

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390366
 研究課題名（和文） 肝癌の網羅的遺伝子および蛋白解析に基づく新規診断と創薬の研究開発
 研究課題名（英文） Development of new diagnostic markers and drug based on comprehensive search of gene and protein in hepatocellular carcinoma
 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：肝癌の新規診断と創薬の研究を行った。新規診断では、カスタムチップおよび定量的 PCR による肝切除後早期再発予測システムを開発した。タンパク診断では、肝癌の新たなマーカーとして 3 種類（HSP70、PRX、Mn-SOD）の自己抗体を検出できた。創薬としては、ID2 遺伝子および ENO1 タンパクが標的になること、さらには ID2 発現が HDAC 阻害剤の分子マーカーとなることを発見した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2007 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

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、ゲノム、マイクロアレイ、プロテオーム、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

肝癌は原因となる肝炎ウイルス感染者の増加により、世界各地でその発生の増加が認められている。2001 年の統計では世界で 1 年間に 56 万例の肝癌が新たに発生し(Parkin DM, et al. Int J Cancer 2001;94:153-6)、日本では毎年 2 万人が肝癌に罹患している(第 16 回全国原発性肝癌追跡調査報告)。肝癌の治療は、肝切除、肝移植、Ablation 療法、PEIT、TAE、化学療法があげられるが、少なくとも 2cm 以上の肝癌は切除が最も有効な治療法とされる。一方、肝切除例の短期再発(術後 1 年以内)は約 30%とされ、短期再発例の予後は極めて不良である。そこで肝

切除後の短期再発を予測することにより、術後治療を追加することで予後の改善を図ることが可能となる。また、肝癌に特異的な蛋白発現があることも既に報告しており(Proteomics, 2003)、肝癌に関する遺伝子および蛋白データベースを独自に構築することが出来た。そこで、これらの研究経過を基盤に、肝癌に対する新たな診断法および創薬の開発に取り組む構想に至った。

2. 研究の目的

肝癌の遺伝子マイクロアレイ解析および 2 次元電気泳動より得られた蛋白解析からなる独自のデータベースを基盤に、

(1) 肝癌の術後再発予測診断システムを構築し、遺伝子ならびに蛋白チップを作成する。
 (2) 転移に関連する遺伝子および蛋白を独自に開発した統計的パターン認識により選択、同遺伝子あるいは蛋白の生物活性を *in vitro* で確認し、分子標的を同定し、創薬の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 肝癌の新規診断システムの開発

①遺伝子診断

既に同定している肝癌切除後早期再発に関連する 12 遺伝子をチップに搭載して、診断システムを構築する。さらに、定量的 RT-PCR での診断能についても検討する。

②タンパク診断

肝癌組織より蛋白を抽出、2次元電気泳動法にて蛋白をメンブランに転写し、抗 IgG 抗体と共に患者血清を同メンブランに流し、反応するスポットを自己抗体ありと判定する。同スポットを質量分析解析にて同定する。同定した自己抗体の発現率を、健常者、ウイルス肝炎・肝硬変患者、肝癌患者で比較し、肝癌患者の診断に有用な自己抗体を同定する。

(2) 肝癌における創薬研究

①遺伝子研究

ID2 (Inhibitor of DNA binding) 遺伝子の肝癌悪性度の関連を明らかにするため、*ID2* mRNA 発現を real-time PCR にて測定し、臨床病理学的因子との関連を検討する。ヒト肝癌細胞株にて *ID2* 遺伝子を knock-down して、浸潤能および VEGF および HIF-1 α のタンパク発現を測定する。

ヒト HCC 細胞株である HuH-7 及び HLE 細胞株を使用して実験を行った。抗癌剤については、新規抗癌剤であるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 [Sodium butyrate (NaB), Sodium 4-phenylbutyrate (NaPB), Trichostatin A (TSA), Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), MS-275, Apicidin, and HC-toxin] と、一般的に治療に使用されている抗癌剤である 5-Fluorouracil, Cisplatin, Docetaxel, Etoposide を使用した。*ID2* 発現と抗癌剤感受性との相関を解析するために、*ID2* 安定強制発現株や *ID2* ノックダウン細胞を構築し、これに抗癌剤を添加してから 2 日または 3 日後の細胞生存率を MTS アッセイにより測定した。細胞死に関する解析は、アネキシン V・PI・ヘキスト染色、cell cycle の解析は flow cytometry により行う。アポトーシス関連遺伝子 (*Bcl-2* and *Bcl-xL*) の発現解析は、real-time PCR により行う。

②タンパク研究

プロテオミクス解析にて肝癌で高発現している、解糖系酵素 alpha-enolase (EN01) 遺伝子について、治療標的の可能性について検討

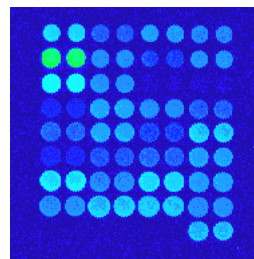
する。肝癌 46 例の EN01 遺伝子発現を、real-time RT-PCR を用いて検討する。ヒト肝癌細胞株を用いて、EN01 を knock-down し、Hoechst 33342 と propidium iodide による染色を行い、生細胞を測定する。また、マイクロアレイデータから解糖系酵素のクラスタリングを行う。

4. 研究成果

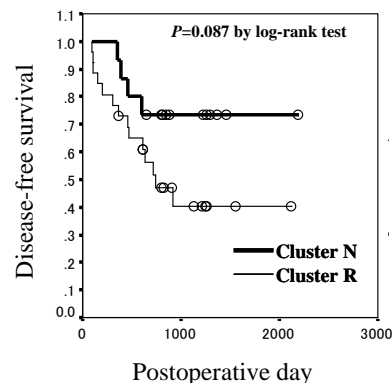
(1) 肝癌の新規診断システムの開発

①遺伝子診断

既に報告した肝切除後早期再発に関連する 12 遺伝子と新たに 18 遺伝子、さらには 3 つのコントロール遺伝子 (*GAPDH*, *ACTB* and *SART3*) のプローブを作成し、ダイヤモンド・ライク・カーボン (DLC) にて作成したチップ上にスポットすることで、カスタムチップを作成した。43 例の肝癌サンプルから RNA を抽出し、作成したカスタムチップにて各遺伝子の発現量を測定した。定量的 PCR にて、3 遺伝子 (*HLA-DRA*, *VIM*, *LAPTM5*) を測定し、カスタムチップの性能を確認したところ、PCR の結果とカスタムチップの結果が有意に相関しており、今回作成したカスタムチップの良好な性能が確認された。



図：カスタムチップのシグナルパターン代表例

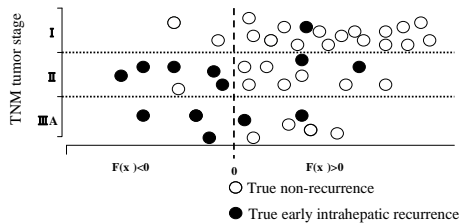


図：カスタムチップにて clustering した 2 群間の予後比較

カスタムチップの結果をクラスター解析し、早期再発群 (cluster R) と非再発群 (cluster

N) にわけ、2つの群で生存率と無再発生存率を比較したところ、cluster R 群はいずれも低値であった。今回開発したカスタムチップは、再発のみならず予後予測にも有用であることが判明した。

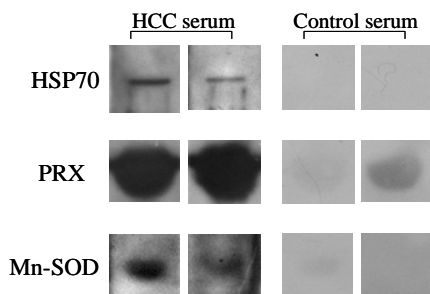
肝癌肝切除後の早期再発予測を、定量的 PCR にて検討した。肝癌 39 例にて、早期肝癌に関連する 6 遺伝子 (VIM、TRIM22、TNFAIP3、HLA-DRA、DDX17、LAPTM5) 発現を測定し、GAPDH 遺伝子との発現比率を算出た。6 遺伝子での組み合わせで最も早期再発を予測する組み合わせは、HLADRA、DDX17、LAPTM5 の 3 遺伝子であった。Fisher linear classifier にて数式を構築し、マイナス値であれば早期再発と予測した。数式は、 $F(x) = 9.783538 \times \text{HLA-DRA} + 8.288929 \times \text{DDX17} - 1.684217 \times \text{LAPTM5} - 1.547365$ である。新たな肝癌 43 症例で、本数式の精度を確認したところ、positive predictive value は 72.7%、negative predictive value は 84.4%、sensitivity は 61.5%、specificity は 90.0% と良好な結果を得られた。



図：3 遺伝子 (HLADRA、DDX17、LAPTM5) による再発予測の精度 (43 例)

②タンパク診断

ploteomex 法により、肝癌患者 15 例、健常者 20 例を対象として、血清中の自己抗体について測定した。肝癌組織、非癌部組織、正常肝組織からタンパクを抽出し、2 次元電気泳動を行い、それぞれに患者血清または健常者血清を添加し、肝癌タンパクと血清が反応するスポットを検出した。そのスポットを LC-MS/MS にて同定したところ、heat shock 70-kDa protein 1 (HSP70)、peroxiredoxin (PRX)、manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) が検出された。



図：検出された自己抗体

肝癌患者および健常者血清における各自己抗体の頻度は下記に示す如くであり、新たな肝癌腫瘍マーカーとして期待される。

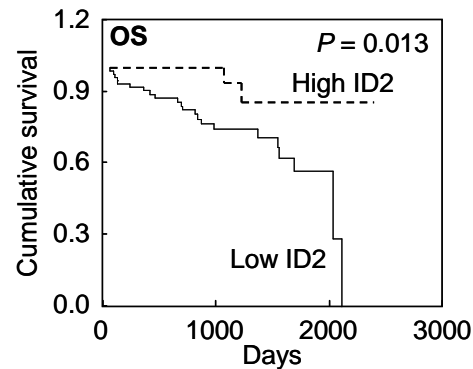
表：自己抗体の検出頻度

	HCC血清	健常者血清
HSP70	7/15	2/20
GAPDH	5/15	0/20
Mn-SOD	6/15	2/20

(2) 肝癌における創薬研究

①遺伝子研究

ID2 mRNA 発現が低くなると、門脈浸潤の増加、TNM stage の進行、サイズの増大、肝内転移の頻度増加に繋がった。特に、ID2 mRNA 発現低下例では無病生存率が著しく低下した。



図：ID2 mRNA 発現と肝癌の予後

表：HLE と HuH-7 の VEGF 産生

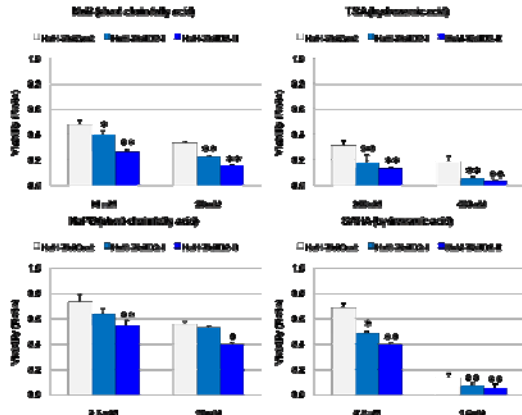
	VEGF(pg/μg)	Ratio
HLE/pcDNA3.1	16.68 ± 1.15	1.00
HLE/pID2-I	4.59 ± 0.43	0.28
HLE/pID2-II	6.82 ± 1.54	0.41
HuH-7/Cont	13.95 ± 0.72	1.00
HuH-7/ID2-si	19.61 ± 0.18	1.41

ID2 遺伝子を knock-down すると、浸潤能が増強し、VEGF および HIF-1α のタンパク産生は増加した。

以上より、ID2 遺伝子は肝癌の悪性度に強く関与しており、標的遺伝子として有用である。そこで、以下の検討を行った。

ヒト肝癌細胞株の ID2 強制発現株では mock

細胞よりも HDAC 阻害剤耐性となり、反対に *ID2* ノックダウン細胞ではコントロール siRNA 導入細胞よりも HDAC 阻害剤に対する感受性が増加した。しかし、HDAC 阻害剤以外の抗癌剤では *ID2* レベルと HDAC 阻害剤感受性との関連性はなかった。



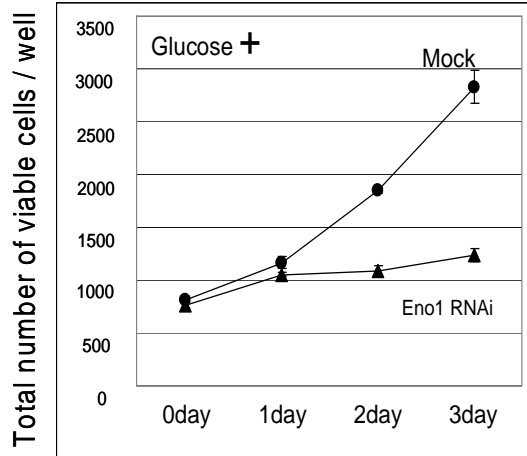
図：ID2 を Knock-down すると、HDAC 阻害剤に対する感受性が増加

アネキシン V・PI・ヘキスト染色の結果から、HDAC 阻害剤処理によって多くの細胞が後期アポトーシスを経て細胞死していることが確認された。*ID2* による HDAC 阻害剤感受性への影響と対応して、*ID2* が後期アポトーシス細胞への進展に関与していることが明らかとなった。また、*ID2* ノックダウン株では、アポトーシス抑制遺伝子 (*Bcl-2* and *Bcl-xL*) の発現誘導がコントロール siRNA 導入細胞に比べて低下していた。*ID2* 強制発現株では、*Bcl-2* 発現誘導が、mock 細胞に比べて上昇していた。HCC 細胞における *ID2* レベルは、HDAC 阻害剤に対する感受性と関連することが判明した。また、その分子機構として、*ID2* がアポトーシス抑制遺伝子の発現を変化させることにより、HDAC 阻害剤感受性を変化させていることが示唆された。以上より、HCC 治療において、*ID2* そのものが標的となり得ること、またその発現レベルが効果判定の予測マーカーとなり得ることが示唆された。

②タンパク研究

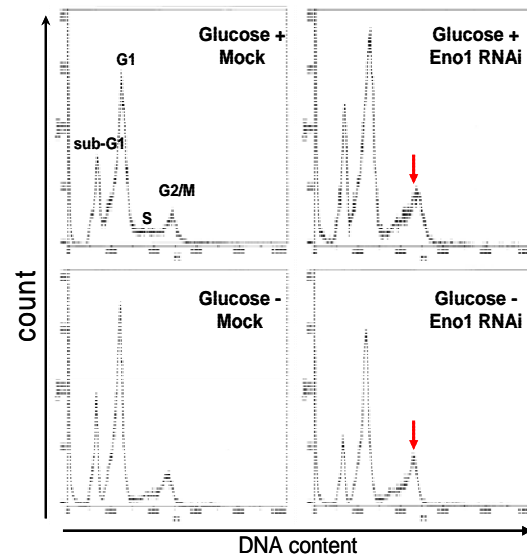
解糖系酵素 ENO1 が低分化肝癌で発現増強することをプロテオミクス解析にて発見した。そこで、ENO1 の機能解析を行った。まず、肝癌 49 例を対象に、ENO1 mRNA 発現を定量的 PCR にて測定したところ、進行度、門脈浸潤、大きさと発現量が正の相関を示すことが判明し、ENO1 高発現が悪性度に関連することを確認した。そこで、ヒト肝癌細胞株を用い、siRNA にて ENO1 を knock-down すると、グル

コース存在下および非存在下のいずれにおいても細胞増殖が抑制された。



図：肝癌細胞株増殖における ENO1 の knock-down の影響

さらに、cell cycle を測定すると、ENO1 の knock-down により S 期の減少と、G2/M 期の増加を認め、ENO1 遺伝子は糖代謝だけでなく細胞増殖に関与していることが明らかとな



った。

図：肝癌細胞株 cell cycle における ENO1 の knock-down の影響

また、肝癌における解糖系酵素群の発現について、マイクロアレイ解析データから検討した。その結果、解糖系酵素群の上位遺伝子である HIF-1 α が同定され、同遺伝子発現増強が予後不良に結びつくことが確認され、今後の研究課題とする。

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 22 件)

- ① Hamaguchi T, Iizuka N, Tsunedomi R, Hamamoto Y, Miyamoto T, Iida M, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Takashima M, Tamesa T, Oka M. Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor α is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 33:725-731, 2008. 査読有り
- ② Iizuka N, Oka M, Tsunedomi R, Hamamoto Y. Translational microarray systems for outcome prediction of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 99:659-665, 2008. 査読有り
- ③ Somura H, Iizuka N, Tamesa T, Sakamoto K, Hamaguchi T, Tsunedomi R, Yamada-Okabe H, Sawanura M, Eramoto M, Miyamoto T, Hamamoto Y, Oka M. A three-gene predictor for early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Oncology Rep.* 19:489-495, 2008. 査読有り
- ④ Tsunedomi R, Iizuka N, Yamada-Okabe H, Tamasa T, Okada T, Sakamoto K, Takashima M, Hamaguchi T, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y, Oka M. ID2 Expression is Associated with a Risk of Hepatocellular Carcinoma Progression. *Clin Cancer Res.* 14:1025-1031, 2008. 査読有り
- ⑤ Tsunedomi R, Iizuka N, Yamada-Okabe H, Tamesa T, Okada T, Sakamoto K, Takashima M, Hamaguchi T, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y, Yamada M, Oka M. Identification of ID2 associated with invasion of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma by gene expression profile. *Int J Oncol.* 29:1445-1451, 2006. 査読有り
- ⑥ Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Fujimoto M, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Proteomic analysis of autoantibodies in patients with hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 6:3894-3900, 2006. 査読有り

[学会発表] (計 31 件)

- ① 恒富亮一. Influence of the *ID2* on the anti-tumor activity of histone deacetylase inhibitor in hepatocellular carcinoma cells. The 19th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2009年2月14日、

香港

- ② 小川恭司. Possible new biomarkers for diagnosis of early hepatocellular carcinoma. 第31回日本分子生物学会年会. 2008年12月11日、神戸
- ③ 原田紗和子. 肝細胞癌における ID2 レベルとヒストンデアセチラーゼ阻害剤. 第67回日本癌学会学術総会. 2008年10月28日、名古屋
- ④ 飯塚徳男. 解糖系モジュールと肝細胞癌(HCC)の進展. 第19回日本消化器癌発生学会総会. 2008年8月29日、大分
- ⑤ Tsunedomi R. Relation of ID2 level to prognosis and metastatic potentials of hepatocellular carcinoma. 15th European Gastroenterology Week. 2007年10月27日、フランス：パリ
- ⑥ 蘇村秀明. 肝癌細胞の早期肝内再発に対するリアルタイム RT-PCR を応用した予測システムの開発. 第45回日本癌治療学会総会. 2007年10月24日、京都
- ⑦ 飯塚徳男. カスタムメイドアレイによる肝癌再発予測. 第66回日本癌学会学術総会. 2007年10月5日、横浜
- ⑧ 恒富亮一. ID2 is Associated with Progression of HCV-related Hepatocellular Carcinoma. 第66回日本癌学会学術総会. 2007年10月5日、横浜
- ⑨ 蘇村秀明. リアルタイム RT-PCR 法を用いた肝細胞癌の術後早期肝内再発予測. 第62回日本消化器外科学会. 2007年7月19日、東京
- ⑩ 濱口卓士. 肝癌進展における解糖系酸素群の発現パターン. 第16回日本癌病態治療研究会. 2007年6月27日、東京
- ⑪ 宮本貴宣. 多群対応 Fisher 比を用いた遺伝子選択によるマクロアレイデータの可視化. 第65回日本癌学会学術総会. 2006年9月29日、横浜
- ⑫ 恒富亮一. ID2 発現はHCV陽性肝細胞癌の門脈浸潤に関連する. 第65回日本癌学会学術総会. 2006年9月29日、横浜
- ⑬ 高島元成. 肝細胞癌のプロテオーム解析と臨床応用. 日本ヒトプロテオーム機構第4回大会. 2006年9月29日、横浜
- ⑭ 高島元成. 肝細胞癌のプロテオーム解析と臨床応用. 第61回日本消化器外科学会総会. 2006年7月13日、横浜
- ⑮ Hamaguchi T. Dual functions of Enol on Vizibility and proliferation of hepatocellular carcinoma cells according to glucose concentration. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. 2006年6月22日、京都
- ⑯ Tsunedomi R. ID2 as a possible gene involved in invasion of hepatitis C

virus-related hepatocellular carcinoma.
20th IUBMB International Congress of
Biochemistry and Molecular Biology.
2006年6月22日、京都

⑰恒富亮一. 肝細胞ガンにおけるID2発現
と転移・浸潤能. 第42回日本肝臓学会総
会. 2006年5月25日、京都

⑱Tsunedomi R. ID2 as a possible gene
involved in invasion of hepatitis C
virus-related hepatocellular carcinoma.
American Association for Cancer
Research 97th Annual Meeting. 2006年4
月3日、米国

⑲Miyamoto T. Supervised visualization of
microarray data by statistical pattern
recognition. American Association for
Cancer Research 97th Annual Meeting.
2006年4月3日、米国

[図書] (計3件)

①吉村 清、岡 正朗. 消化器外科学レビュ
ー2009. 総ページ数270、総合医学社

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 正朗 (OKA MASA AKI)

山口大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 70144946

(2) 研究分担者

中村 和行 (NAKAMURA KAZUYUKI)

山口大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 90107748

飯塚 徳男 (IIZUKA NORIO)

山口大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 80332807

(3) 連携研究者

なし