

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5月28日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591749

研究課題名（和文） 末梢血中のメチル化 CCND2 遺伝子測定による肝癌の低侵襲性予後診断

研究課題名（英文） Prediction of prognosis of hepatocellular carcinoma with use of measurement of methylated CCND2 gene in the blood

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

患者の末梢血を浮遊している CCND2 遺伝子のメチル化状態の定量解析と肝癌患者の再発との関連性を明確にし、CCND2 単独あるいは CCND2 を含む複数遺伝子を組み合わせた予後予測システムを開発することを目的とする。

(1) サンプル条件の設定(血清回収方法、セルフリーDNA の回収および抽出、定量法)

(2) CCND2 遺伝子に対する定量的メチル化解析方法の確立

(3) 血液中のメチル化 CCND2 遺伝子量が肝癌患者の予後と関連するか否かの検証

上記(1)～(3)のタスクは研究期間中に達成できた。また癌組織から抽出した DNA と血清中のセルフリーDNA とのペアサンプルを用いて、両サンプルにおける CCND2 遺伝子のメチル化状態の関連性の検証も完了した。

以上の成果を英文雑誌(9報: Impact factor (2010年) 合計 26.6)および国内学会発表(17報)にて行った。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to develop a minimally invasive predictive system with use of methylated CCND2 gene in the serum responsible for outcome of patients with hepatocellular carcinoma (HCC).

(1) We determined several conditions for serum collection and DNA extraction.

(2) We established a quantitative methylation-specific PCR analysis for CCND2 gene in serum.

(3) We demonstrated that methylation levels of CCND2 gene in serum were associated with poor outcome of patents

We reported the relevant research in the form of 9 papers (total of IF=26.6) and read 17 papers at academic meetings.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 癌の遺伝子診断

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

1. 研究開始当初の背景

- (1) 肝癌(HCC)は増加中の疾病であり、最新の統計では世界で1年間に62万例が新たにHCCを発症(Parkin *DM CA Cancer J Clin* 2005)し、日本では毎年2万人がHCCに罹患している(第16回全国原発性肝癌追跡調査報告)。
- (2) HCCは再発率の高い予後不良な悪性腫瘍のひとつでもあり、効果的な個別化治療を行うために治療前に施行可能な低侵襲かつ簡易な予後予測検査法の開発が切望される。
- (3) 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HCCに特異な予後予測マーカーの開発が急務である。
- (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:Iizuka *et al.*, *Cancer Res*, 2002; Iizuka *et al.*, *Oncogene*, 2003; Iizuka *et al.*, *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、細胞周期関連遺伝子サイクリンD2(CCND2)を含む12個の遺伝子群による高精度な肝内再発予測システム

を確立してきた(Iizuka *et al.*, *LANCET*, 2003)。

★本研究では、これらの蓄積されたデータおよびノウハウにより遺伝子を選出し、HCV関連HCCの新たな予後予測マーカーの開発を行う。

これまでの研究経緯と準備

サイクリンD2(CCND2)遺伝子はプロモーター領域のメチル化によりその発現が抑制されることが示され、この癌局所におけるCCND2遺伝子の発現低下は肝内再発と密接に関連することが確認された。また、我々はHCV関連HCCの患者末梢血中に多量のセルフリーDNAが浮遊し循環していることを世界で初めて報告した(Iizuka *et al.*, *Anticancer Res*, 2006)。さらに、この血中セルフリーDNA量が増加したHCV陽性HCC症例は腫瘍サイズが大きく予後不良であることを大規模臨床研究で確認した(Tokuhisa, Iizuka *et al.*, *Br J Cancer* 2007)。このように、セルフリーDNAは腫瘍マーカーのソースとして相応しく、HCC患者の末梢血中のセルフリーDNAを調べることにより、癌局所の遺伝子メチル化状態が推測できる可能性が大である。

以上の結果を踏まえ、患者の末梢血を浮遊しているCCND2遺伝子のメチル化状態の定量解析により、HCV陽性HCC患者の再発予測を高精度に行うという着想に至った。

2. 研究の目的

末梢血中のメチル化 CCND2 遺伝子測定による
肝癌の低侵襲性予後診断法の開発

3. 研究の方法

平成 21 年度

- (1) サンプルング条件の設定(血清回収方法、
セルフリーDNA の回収および抽出、定量法)。
- (2) CCND2 遺伝子に対する定量的メチル化解
析方法の確立。
- (3) CCND2 遺伝子の発現異常と HCC 細胞の生
物学的悪性度との関連性評価。

平成 22 年度以降

- (4) 癌特異的にメチル化が生じているか HCV
陽性 HCV 感染患者との比較。
- (5) 治癒切除症例の予後と CCND2 メチル化率
との関連性の検証。
- (6) (3) の継続実験。

4. 研究成果

末梢血中のメチル化 CCND2 遺伝子量は肝癌の
予後とおおいに関連しており、本遺伝子およ
びその他のメチル化遺伝子による低侵襲性
予後診断法の確立の可能性が高まった。一連
の結果を踏まえ、多遺伝子での予測システム
化を目標に、新規の基盤研究 C で研究を継続
するとともに、CCND2 遺伝子を含む関連論文
を海外雑誌に 9 報し、学会で 17 報行った。

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)

- ① Kuramitsu Y, Iizuka N, 他 11 名、4 番目.
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. 31(10): 3331-6, 2011.
(2010 IF=1.656) (査読あり)

- ② Wang Y, Iizuka N, 他 8 名、6 番目.
Differential expression of up-regulated
cofilin-1 and down-regulated cofilin-2
characteristic of pancreatic cancer
tissues. Oncology Rep. 26(6): 1595-9,
2011. (2010 IF=1.681) (査読あり)
- ③ Iizuka N, 他 25 名、1 番目. Efficient
detection of hepatocellular carcinoma
by a hybrid blood test of epigenetic and
classical protein markers. Clinica
Chimica Acta 412(1-2): 152-8, 2011.
(2010 IF=2.388) (査読あり)
- ④ Tsutsui M, Iizuka N, 他 10 名、2 番目.
Methylated cyclin D2 gene circulating
in the blood as a prognosis predictor of
hepatocellular carcinoma. Clinica
Chimica Acta 411(7-8): 516-20, 2010.
(2010 IF=2.388) (査読あり)
- ⑤ Tsunedomi R, Iizuka N, 他 6 名、3 番目.
The assessment of methylated BASP1
and SRD5A2 levels in the detection of
early hepatocellular carcinoma.
International journal of oncology 36(1):
205-12, 2010. (2010 IF=2.571) (査読あ
り)
- ⑥ Tamesa T, Iizuka N, 他 6 名、2 番目.
High serum levels of vascular
endothelial growth factor after
hepatectomy are associated with poor
prognosis in hepatocellular carcinoma.
Hepato-gastroenterology 56(93):1122-6,
2009 (2010 IF=0.669) (査読あり)
- ⑦ Yoshimura K, Iizuka N, 他 13 名、9 番
目. Integrin alpha2 mediates selective
metastasis to the liver. Cancer
Research 69(8): 7320-8, 2009 (2010
IF=8.234) (査読あり)
- ⑧ Kimura N, Iizuka N, 他 7 名、3 番目.
Rapid and quantitative detection of
CpG-methylation status using TaqMan
PCR combined with
methyl-binding-domain polypeptide.
Clinical Biochemistry 42(10-11):
1113-22, 2009. (2010 IF=2.043) (査読あ
り)
- ⑨ Moribe T, Iizuka N, 他 9 名、2 番目.
Methylation of multiple genes as
molecular markers for diagnosis of a
small, well-differentiated
hepatocellular carcinoma. Int J Cancer
125(2):388-97, 2009 (2010 IF=4.926)(査
読あり)

〔学会発表〕(計 17 件)

- ① 筒井理仁、飯塚徳男 他 術前血清メチル化 cyclin D2(CCND2) 遺伝子の計測による肝切除後の早期肝内再発予測 第 110 回 日本外科学会学術総会 2010 年 4 月 8 日 名古屋国際会議場、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

徳久 善弘 (TOKUHISA YOSHIHIRO)
山口大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30379961
(H21)