

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25年 5月 2日現在

機関番号：15501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22791284
 研究課題名（和文） 肝細胞癌再発関連遺伝子のDNA異常に基づく血液からの再発予測システムの開発
 研究課題名（英文） Development of reliable prediction system of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after surgery
 研究代表者
 恒富 亮一 (TSUNEDOMI RYOUICHI)
 山口大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：10420514

研究成果の概要（和文）：

肝細胞癌における術後1-2年での肝内再発予測システムの開発を目的とした。再発関連遺伝子の網羅的スクリーニングとして、DNAマイクロアレイとHiCEPの2つの異なる解析を行った。real-time PCRによる検証を経て、無再発生存期間と有意に関連する9遺伝子を再発関連遺伝子として同定した。4つの遺伝子発現レベルを組み合わせた術後2年以内再発予測式の性能は、Training（正確度88%）及びValidation（正確度80%）と示された。

研究成果の概要（英文）：

We developed prediction system of the risk of intrahepatic recurrence (IHR) of hepatocellular carcinoma (HCC) after surgery. IHR-related genes were screened by DNA microarray and an amplified fragment length polymorphism-based High Coverage Expression Profiling analyses. Nine genes were identified as IHR-related genes. Those 9 IHR-related genes showed significant differences of prognosis. Our prediction system consists of the combination of mRNA levels showed high performance to prediction of IHR within 2 years after surgery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：腫瘍学

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：癌

1. 研究開始当初の背景

我が国では、肝細胞癌の発生主因の一つとされているC型肝炎ウイルス感染者が多数存在する。肝細胞癌は慢性肝炎や肝硬変を素地としての多中心性発癌に加えて、早期に再発

し生存率に大きく影響する門脈経由での肝内再発とがあり、再発率・致死率の高い癌となっている。

これまでに多数の網羅的解析から再発と関連する mRNA 異常が多く報告されている。

mRNA 発現異常の多くは、DNA における点変異や増幅・欠失等や、メチル化状態等のエピジェネティック異常が原因であることから、mRNA 発現異常を示す遺伝子の中には DNA 異常とリンクするものが多く含まれ、バイオマーカーとして mRNA の発現異常から DNA 異常に置き換えが可能な遺伝子を同定し、バイオマーカーとする着想に至った。

本研究は、臨床データを基盤として標的遺伝子の同定を基礎的に行い、マーカーとして臨床に還元するトランスレショナルリサーチの一環である。

2. 研究の目的

肝細胞癌は、治癒切除にもかかわらず再発率の高い癌である。本研究の目的は、肝細胞癌再発に対するバイオマーカーを見出し、個別化医療に役立てることである。これは、人々の QOL において癌の発生防止が第一であるが、進行癌が発見された場合でも外科手術の成功後は、再発を怖れずに安心して暮らせる社会を築くことを目的としている。

3. 研究の方法

再発関連遺伝子の網羅的スクリーニングとして、術後 2 年以上無再発症例 (n = 5) と術後 1 年以内再発症例 (n = 5) における癌部・非癌部からの cDNA を用いて、DNA マイクロアレイと AFLP-based HiCEP の 2 つの異なるトランスクリプトーム解析を行った。スクリーニング結果の検証として、24 例を用いて real-time PCR 解析を行った。転写因子結合モチーフの検索は、Match 及び P-Match プログラムを用いた。再発予測式を構築し、新たな 10 例を用いて検証を行った。再発予測識別性能の評価には ROC 曲線解析を、予後解析には Kaplan-Meier 曲線を用いた。

さらに、HCV 関連肝細胞癌 (n = 41) を用いて、DNA マイクロアレイ解析による術後肝内再発関連遺伝子スクリーニングを行った。スクリーニングの validation には、異なるサンプル集団 (n = 46) を用いての real-time RT-PCR によって行った。DNA メチル化解析には Methylight 法を用いた (n = 25)。Time-to-event 解析には、ROC 曲線解析からのカットオフ値を用いて、Kaplan-Meier 曲線の Log Rank 検定及び Cox 回帰分析を行った。

4. 研究成果

網羅的スクリーニングと real-time PCR による検証から、TSPAN8, CYP2A6, SLC22A1, NQO1, SLC10A1, GLYAT, COL15A1 を再発関連遺伝子として同定した。さらに上流配列解析から ESR1 も再発関連遺伝子と同定された。ESR1, NQO1 は術後 1 年再発・無再発において有意に差が認められ、TSPAN8, CYP2A6,

SLC22A1, ESR1, SLC10A1, COL15A1 では 2 年再発・無再発での有意差が認められた。上記 8 遺伝子の癌部・非癌部発現比は、無再発生存期間における有意な差を示した。4 つの遺伝子発現レベルを組み合わせた術後 2 年以内再発予測式の性能は、Training (ROC 曲線下面積 0.99、accuracy 88%, n = 24) 及び Validation (accuracy 80%, n = 10) と示された。

さらに、別の DNA マイクロアレイ解析から、ATP-binding cassette, sub-family B, member 6 (ABCB6) を再発関連遺伝子として同定した。ABCB6 mRNA レベルは、無再発群と比較して再発群において有意な増加を示した (2.5-fold, P = 0.01)。ABCB6 mRNA 高レベル群は低レベル群と比較して有意に短い無再発生存期間を示した (P = 0.01)。ABCB6 遺伝子の DNA メチル化レベルについても再発との有意な相関が観察され (P = 0.01)、低 DNA メチル化レベル群は高レベル群と比較して有意に短い無再発生存期間を示した (P = 0.02)。多変量解析から ABCB6 mRNA レベルは肝細胞癌術後再発に対する独立した危険因子と示された。別の 20 例の肝細胞癌からの ABCB6 mRNA レベルにおいても、無再発生存期間との有意な相関が再び示された (P = 0.04)。

また、ゲノム全体のメチル化は癌部では hypomethylation となることが知られていることから、global DNA methylation marker である LINE-1 と Alu-repeat における DNA メチル化率を解析した。非癌部と比較して癌部での hypomethylation が LINE-1 (0.57-fold, p < 0.001) および Alu-repeat (0.84-fold, p = 0.024) のそれぞれにおいて観察された。非癌部における Alu-repeat メチル化率は、術後 2 年以内再発群 (n = 15) では 2 年無再発群 (n = 9) と比較して有意に低かった (0.80-fold, p = 0.030)。非癌部における Alu-repeat メチル化率による術後 2 年以内肝内再発識別能は、ROC 曲線下面積 0.77 (感度 66.7%、特異度 93.3%) を示した。Alu-repeat 低メチル化群は高メチル化群と比較して有意に無再発生存期間が短かった (p = 0.007)。多変量ロジスティック回帰から、非癌部における Alu-repeat メチル化率は術後 2 年以内肝内再発の独立した規定因子であった。

以上から、異なる原理からなるトランスクリプトーム解析から、優れた再発予測性能を得ることが出来た。さらに、global methylation marker Alu-repeat における DNA メチル化率と再発との関連や、ABCB6 について、mRNA 異常とリンクした DNA メチル化異常も明らかとなり、血液からの再発予測に期待が持てる。本研究による再発リスク予測からの患者層別化は、新たな再発抑制治療の開発への貢献が期待される。

また、本研究に関する成果は、第 18 回欧州消化器病関連週間 (UEGW 2010) において Travel grant 及び oral presentation (全投稿演題に対する採択率 15%) への採択や、第 115 回山口大学医学会学術講演会奨励賞、第 20 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2012) ポスター優秀演題を受賞し、国内の大規模な学会である第 66 回日本消化器外科学会総会や第 19 回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2011) 等ではワークショップに採用され、国内外に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 6 件)

①Ryouichi Tsunedomi, 他 9 名, 1 番目. *ABCB6* mRNA and DNA methylation levels serve as useful biomarkers for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*. 査読有, 42 巻, 2013 年, 1551-1559

②Ryouichi Tsunedomi, 他 3 名, 1 番目. Susceptibility of hepatoma-derived cells to histone deacetylase inhibitors is associated with *ID2* expression. *International Journal of Oncology*. 査読有, 42 巻, 2013 年, 1159-1166

③Ryouichi Tsunedomi, Shoichi Hazama, and Masaaki Oka. Personalized Chemotherapy for Colorectal Cancer based on the genome information. *Journal of the Japan Society of Applied Electromagnetics and Mechanics*. 査読無, 20 巻, 2012 年, 589-593

④Michihisa Iida, Ryouichi Tsunedomi, 他 9 名, 3 番目. Overexpression of the RD RNA binding protein in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*, 査読有, 28 巻, 2012 年, 728-734

⑤Norio Iizuka, Ryouichi Tsunedomi, 他 24 名, 19 番目. Efficient detection of hepatocellular carcinoma by a hybrid blood test of epigenetic and classical protein markers. *Clinica Chimica Acta*. 査読有, 412 巻, 2011 年, 152-158

⑥Masahito Tsutsui, Ryouichi Tsunedomi, 他 14 名, 10 番目. Methylated *cyclin D2* gene circulating in the blood as a prognosis predictor of hepatocellular carcinoma. *Clinica Chimica Acta*. 査読有, 411 巻, 2010 年, 516-520

[学会発表] (計 32 件)

①恒富 亮一: 肝細胞癌の転移・再発抑制～

誘導肝細胞癌幹細胞の解析～; 第 2 回超異分野学会、2013 年 3 月 16 日、すみだ中小企業センター (東京)

②碓 彰一: 次世代の個別化薬物療法をめざしたイリノテカン毒性予測システムの開発; 第 46 回制癌剤適応研究会、2013 年 3 月 8 日、軽井沢プリンスホテルウエスト (長野)

③亀井 修一: カスタム DNA チップを用いた KRAS 遺伝子変異解析法の開発; 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、マリンメッセ福岡 (福岡)

④吉村 清: ヒト膵癌細胞株からの Cancer Stem Cells の誘導; 第 25 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2012 年 12 月 13 日、倉敷市芸文館 (岡山)

⑤平山 幸一: UDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子多型の判別による塩酸イリノテカン副作用発現予測法の開発; 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会、2012 年 11 月 30 日、国立京都国際会館 (京都)

⑥恒富 亮一: 肝細胞癌術後肝内再発予測マーカーとしての ABCB6 遺伝子; 第 23 回日本消化器癌発生学会総会、2012 年 11 月 16 日、ルネッサンスリゾートナルト (徳島)

⑦飯田 通久: 肝細胞癌における MCM6 の発現解析; 第 23 回日本消化器癌発生学会総会、2012 年 11 月 15 日、ルネッサンスリゾートナルト (徳島)

⑧Ryouichi Tsunedomi: RELIABLE PREDICTION OF EARLY INTRAHEPATIC RECURRENCE OF HCV-RELATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA AFTER SURGERY BY GENE EXPRESSIONAL PROFILING; 20th United European Gastroenterology Week (UEGW2012), 2012 年 10 月 22 日, RAI 国際会議場 (Amsterdam, THE NETHERLANDS)

⑨恒富 亮一: HCV 関連肝細胞癌における予後予測; 第 20 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2012)、2012 年 10 月 12 日、神戸国際展示場 (神戸)

⑩吉村 清: ヒト低分化型肝細胞癌株からの癌幹細胞の誘導の試み; 第 20 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2012)、2012 年 10 月 11 日、ポートピアホテル (神戸)

⑪Ryouichi Tsunedomi: Cancer-stem cell-like sphere cells induced from a cell line derived from poorly-differentiated hepatocellular carcinoma; 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、札幌市教育文化会館 (札幌)

⑫Kiyoshi Yoshimura: Inducing pancreatic cancer stem cell like population by culture and the analysis of its microenvironment; 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、札幌市教育文化会館 (札幌)

⑬吉村 清: 培養による膵癌幹細胞 Rich ポピ

ユレーションの誘導時の微小周辺環境の探索；第16回日本がん免疫学会総会、2012年7月27日、北海道大学学術交流会館（札幌）

⑭飯田 通久：血清を用いた CpG island methylator phenotype (CIMP) による予後評価への応用；第112回日本外科学会定期学術集会、2012年4月13日、幕張メッセ（千葉）

⑮恒富 亮一：UGT1As 多型の組合せによるイリノテカン副作用予測；第22回日本消化器癌発生学会総会、2011年11月26日、ホテルニューオータニ佐賀（佐賀）

⑯恒富 亮一：HCV 関連肝細胞癌における Alu repeat メチル化率による予後予測；第19回日本消化器関連学会週間（JDDW2011）、2011年10月22日、福岡サンパレス（福岡）

⑰Shin Kan：Enhancement of an immune sensitivity of cancer cells by chemotherapeutic agents；第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋国際会議場（名古屋）

⑱Ryouichi Tsunedomi：DNA methylation levels at upstream of ABCB6 correlate with intrahepatic recurrence within 2 years in HCV-related HCC；第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日、名古屋国際会議場（名古屋）

⑲Norio Iizuka：Serum CpG island methylator phenotype (sCIMP) and prognosis of hepatocellular carcinoma；第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日、名古屋国際会議場（名古屋）

⑳Ryouichi Tsunedomi：Prediction of intrahepatic recurrence by global and gene-specific DNA methylation markers in non-tumorous liver；8th International Symposium on Minimal Residual Cancer (ISMRC)、2011年9月22日、大阪国際会議場（大阪）

㉑恒富 亮一：ABCB6 遺伝子をマーカーとした 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年7月15日、名古屋国際会議場（名古屋）

㉒飯田 通久：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年5月26-28日、紙上開催

㉓筒井 理仁：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年5月26-28日、紙上開催

㉔恒富 亮一：肝細胞癌における ID2 発現レベルとヒストン脱アセチル化酵素阻害剤感受性；第44回制癌剤適応研究会、2011年3月11日、ホテル日航熊本（熊本）

㉕恒富 亮一：ABCB6 遺伝子に基づく HCV 関連肝細胞癌の予後予測；第115回山口医学会学術講演会、2011年2月19日、山口大学霜仁会館（山口）

㉖筒井 理仁：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115回山口医学会学術講演会、2011年2月19日、山口大学霜仁会館（山口）

㉗Ryouichi Tsunedomi：Methylation levels of ABCB6 gene might serve as a useful predictive biomarker for early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma；第33回日本分子生物学会年会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド（神戸）

㉘Ryouichi Tsunedomi：ABCB6 TRANSCRIPT AND METHYLATION LEVELS MIGHT SERVE AS USEFUL PREDICTIVE BIOMARKERS FOR EARLY INTRAHEPATIC RECURRENCE OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA；18th United European Gastroenterology Week (UEGW2010)、2010年10月27日、Centre Conventions International Barcelona (Barcelona, SPAIN)

㉙Kiyoshi Yoshimura：Integrins on the surface of tumor cells after sites of metastases；第69回日本癌学会学術総会、2010年9月23日、大阪国際会議場（大阪）

㉚Ryouichi Tsunedomi：ABCB6 mRNA levels in HCV-related hepatocellular carcinoma correlate with development of early intrahepatic recurrence；第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪国際会議場（大阪）

㉛恒富 亮一：肝細胞癌における ID2 発現の HDAC 阻害剤への影響；第19回日本癌病態治療研究会、2010年6月30日、東京ステーションコンファレンス サピアタワー（東京）

㉜筒井 理仁：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年4月8日、名古屋国際会議場（名古屋）

〔産業財産権〕

○出願状況（計4件）

①名称：K-ras における変異検出用オリゴヌクレオチドプローブ
発明者：岡 正朗、裕 彰一、恒富 亮一、平山 幸一、細谷 真悠子
権利者：山口大学、東洋鋼板株式会社
種類：特許
番号：特願 2012-259949
出願年月日：2012年11月28日
国内外の別：国内

②名称：消化器系がん幹細胞を培養するための無血清培地、及びそれを用いた消化器系がん幹細胞の増殖方法
発明者：吉村 清、恒富 亮一、渡邊 裕策、岡 正朗
権利者：山口大学

種類：特許

番号：特願 2012-047433

出願年月日：2012年3月2日

国内外の別：国内

③名称：イリノテカンの副作用の発生危険度を判定する方法及びそのためのキット

発明者：岡 正朗、碓 彰一、恒富 亮一、浜本 義彦、藤田 悠介、平山 幸一、伊藤 茜

権利者：山口大学、東洋鋼鋸株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2011/062067

出願年月日：2011年5月26日

国内外の別：国外

④名称：肝細胞癌の再発予測マーカー

発明者：恒富 亮一、岡 正朗、飯塚 徳男

権利者：山口大学

種類：特許

番号：PCT/JP2011/001905

出願年月日：2011年3月30日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恒富 亮一 (TSUNEDOMI RYOUICHI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10420514