティック回帰解析から、5 因子(性別、年齢、cf-DNA levels, cytokeratin 19 発現, squamous cell carcinoma antigen)の中で、cf-DNA レベルは遠隔転移に対する唯一の独立した危険因子であった。以上から、血清中の cf-DNA レベルは ESCC の遠隔転移診断にも有用であることが示された。

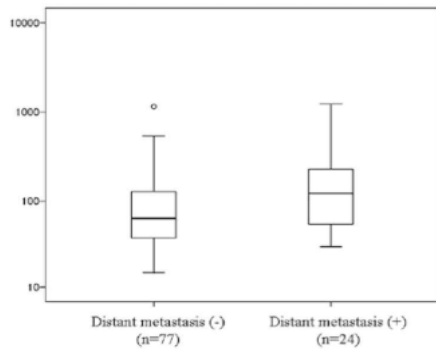


図 6. Box and whisker plot of cell-free DNA (cfDNA) levels in sera from patients with distant metastasis and those without.

以上に示したように、我々は血清における cf-DNA メチル情報を用いて早期の肝癌検出システムの開発に成功した。さらに本システムは、早期の癌検出だけでなく、転移・再発予測の面でも肝細胞癌に限らず有用であることが示され、国内外において強いインパクトを与えた。

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 8 件)

① Iizuka N, Oka M, Sakaida I, Moribe T, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Yamashita S, Okita K, Sakata K, Karino Y, Toyota J, Ando E, Ide T, Sata M, Tsunedomi R, Tsutsui M, Iida M, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Tamesa T, Fujita Y, Hamamoto Y. Efficient detection of hepatocellular carcinoma by a hybrid blood test of epigenetic and classical protein markers. Clin Chim Acta. (査読あり) Vol. 412 2011, 152-158

② Kuramitsu Y, Takashima M, Yokoyama Y, Iizuka N, Tamesa T, Akada JK, Wang Y, Toda T, Sakaida I, Okita K, Oka M,

Nakamura K. Up-regulation of 42 kDa Tubulin Alpha-6 Chain Fragment in Well-differentiated Hepatocellular Carcinoma Tissues from Patients Infected with Hepatitis C Virus. Anticancer Res. 2011 Anticancer Res. (査読あり) Vol 31(10), 2011, 3331-3336.

③ Wang Y, Kuramitsu Y, Ueno T, Suzuki N, Yoshino S, Iizuka N, Zhang X, Oka M, Nakamura K. Identification of four isoforms of aldolase B down-regulated in hepatocellular carcinoma tissues by means of two-dimensional Western blotting. In Vivo (査読あり) Vol 25(6), 2011, 881-886.

④ Tsunedomia R, Ogawa Y, Iizuka N, Sakamoto K, Tamesa T, Moribe T, Oka M. The assessment of methylated BASP1 and SRD5A2 levels in the detection of early hepatocellular carcinoma. Int J Oncol. (査読あり) Vol.36, 2010, 205-212

⑤ Tsutsui M, Iizuka N, Moribe T, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Fujita Y, Hamamoto Y, Tsunedomi R, Iida M, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Tamesa T, Sakaida I, Oka M. Preoperative assessment of methylated cyclin D2 gene circulating in the blood for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. Clin Chim Acta. (査読あり) Vol. 411, 2010, 516-520

⑥ Tomochika S, Iizuka N, Watanabe Y, Tsutsui M, Takeda S, Yoshino S, Ichihara K, Oka M. Increased serum cell-free DNA levels in relation to inflammation are predictive of distant metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. Experimental and Therapeutic Medicine (査読あり) Vol.1 2010, 89-92

⑦ Kimura N, Moribe T, Iizuka N, Miura T, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Hamamoto Y, Oka M. Rapid and quantitative detection of CpG-methylation status using TaqMan PCR combined with methyl-binding-domain polypeptide. Clin Biochem. (査読あり) Vol.42, 2009, 1113-1122

⑧ Moribe T, Iizuka N, Miura M, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Hamamoto Y, Sakamoto S, Tamesa T, Oka M. Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well-differentiated hepatocellular carcinoma. Int J Cancer (査読あり) Vol. 125 2009, 388-397

[学会発表] (計 14 件)

① 恒富亮一、岡 正朗、飯塚徳男、浜本義彦、

他. ABCB6 遺伝子上流配列の DNA メチル化レベルは肝細胞癌の二年以内肝内再発と関連する. 第 70 回日本癌学会学術総会、2011/10/5、名古屋・国際会議場

②飯塚徳男、岡 正朗、浜本義彦、他. 血清 CIMP と肝細胞癌の予後. 第 70 回日本癌学会学術総会、2011/10/4、名古屋・国際会議場

③恒富亮一、岡 正朗、飯塚徳男、浜本義彦、他. ABCB6 遺伝子を遺伝子マーカーとした HCV 関連肝細胞癌の予後予測. 第 66 回日本消化器外科学会総会、2011/7/15、名古屋・国際会議場

④飯田通久、岡 正朗、飯塚徳男、他. 肝細胞癌における転写関連因子 RDBP の発現とその意義. 第 66 回日本消化器外科学会総会、2011/7/15、名古屋・国際会議場

⑤筒井理仁、岡 正朗、飯塚徳男、他. 術前血中メチル化 (SPINT2) 遺伝子による肝切除後の早期肝内再発・全生存期間予測. 第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011/5/25、誌上発表 (東日本大震災のため)

⑥飯田通久、岡 正朗、飯塚徳男、他. 肝細胞癌における RDBP の発現とその機能. 第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011/5/25、誌上発表 (東日本大震災のため)

⑦恒富亮一、岡 正朗、飯塚徳男、浜本義彦、他. ABCB6 遺伝子の mRNA 発現レベルは肝細胞癌の一年以内肝内再発と関連する. 第 69 回日本癌学会学術総会、2010/9/22、大阪・国際会議場

⑧飯田通久、岡 正朗、飯塚徳男、浜本義彦、他. HCV 陽性肝細胞癌における転写関連因子 RDBP の発現の検討. 第 69 回日本癌学会学術総会、2010/9/22、大阪・国際会議場

⑨飯田通久、岡 正朗、飯塚徳男、浜本義彦、他. HCV 陽性肝細胞癌における転写関連因子 RDBP の発現の検討. 第 110 回日本外科学会定期学術集会、2010/4/8、名古屋・国際会議場

⑩筒井理仁、岡 正朗、飯塚徳男、他. 術前血中メチル化 cyclin D2 (CCND2) 遺伝子による肝切除後の早期肝内再発予測. 第 110 回日本外科学会定期学術集会、2010/4/8、名古屋・国際会議場

⑪恒富亮一、岡 正朗、飯塚徳男、浜本義彦、他. BASP1 と SRD5A2 遺伝子の DNA メチル化異常に基づく早期肝細胞癌診断. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009/10/3、横浜・パシフィコ横浜

⑫飯塚徳男、岡 正朗、浜本義彦、他. HCV 陽性肝細胞癌における転写調節因子 RDBP の発現意義. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009/10/2、横浜・パシフィコ横浜

⑬飯田通久、岡 正朗、飯塚徳男、他. HCV 陽性肝細胞癌における転写調節因子 RDBP の発現意義. 第 64 回日本消化器外科学会総会、2009/7/16、大阪・国際会議場

⑭飯田通久、岡 正朗、飯塚徳男、他. HCV 陽性肝細胞癌における血清 cell-freeDNA 上昇の意義: 進展と炎症に関する検討. 第 109 回日本外科学会定期学術集会. 2009/4/3、福岡・国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 正朗 (OKA MASA AKI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70144946

(2) 研究分担者

飯塚 徳男 (IIZUKA NORIO)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 80332807

浜本 義彦 (HAMAMOTO YOSHIHIKO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90198820