

令和元年6月6日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08655

研究課題名(和文)肝細胞癌をはじめとする消化器系腫瘍の新規腫瘍マーカー・ラミニン関連分子の開発

研究課題名(英文) Potential role of monomeric laminin-gamma 2 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma.

研究代表者

安田 宏 (Yasuda, Hiroshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80262129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラミニン332の構成成分であるラミニン γ 2単鎖(Ln- γ 2m)は、様々な消化器癌の先進部分で特異的に発現することが報告されている。Ln- γ 2mを選択的に認識するモノクローナル抗体を用いて、Ln- γ 2mを定量可能な自動アッセイ系を開発した越川と共同で、Ln- γ 2mアッセイ法の臨床応用の有用性を検討した。Ln- γ 2mとPIVKA-2との組み合わせは、診療ガイドラインで推奨されているAFP・PIVKA-2より更に有用な肝細胞癌の早期診断マーカーである可能性を見出した。更に肝動脈化学塞栓術後でLn- γ 2m低下例は治療有効例が多く、治療効果予測にも有用な可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

5大癌の一つである肝癌は、今後ウイルス性肝炎を背景とするものは減少し、サーベイランスが困難な生活習慣病を背景とする非B非C型が増加すると予測される。難治癌である膵癌の罹患率は特に高齢者で増加しており、2013年の死亡数はほぼ肝癌と同数の3万人である。東アジアではウイルス肝炎罹患率が高く、欧米では非アルコール性脂肪肝に伴う肝細胞癌が増加している。肝癌・膵癌の制圧は世界的に重要な課題である。癌の新たなスクリーニング法の確立が急務である。

研究成果の概要(英文)：Laminin (Ln)-332 consists of α 3, β 3, and γ 2 chains, which mediate epithelial cell adhesion to the basement membrane. Ln- γ 2 is frequently expressed as a monomer in the invasion front of several types of malignant tissues without simultaneous expression of Ln- α 3 and/or Ln- β 3 chains. Moreover, monomeric Ln- γ 2 (Ln- γ 2m) induces tumor cell proliferation and migration in vitro. These unique biological activities indicate that Ln- γ 2m could be a candidate biomarker for early cancer surveillance. We have developed monoclonal antibodies to specifically detect Ln- γ 2m, and devised a highly sensitive method to measure serum Ln- γ 2m levels using a fully automated CLIA. We evaluated its diagnostic value in sera from patients with several digestive cancers, including HCC, and found serum Ln- γ 2m to be a clinically available biomarker for HCC surveillance. The combination of Ln- γ 2m and PIVKA-2 may be more sensitive for clinical diagnosis of HCC than any currently used combination.

研究分野：消化器病学

キーワード：ラミニン γ 2短鎖 肝細胞癌 バイオマーカー PIVKA-2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治癌である肝癌の死亡者数は本邦における癌死亡の上位を占めている。現在、肝細胞癌に対しての根治療法は外科的手術であるが、切除不能症例として診断されることも少なくない。従来型の肝細胞癌はウイルス性肝炎に起因するものが多くを占め、高リスク群の設定とスクリーニングが可能であった。しかし近年、従来のリスク設定では低リスク群に属する生活習慣病に起因する非アルコール性脂肪性肝炎に伴う肝細胞癌が増加している。また東アジアではウイルス肝炎罹患率がなお高く、肝細胞癌制圧は世界的に重要な課題である。

2. 研究の目的

ラミニン 332 (Ln-332) は の三鎖の三量体より成る基底膜構成因子である。その構成分子である Ln- 2 単鎖 (モノマー) には腫瘍増殖・遊走作用があり、様々な消化器系腫瘍の先進部分で特異的に発現することが報告されている。連携研究者の越川らは Ln-332 とは交叉反応せず、Ln- 2 単鎖のみを検出するモノクローナル抗体を作成し、ELISA 法を開発した。予備的検討では肝細胞癌患者血清で Ln- 2 は既存 AFP や PIVKA-2 よりも優れた精度で上昇を認めた。本申請では血清 Ln- 2 単鎖の発現を本法で調べることで、肝細胞癌をはじめとする消化器癌の新しい腫瘍マーカーになりうる可能性を検証する。

3. 研究の方法

Ln- 2 単鎖は多岐にわたる上皮系腫瘍先進部細胞から特異的に分泌される因子である。連携研究者の越川らは Ln-5 とは交叉反応せず、Ln- 2 単鎖 (モノマー) のみを検出するモノクローナル抗体を作成し、ELISA 法を構築した。更に化学発光免疫測定法の開発に成功した。

本申請では、健常人ボランティア、肝細胞癌および消化器系各種良性および悪性疾患などの様々な病態における血清 Ln- 2 値を測定し、臨床的意義を検討する。Ln- 2 単鎖の消化器癌の新規腫瘍マーカーとしての有用性を検証する。

4. 研究成果

正常肝には Ln- 2 の発現は認められない。まず肝細胞癌での Ln- 2 の発現を *in vitro/ in vivo* で検討した。切除肝癌組織において免疫組織化学的に Ln- 2 の発現を検討すると 10 例中 5 例に腫瘍辺縁の低分化成分の腫瘍細胞の細胞質に発現を認めた。 3 あるいは 3 の発現は認めず、Ln-332 ではなく Ln- 2 短鎖の発現と考えられた (図 1)。またヒト肝細胞癌株 Alexander および HepG2 でウエスタンブロット解析を行うと同様に Ln-332 の発現は認めず、Ln- 2 短鎖の発現を認めた。

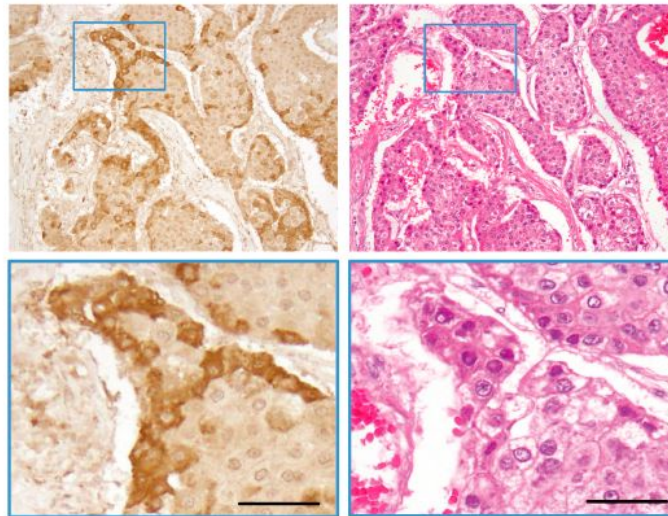


図1. 切除肝癌組織でのLn- 2の発現（文献5，7より）

我々は本測定法を用いて、2007年から2015年までに聖マリアンナ医科大学病院にて診断した慢性肝疾患（CLD: chronic liver disease）症例24例および肝細胞癌（HCC）症例57例と健常人52例を対象とし、血清Ln- 2短鎖値を測定した。その結果、Ln- 2mの中央値は健常群41.1 pg/mL、CLD 76.7 pg/mL、肝細胞癌 173.2 pg/mLであり、肝細胞癌症例において有意にLn- 2短鎖値が高値となることを明らかにした（図2）。

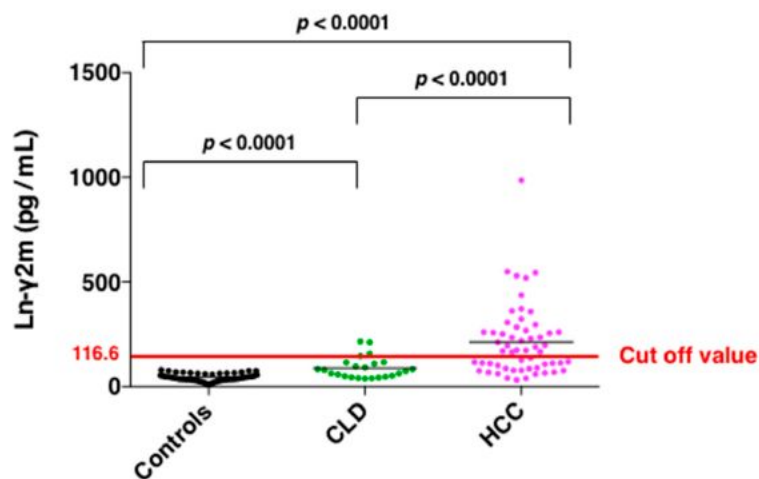


図2. 健常者・慢性肝疾患・肝細胞癌患者の血清Ln- 2短鎖値（文献5，7より）

また、Ln- 2短鎖の肝細胞癌に対する血清腫瘍マーカーとしての診断能についてAlpha fetoprotein（AFP）およびdes-gamma-carboxy prothrombin（DCP）との比較検討を行った結果、健常群とHCCの2群間におけるAUCはLn- 2短鎖0.95、AFP 0.93、DCP 0.81であり、肝細胞癌症例の陽性率はLn- 2短鎖は63%、AFPは53%、DCPは68%であった。HCC症例では89%でLn- 2短鎖あるいはDCPが陽性であり、同様にLn- 2短鎖とAFPでは81%、AFPとDCPでは82%が陽性であった。早期肝細胞癌（T1 or T2）症例での陽性率はLn- 2短鎖で61%、AFP 39%、DCP 57%であった。

更に、治療効果判定への有用性を検討した。肝動脈化学塞栓療法（TACE）を施行したHCC 29例で治療前後のLn- 2単鎖とCT画像で治療効果を検討すると、9例（31%）でTACE後にLn- 2

短鎖の低下を認め、治療が有効であった CR あるいは PR は 8 例(89%)で、 PD は 1 例(11%)であった。一方、TACE 後に血清 Ln- 2 短鎖の上昇を認めた 20 例(69%)では、CR あるいは PR が 9 例(45%)で、治療が無効である SD あるいは PD は 11 例(55%)であった。血清 Ln- 2 短鎖低下群で有意な腫瘍縮小効果(CR あるいは PR)を認めた。診断だけでなく、治療効果予測にも有用なバイオマーカーである可能性 がある。

以上の結果から、Ln- 2 短鎖は AFP を上回る肝細胞癌での陽性率を示し、Ln- 2 短鎖と DCP を併用することで既存マーカー併用よりも陽性率が向上することを見出だした。また、Ln- 2 短鎖は AFP および DCP よりもより早期の HCC 診断に寄与する可能性を見出だした。TACE 後の治療効果予測にも有用な可能性 がある。Ln- 2 短鎖は HCC に対して臨床応用可能な新規血清腫瘍マーカーとなり得る。

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Fujimoto A, Saito Y, Abe S, Hoteya S, Nomura K, **Yasuda H**, Matsuo Y, Uraoka T, Kuribayashi S, Saito I, Tsuji Y, Maehata T, Ochiai Y, Nishizawa T, Yahagi N. Haemostasis treatment using dual red imaging during endoscopic submucosal dissection: a multicentre, open-label, randomised controlled trial. **BMJ Open Gastroenterol.** 2019 Mar 30;6(1):e000275. doi: 10.1136/bmjgast-2019-000275. eCollection 2019. DOI 10.1136/bmjgast-2019000275. (査読あり)
2. Aiso M, Takikawa H, Tsuji K, Kagawa T, Watanabe M, Tanaka A, Sato K, Sakisaka S, Hiasa Y, Takei Y, Ohira H, Ayada M, Hashimoto E, Kaneko S, Ueno Y, Ohmoto K, Takaki A, Torimura T, Matsuzaki Y, Tajiri K, Yoneda M, Ito T, Kato N, Ikejima K, Mochida S, **Yasuda H**, Sakamoto N. Analysis of 307 cases with drug-induced liver injury between 2010 and 2018 in Japan. **Hepatol Res.** 2019 Jan;49(1):105-110. doi: 10.1111/hepr.13288. (査読あり)
3. **Yasuda H**, Nakagawa M, Kiyokawa H, Yoshida E, Yoshimura T, Koshikawa N, Itoh F, Seiki M. Unique Biological Activity and Potential Role of Monomeric Laminin- γ 2 as a Novel Biomarker for Hepatocellular Carcinoma: A Review. **Int J Mol Sci.** 2019. Jan; 8: 20(1). DOI 10.3390/ijms20010226. (査読あり)
4. Ikeda H, Watanabe T, Shimizu H, Hiraishi T, Kaneko R, Baba T, Takahashi H, Matsunaga K, Matsumoto N, **Yasuda H**, Okuse C, Iwabuchi S, Suzuki M, Itoh F. Efficacy of ledipasvir/sofosbuvir with or without ribavirin for 12 weeks in genotype 1b HCV patients previously treated with a nonstructural protein 5A inhibitor-containing regimen. **Hepatol Res** 2018; 48: 802-809. DOI 10.1111/hepr.13074. (査読あり)
5. Kiyokawa H, **Yasuda H**, Oikawa R, Okuse C, Matsumoto N, Ikeda H, Watanabe T, **Yamamoto H**, Itoh F, Otsubo T, Yoshimura T, Yoshida E, Nakagawa M, Koshikawa N, Seiki M. Serum monomeric laminin- γ 2 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. **Cancer Sci.** 2017; 108; 1432-1439. DOI 10.1111/cas.13261. (査読あり)
6. Ikeda H, Watanabe T, Okuse C, Matsumoto N, Ishii T, Yamada N, Shigefuku R, Hattori N, Matsunaga K, Nakano H, Hiraishi T, Kobayashi M, Yasuda K, **Yamamoto H**, **Yasuda H**, Kurosaki M, Izumi N, Yotsuyanagi H, Suzuki M, Itoh F. Impact of resistance-associated variant dominancy

on treatment in patients with HCV genotype 1b receiving daclatasvir/asunaprevir. **J Med Virol.** 2017; 89: 99-105. DOI 10.1002/jmv.24608. (査読あり)

7. Mizukami T, Sakai K, Naruki S, Taniyama T, Horie Y, Izawa N, Tsuda T, Fujino T, Boku N, **Yasuda H**, Fukunaga T, Nakajima TE, Nishio K. Identification of a FGFR3-TACC3 fusion in esophageal cancer. *Annals of Oncology*, 2017 28: 437-438. DOI 10.1093/annonc/mdw550. (査読あり)
8. **Yamamoto H**, Watanabe Y, Oikawa R, Morita R, Yoshida Y, Maehata T, **Yasuda H**, Itoh F. BARHL2 Methylation Using Gastric Wash DNA or Gastric Juice Exosomal DNA is a Useful Marker For Early Detection of Gastric Cancer in an H. pylori-Independent Manner. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 2016;7(7) : e184. doi: 10.1038/ctg.2016.40. (査読あり)
9. Ikeda H, Okuse C, Watanabe T, Matsumoto N, Matsunaga K, Shigefuku R, Hattori N, Hiraishi T, Fukuda Y, Noguchi Y, Ishii T, Shima J, Nakahara K, **Yamamoto H**, **Yasuda H**, Yotsuyanagi H, Koike K, Itoh F, Suzuki M. Can the Abbott RealTime hepatitis C virus assay be used to predict therapeutic outcomes in hepatitis C virus-infected patients undergoing triple therapy? **Turk J Gastroenterol.** 2016; 27: 165-72. DOI 10.5152/tjg.2016.150300. (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 近江亮介, 清川博史, 松本伸行, 奥瀬千晃, 中川将利, 吉田栄作, 吉村 徹, 越川直彦, 安田 宏, 伊東文生 肝細胞癌に対する TACE 後治療効果判定における血清ラミニン 2 単鎖の有用性 日本消化器関連週間 2018 年 11 月 神戸
2. **Yasuda H**, Watanabe Y, Itoh F. Role of COX-2 gene promoter methylation and Helicobacter pylori infection in gastric ulcer healing. 米国消化器関連週間 (Washington DC) June 2018.
3. Kiyokawa H, **Yasuda H**, Okuse C, Matsumoto N, Yoshimura T, Yoshida R, Nakagawa M. Seiki M, Koshikawa N. Itoh F. Serum monomeric laminin-γ2 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. 米国消化器関連週間 (Chicago) May 2017.
4. 越川直彦, 安田宏, 清川博史, 伊東文生, 中川将利, 吉田栄作, 吉村徹, 清木元治, 新たな肝細胞がん診断のバイオマーカーの同定、第 75 回日本癌学会総会、2016 年 10 月 7 日、横浜.
5. 清川博史, 越川直彦, 安田宏, 清木元治, 伊東文生. 肝細胞癌の新規腫瘍マーカーの探索. 日本電気泳動学会総会, 2016 年 8 月 26 日、釧路.
6. 清川博史, 安田 宏, 松本伸行, 石井俊哉, 奥瀬千晃, 山本博幸, 中川将利, 吉田栄作, 吉村 徹, 清木元治, 越川直彦, 伊東文生. 新規肝癌腫瘍マーカーとしての血清ラミニン 2 単鎖の有用性 第 52 回日本肝臓学会総会 2016 年 05 月 20 日、千葉

〔図書〕(計 1 件)

坂井健雄、河原克雄 総編集、人体の正常構造と機能 改訂第 3 版、第 巻・肝胆膵、泉井亮、妹尾春樹、金田研司、安田 宏、眞嶋浩聡、大野秀樹 編集・著 総頁数 72 頁 日本医事新報社、2017.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山本 博幸

ローマ字氏名：Yamamoto, Hiroyuki

所属研究機関名：聖マリアンナ医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40332910

(2)研究協力者

研究協力者氏名：越川 直彦

ローマ字氏名：Koshikawa, Naohiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。