

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701098

研究課題名(和文) 遺伝子発現プロファイルを用いた肝細胞癌治療における新規バイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma

研究代表者

砂子阪 肇 (Sunagozaka, Hajime)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：90595836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：今回、我々はSAGEライブラリーを用いた網羅的遺伝子解析による肝細胞癌治療における新規分子標的C19ORF10のフルクローニングに成功した。

C19ORF10は分子量17kDaの分泌蛋白でPI3K/AktおよびMAPK/Erk1/2を介する増殖因子であり、抗C19ORF10特異抗体の上清添加によりその癌細胞増殖は抑制された。この結果を論文化しInternational Journal of Cancerに投稿し、第129巻第7号1576-85頁に掲載された。

更に、ELISAプレートを作成し、ヒト肝癌患者血清中のC19ORF10血清濃度測定の臨床応用への検討を行った

研究成果の概要(英文)： This time, we succeeded in the full cloning of new molecular target C19ORF10 activated in hepatocellular carcinoma by the comprehensive gene analysis which used the SAGE Library. C19ORF10 is a growth factor through PI3 K/Akt and MAPK/Erk1/2. Cancer cell growth was suppressed by adding the anti-C19ORF10 antibody.

This result was submitted to International Journal of Cancer and published on Int J Cancer. 2011 Oct 1;129(7):1576-85.

Furthermore, we created the ELISA plate to C19ORF10 serum-concentration measurement and examine to clinical application of C19ORF10.

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：肝細胞癌 C19ORF10 SAGE

1. 研究開始当初の背景

原発性肝癌は日本の癌死亡の原因として、男性3位女性5位を占める癌腫で癌治療の中でも重要な位置を占める。

原発性肝癌の90%を占める肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma:HCC)ではAFP・AFP-L3分画およびPIVKA-IIといった血清中分泌蛋白が現在腫瘍マーカーとして広く使われており肝癌診療ガイドラインでも肝細胞癌の診断において2種類以上の腫瘍マーカーを測定することが推奨されている。しかし、その診断能において、それぞれの特異度は約95%程であるが、感度は3者を組み合わせても約60%程度に留まり、しかも腫瘍サイズが小さくなるほど、感度・特異度が低下する傾向も認められる。

これまで、我々の施設では、肝細胞癌においてcDNA micro array法/SAGE法を用いた網羅的遺伝子解析を行い、HCCではさまざまな遺伝子発現の変化が生じていることを報告してきた。

その中で正常肝・HCV関連HCC・背景肝組織より全体で45,746種類226,267タグのSAGEライブラリーを作成した。

結果、正常肝に比してHCCで有意(P<0.01)に発現が亢進していた遺伝子の内訳は既知遺伝子が42%、ESTが10%であった(図1)。

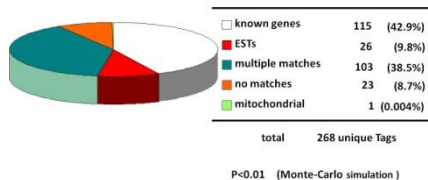


図1: HCCにおける発現亢進遺伝子

今回我々は、肝細胞癌治療における新しい分子標的を同定することを目的としESTに焦点を絞り、HCCで発現亢進していた未知遺伝子の中から、その一次構造より分泌蛋白と予想される、新規遺伝子C19ORF10に着目した。

SAGE mapを用い肝以外でのC19ORF10のmRNA発現を検討したところ、他臓器でもC19ORF10は広く発現しているものの発現量は微量であり他臓器由来癌組織中でもその発現はほぼ同等であったのに対し、肝臓では正常肝に比しHCCでは12倍と高い発現を認めた(図2)。

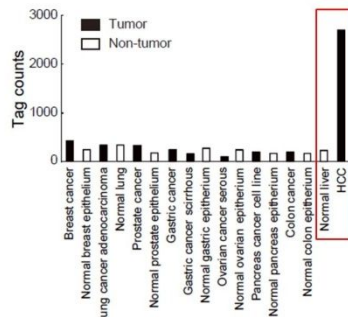


図2: 各臓器におけるc19orf10の発現プロファイル

更に多数例のヒトHCC組織を用いC19ORF10発現をRTD-PCRを用い検討した結果、C19ORF10は正常肝および背景肝組織と比較しても有意にHCC組織で発現が亢進しており、約65%のHCC組織で発現亢進を認めた(図3)。

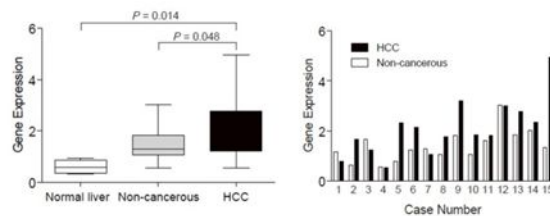


図3: c19orf10は背景肝組織と比較してもHCC組織で発現が亢進している

また肝癌細胞株であるHuH7やHepG2等でも発現亢進を認めた。また腫瘍サイズ別に見ても、他の既知腫瘍マーカー(AFP/AFP-L3/PIVKA-)が陰性である2cm以下のHCCでも75%の症例で発現が亢進していた。以上より今回同定したC19ORF10は他臓器に比較してHCC特異的に発現が亢進している分子であると考えられる。また、その一次構造より分泌蛋白をコードしていると予想され、HCCの新規腫瘍マーカーとしての可能性が大いに期待される。そこで今回、応募者はHCC特異的なC19ORF10が、肝癌診療における新規バイオマーカーおよび分子標的治療の対象となる可能性を検討する計画である。

2. 研究の目的

肝細胞癌では現在AFPやPIVKA-IIといった血清中分泌蛋白が腫瘍マーカーとして広く使われているが、小肝細胞癌における感度と特異度は十分なものではない。初回診断時に切除不可能な症例も少なくない。また最も治療効果の高い肝切除症例でも1.3.5年再発率は26~31%、50~63%、64~72%と高率で、最終的には脈管侵襲を伴う進行肝癌となることが多い。

HCCは他の癌腫と異なり肝硬変や慢性肝炎

といった慢性肝疾患を背景として発生するがその経過で様々な遺伝子変化が生じることは多くの報告がなされている。今回我々はヒト肝細胞癌組織を用いた網羅的遺伝子解析による肝細胞癌治療における新規腫瘍マーカーを同定することを目的とした

3. 研究の方法

平成 23 年度

(1) C19ORF10 のフルクローニングおよび発現ウイルスベクターの作成

● C19ORF10 クローニング

肝癌細胞株を用い、RTD-PCR にて C19ORF10 発現を確認し、発現を認める肝癌細胞株 cDNA から SMART RACE 法(SMART RACE cDNA Amplification kit ; Clontech)を用い、C19ORF10 の完全長クローニングを行う。

● 発現ウイルスベクターの作成

クローニング後、FLAG 融合 C19ORF10 発現ベクター組み換え型ウイルスベクターを作製。

使用するウイルスとしてはアデノウイルスベクター AxCap53 の cDNA を C19ORF10-FLAG cDNA に置き換えたものを一過性発現に用いる。

常発現系として当科で以前より用いている HIV-1 を鋳型としたレンチウイルスベクター作成系に C19ORF10-FLAG cDNA を用い、組み換えレンチウイルスベクターを作製する。

(2) C19ORF10 の *in vitro* 実験

- 上記ウイルスベクターを培養細胞系に導入してその発現について *in vitro* で検討する。
発現の確認には mRNA level で RTD-PCR、蛋白 level で抗 FLAG 抗体を用いた培養上清・細胞溶解液のウエスタンブロットにて確認する。
- 遺伝子導入に伴う変化に関しては MTT/soft agar/invasion assay 等にて検討し、その結果表現型に変化が見られた場合には、FACS analysis による DNA content の評価やウエスタンブロットにて細胞内シグナルの変化を検討する。
- C19ORF10 特異的 ShRNA を作製し、高発現が確認されている肝癌細胞株に導入。その結果表現型に変化が見られた場合には、上記と同様に FACS analysis による DNA content の評価やウエスタンブロットにて細胞内シグナルの変化を検討する。
- 表現型変化の原因・結果、細胞内シグナル変化を網羅的に解析する目的でマイクロアレイ法を用いた遺伝子(パスウェイ)解析を行う

(3) C19ORF10 の *in vitro* で FLAG fusion 蛋白精製

- C19ORF10-FLAG アデノウイルスベクターを HEK293 細胞の培養細胞系に導入、48~72 時間後の培養上清・細胞溶解液を回収し、FLAG アフィニティゲルカラムを用いて精製。
- 精製蛋白は濃度測定を行い、クマジー染色および抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットにて目的蛋白であることを確認する。

平成 24 年度以降

(1) FLAG fusion 蛋白精製を用いた抗 C19ORF10 抗体およびハイブリドーマ樹立

- 精製蛋白を免疫用抗原とし、Balb/c マウス等に免疫を行った後、血清を採取しアフィニティ精製を行う。
- ハイブリドーマの樹立として PEG1500 を用いた PEG 法によりマウスミエローマ細胞 P3U1 と細胞融合を行い、脾臓、およびリンパ節よりリンパ球を採取。
24well のプレートにて選択クローンを培養し、限界希釈法によりクローニングを行う。

(2) 抗 C19ORF10 抗体を用いた ELISA 系の確立および肝癌患者血清中の C19ORF10 濃度の測定

- 上記にて作製したモノクローナル抗体を用いた ELISA プレートを作製し、同意の得られた肝癌患者ならびに健常人血清中の C19ORF10 濃度を測定し、新規腫瘍マーカーとしての可能性を検討する

(3) C19ORF10 の *in vivo* 実験

- HuH7 細胞肝移植ヌードマウスモデルを用い、C19ORF10 特異 ShRNA および抗 C19ORF10 抗体を投与し抗腫瘍効果について検討する。
- *in vitro* の系と同様に FACS analysis による DNA content の評価やウエスタンブロットにて細胞内シグナルの変化、ならびに表現型変化の原因・結果、細胞内シグナル変化を網羅的に解析する目的でマイクロアレイ法を用いた遺伝子(パスウェイ)解析を行い、生体内での C19ORF10 分子の機能を解析検討する。
- ShRNA および抗 C19ORF10 抗体濃度および投与方法(皮下・経静脈・肝腫瘍直接投与)を変更し、これらの組み合わせについて検討する。
治療後の組織についても病理学的検討を行う。
また治療開始後の肝障害の有無についてもマウスの経時的採血にて検討する。

4. 研究成果

今回、我々は SAGE ライブラリーを用いた網羅

的遺伝子解析による肝細胞癌治療における新規分子標的を同定した。SAGE法により発現遺伝子を定量的に同定し肝細胞癌では正常肝と比較し12倍もの発現亢進している未知遺伝子C19ORF10のフルクローニングに成功した。C19ORF10は分子量17kDaの分泌蛋白をコードしておりC19ORF10の強制発現では肝癌細胞株の増殖能亢進を、C19ORF10遺伝子Knock downでは著明な細胞増殖抑制を認めた。C19ORF10FLAG fusion蛋白の上清添加により用量依存性に癌細胞増殖は亢進し、抗C19ORF10特異抗体の上清添加によりその癌細胞増殖は抑制された。C19ORF10による細胞増殖の機序はPI3K/AktおよびMAPK/Erk1/2を介した細胞周期をG1期からS期へ移行させることをWestern Blotで確認した。この結果を論文文化しInternational Journal of Cancerに投稿し、第129巻第7号1576-85頁に掲載された。更に、ヒト肝癌患者血清においてC19ORF10の新規腫瘍マーカーならびに分子標的治療ターゲットの可能性を探究する目的でC19ORF10精製蛋白を免疫用抗原とし家兎への免疫を行い、血清を採取しFLAGアフィニティークロマトグラフィーにてポリクローナル抗体生成を行い、ELISAプレートを作成し、ヒト肝癌患者血清中のC19ORF10血清濃度測定の実用性への検討を行った

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)

Takeshita Y, Takamura T, Honda M, Kita Y, Zen Y, Kato K, Misu H, Ota T, Nakamura M, Yamada K, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 査読有, May;57(5) 2014 878-90

DOI. 10.1007/s00125-013-3149-9.

Terashima T, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Kitahara M, Nakagawa H, Kagaya T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. *Hepatol Res*. 査読有, Oct 31 2013 1-7 DOI. 10.1111/hepr.12266.

Ueda T, Honda M, Horimoto K, Aburatani S, Saito S, Yamashita T, Sakai Y, Nakamura M, Takatori H, Sunagozaka H, Kaneko S. Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. *Genomics*.

査読有, Apr;101(4) 2013 238-48 DOI. 10.1016/j.ygeno.2013.02.007

Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Arihara F, Kagaya T, Yamashita T, Fushimi K, Kaneko S. Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 査読有, Apr;57(4) 2013 1448-57 DOI. 10.1002/hep.26153.

砂子阪 肇, 山下 竜也, 北原 征明, 荒井 邦明, 金子 周一肝深部病変に位置する肝腫瘍に対する脈管損傷を回避するRFAの工夫, *医学と薬学*, 査読有 70巻2号 2013 245-48

Takeshita Y, Takamura T, Inoue O, Okumura, Kato K, Sunagozaka H, Arai K, Misu H, Nakamura M, Nakanuma Y, Kaneko S. Slowly progressive insulin-dependent diabetes in a patient with primary biliary cirrhosis with portal hypertension-type progression. *Intern Med*. 査読有, 51(1), 2012 79-82

Takeshita Y, Takamura T, Kita Y, Ando H, Ueda T, Kato K, Misu H, Sunagozaka H, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Beneficial effect of branched-chain amino acid supplementation on glycemic control in chronic hepatitis C patients with insulin resistance: implications for type 2 diabetes. *Metabolism*. 査読有, 61(10) 2012 1388-94 DOI.10.1016/j.metab

Okada H, Honda M, Campbell JS, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Sunagozaka H, Tanaka T, Fausto N, Kaneko S. Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. *Cancer Res* 査読有, 72(17) 2012 4459-71. DOI.10.1158/0008-5472.CAN-12-0028.

Yamashita T, Arai K, Terashima T, Sunagozaka H, Shimakami T, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Honda M, Kaneko S. A case report of S-1 monotherapy for advanced hepatocellular carcinoma *Gan To Kagaku Ryoho*. 査読有, 39(9) 2012 1435-7

[学会発表](計7件)

Hajime Sunagozaka, Taro Yamashita,

Naoki Oishi, Takehiro Hayashi, Hajime Takatori, Tetsuro Shimakami, Kazuya Kitamura, Kuniaki Arai, Takashi Kagaya, Yoshio Sakai, Tatsuya Yamashita, Eishiro Mizukoshi, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Serum Dickkopf-1 as a biomarker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma with stem cell features, 第 64 回米国肝臓学会, 2013 年 11 月 05 日, Washington D.C (USA)

砂子阪 肇, 山下 太郎, 金子 周一, 肝細胞癌における血清 Dickkopf-1 の新規バイオマーカーとしての可能性, 第 17 回日本肝臓学会 (JDDW2013), 2013 年 10 月 09 日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)

砂子阪 肇, 山下 太郎, 金子 周一, 肝癌サーベイランスにおけるバイオマーカーの再評価 肝細胞癌における血清 Dickkopf-1 の新規バイオマーカーとしての可能性, 第 49 回日本肝臓学会, 2013 年 07 月 11 日, 京王プラザホテル (東京)

砂子阪 肇, 山下 竜也, 荒井 邦明, 堀井 里和, 飯田 宗穂, 北原 征明, 大石 尚毅, 鷹取 元, 島上 哲朗, 北村 和哉, 加賀谷 尚史, 山下 太郎, 酒井 佳夫, 水腰 英四郎, 金子 周一, ソラフェニブ治療後症例に対する肝動注化学療法安全性と有効性に関する検討, 第 8 回日本肝がん分子標的治療研究会 2013 年 06 月 22 日, 和倉温泉「加賀屋」(石川)

Hajime Sunagozaka, Tatsuya Yamashita, Kuniaki Arai, Shuichi Kaneko, Efficacy and safety of sorafenib treatment in patients with hepatocellular carcinoma: a multi-center retrospective study in Japan, 第 63 回アメリカ肝臓学会, 2012 年 09 月 17 日, ボストンコンベンションセンター (USA)

砂子阪肇 山下竜也 荒井邦明 金子周一, 異なる画像所見を呈する多血結節を造影超音波にて比較鑑別できた C 型慢性肝炎の一例, 第 33 回超音波医学会中部地方会, 2012 年 09 月 09 日, 愛知医科大学 (愛知県)

砂子阪肇 山下竜也 荒井邦明 金子周一 肝細胞癌に対する経皮的ラジオ波焼灼療法の初発・再発時肝予備能に関する検討, 第 48 回肝臓総会, 2012 年 06 月 08 日, ホテル日航金沢 (石川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂子阪 肇 (SUNAGOZAKA Hajime)

金沢大学 大学病院 助教

研究者番号: 90595836

(2) 研究分担者

該当者無し

(3) 連携研究者

該当者無し