

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 21 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2011

課題番号：20590376

研究課題名（和文）

肝細胞がんの発生・進展に関連する責任遺伝子の同定

研究課題名（英文）

Identification of responsibility gene that relates to occurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma

研究代表者

鹿 智恵（LU TOMOE）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：10408453

研究成果の概要（和文）：

本研究においては、8p22-23 の欠損が、肝細胞がんの発生およびその後の進展、特に転移過程に関連するということを明らかにした。一部の結果は、NIH の Genetic Alteration in Cancer データベースに収録された。これを基にし、候補遺伝子を選出し、遺伝子解析を行った結果、いずれも肝発がんとの関連性が示されなかった。一方、がん幹細胞のマーカーと思われる PROM1 について、肝細胞がんの発生過程において、がん抑制遺伝子としての働きのあることを新たに見出した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we demonstrate that deletion of 8p22-23 is not only an important event in the initiation and/or promotion of hepatocellular carcinoma, but also closely associated with subsequent progression, especially during metastasis. The part of results was collected in Genetic Alteration in Cancer database of NIH. On the other hand, we found that PROM1, which was usually recognized as a marker of cancer stem cell, might be have a function as tumor suppressor gene in the hepatogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
総 計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肝細胞がん、遺伝子、分子病理

1. 研究開始当初の背景

- 近年、原発性肝細胞がんの発症率・死亡率が著増してきた。2000年の年間新規患者数は56万人を超え、10年前の43万人より30%ほど大幅に増加している (Pisani, *Int. J. Cancer* 2002; Bosch, *Gastroenterology* 2004)。そして、今後も増加の傾向が続くことが予測される。全世界の肝細胞がんの80%以上は、日本を含むアジア、アフリカ地域に集中している。肝細胞がんは、肝炎ウイルスの感染や肝硬変を背景とする症例が多く、再発・転移しやすいことで、5年生存率が低いがんの一つとして注目されている。
- 従来は、ウイルス学的アプローチからウイルス遺伝子そのものによる発がん機構および炎症や線維化のアプローチから発がんとの進展の分子機構が研究され続けてきた。しかし、肝細胞がん発生のメカニズムは、未だに解明されていない。ヒトゲノムの塩基配列が決定されて以来、多くのがんについて分子レベルで解析がされている。肝細胞がんの発生・進展は、他の臓器のがんと同じように、がん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活化など多種類の遺伝子変化が多段階的に関与する複雑な進行過程であることが推測されている。特に、染色体領域の欠失と関連するがん抑制遺伝子の不活化が肝発がんにおいて、最も重要な役割を果たしていると考えられる。
- 今まで、候補遺伝子として、幾つかのがん抑制遺伝子がクローニングされた。しかし、その後の解析では、肝細胞がんとの関連性が示されなかったことから、肝細胞がんの発生に関連する真の責任遺伝子は、他に存在する可能性が示唆された。一方、CGH法やFISH法などにより全染色体領域を網羅的に検索した結果、多くの悪性腫瘍において、最も多く認められた欠失領域は8p、13qであることが数多く報告された。これらの領域には既知の遺伝子以外に未知の責任遺伝子の存在が想定される。
- 最近まで、我々は8pを焦点に絞って、詳細に解析した結果から、肝細胞がんの発生およびその後の進展、特に転移過程に関連する候補がん抑制遺伝子

が狭い領域—8p22-23 (Lu et al., *World J Gastroenterology* 13: 1090-1097, 2007; Lu et al., *Liver International* 27: 782-790, 2007) に存在する可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究は、原発性肝細胞がんを対象とし、8番染色体短腕領域にあるマイクロサテライトマーカーにてLOH解析を行い、肝細胞がんの発生・進展に最も関連する染色体領域を選出し、最終的には候補領域に存在する責任がん抑制遺伝子を同定することを目的とする。そのために、

- まず、原発性肝細胞がんを検索対象とし、8番染色体短腕領域にあるマイクロサテライトマーカーにてLOH解析^注を行う。LOH頻度と病理組織学的ならびに臨床病理学的所見の関連性を検討し、肝細胞がんの発生・進展に最も関連性がある候補領域を探し出す。

^注LOH (loss of heterozygosity)

概念： がん細胞においては、がん抑制遺伝子の野生型対立遺伝子が何らかの原因で変異型の対立遺伝子と置き換えられ、その結果 DNA 多型が失われる状態をヘテロ接合性の消失 (LOH) と呼ぶ。

意味： 特定の種類のがんにおける特異的な染色体多型マーカーを有するため、高頻度にLOHを示すDNA多型マーカーを特定することにより、がん化原因となるがん抑制遺伝子の喪失を突き止めることができる。

- 次に、高頻度にLOHを認めた候補領域に存在する *DLC1* (8p)、*DLC2* (13q) を含む既知の遺伝子を選出し、PCR-SSCP法およびSequence法など分子生物学的な手法により遺伝子解析を行う。遺伝子変異の有無と肝細胞がんとの関連性について検討することで、候補がん抑制遺伝子を探し出す。
- さらに、候補がん抑制遺伝子のタンパクの発現やmRNAの発現を検討する。このように候補がん抑制遺伝子の構造異常と機能異常の有無を同時に解析することで、肝細胞がんの発生・進展に関連する責任遺伝子を突き止める。
- 将来計画として変異を見出した候補遺伝子の働きを確認するために培養細胞もしくはヌードマウス可移植株を用いて遺伝子導入を視野に入れる。また、分子病理学

的診断や分子標的薬の target としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

①【候補領域の同定】

- サンプルの収集
原発性肝細胞がんの外科手術や剖検材料により得られたホルマリン固定・パラフィン包埋した組織標本からがん部、非がん部および正常組織をマイクロダイセクション法により切除する。採取された組織から通常の方法でDNA・RNA抽出を行い、サンプルとして下記の解析に使う。
- マーカーの選出
候補領域8番短腕染色体領域（8p）にある既知のマイクロサテライトマーカーから、日本人肝細胞がん患者におけるヘテロ接合型のDNA多型マーカーを選出し、informative markerとしてPCR-LOH解析に使う。
- PCR-LOH解析
病変毎に収集された肝細胞がんを検索対象とし、候補領域から選出された多型マーカーにて、PCR-LOH法により高頻度にヘテロ接合性の消失（LOH）が発生した領域を突き止める。LOH 頻度と病理組織学的ならびに臨床病理学的所見の関連性を検討し、肝細胞がんの発生・進展に最も関連性がある染色体領域を候補領域として探し出す。
- aCGH解析
高頻度にLOHを認めたサンプルについて、array CGH (comparative genetic hybridization) 法により、候補領域を再確認する。CGH法とLOH法については、それぞれ検出感度が低いと偽陽性が高いという弱点がある。両方を使って同じサンプルを解析することで、お互いの弱点が克服できるため、より精確に候補遺伝子を突き止めることができる。

②【候補遺伝子の同定】

- 候補遺伝子の構造解析
LOH解析結果に基づき、候補領域8p22-23から既知の遺伝子として、*DLC1* (*deleted in liver cancer 1*)、*DBC2* (*deleted in breast cancer 2*)、*MTUS1* (*mitochondrial tumor suppressor 1*)などを含む幾つかの候補遺伝子を選出し、通常のPCR-SSCP法、Sequence法などにより遺伝子変異の有無を解析する。

- 候補遺伝子の機能解析
選出された候補遺伝子に対する特異的に反応する抗体を作製し、免疫組織化学的手法により肝細胞がんにおける候補遺伝子のタンパクの発現を検討する。同時に同じサンプルにおいて、候補遺伝子のmRNA発現の変化を解析する。

➤ 候補遺伝子の同定

上記のように、候補遺伝子について構造異常と機能異常の有無を解析することで、最終的に肝細胞がんに関連する責任遺伝子であるかどうかを明らかにする。将来計画として変異を見出した候補遺伝子の働きを確認するために、培養細胞もしくはヌードマウス可移植株を用いて遺伝子導入を視野に入れる。また、分子病理学的診断や分子標的薬のtargetとしての可能性を模索する。

4. 研究成果

- 本研究は、肝細胞がんの発生・進展に関連する責任がん抑制遺伝子を同定することを最終目的とする。そのために、原発性肝細胞がんを検索対象とし、8番染色体短腕領域にある DNA 多型マーカーにて網羅的にマイクロサテライト解析を行い、高頻度に欠損を示す染色体領域を選出した。それから、当該領域から候補遺伝子を選出し、詳細な遺伝子解析を行った。その結果から、肝細胞がんの発生およびその後の進展過程との関連性を検討し、責任遺伝子であるか否かを検討した。
- 研究期間の前半は、外科手術により得られた通常ホルマリン固定・パラフィン包埋した早期段階の肝細胞がんおよび病理解剖により得られた遠隔転移を伴う進行型肝細胞がん合計 105 症例（206 病変）を検索対象とした。各症例において、未染色パラフィン切片からがん部・非がん部および正常組織をマイクロダイセクション法により切除した。採取された組織から DNA 抽出を行い、8p21-23.2 にある 63 のマイクロサテライトマーカーから、日本人においてヘテロ接合型である 18 マーカーを選出し、通常の PCR 法によりヘテロ接合性の消失（LOH）を検索した。その結果、早期段階の肝細胞がんおよび進行型肝細胞がんにおいて、それぞれ 68%と 69%の高頻度で LOH が認められた。更に、原発巣より転移巣あるいは早期がんより進行がんにお

いて、より多くの LOH が観察されたことから、肝細胞がんの発生と転移過程に関連する複数の遺伝子が 8p に存在する可能性が示唆された。

- 具体的には、早期段階の肝細胞がんにおいて、8p22-23.1 領域にある多型マーカー *D8S258*、*D8S1754*、*D8S1827* の LOH 頻度は、8p 全体の平均頻度より統計学的に有意に高く、肝細胞がんの発生と関連する責任遺伝子は、これら DNA 多型マーカーの近傍に存在することが示唆された。一方、進行型肝細胞がんにおいて、特に多型マーカー *D8S261*、*D8S262*、*D8S1819*、*D8S1109* の LOH 頻度は、早期段階の肝細胞がんより有意に高い傾向を示したことから、これら DNA 多型マーカーの近くに肝細胞がんの転移に関連する責任遺伝子の存在することが推測された。我々の解析結果は、真の責任遺伝子の同定には重要な意味があると考えられる。この結果の一部は、既に米国国立衛生研究所の Genetic Alteration in Cancer のデータベースに収録され、より多くの研究者に情報を提供した。
- この解析結果に基づき、研究期間の後半では、我々は肝細胞がんの発生と転移過程に関連する真の責任遺伝子を同定することを目指し、候補領域 8p22-23 から *DLCL1*、*DBC2*、*MTUS1* などを含む 10 数個の候補遺伝子を選出し、様々な手法を用いて挑戦的な研究を行ってきた。具体的には、まず Database に登録された遺伝子情報を参照し、各遺伝子のコード領域に対するプライマーを設定した。それから 20 症例の肝細胞がんを対象とし、通常の PCR-SSCP 法や Sequence 法によりそれぞれの遺伝子の塩基配列を検索した。その結果、いずれの遺伝子においても、有意な突然変異が認められなかったことから、これらの遺伝子が塩基配列の変化により直接的に肝細胞がんの発生に関与する可能性の低いことが示唆された。例外として、*MTUS1* には合計 6 ヶ所の塩基配列の変化が検出された。このため、4 種類の特異的なポリクロナール抗体を作製し、Western Blotting 法により抗体の特異性を確認した上で、免疫組織化学的手法により肝細胞がんにおける *MTUS1* タンパク質の発現様式を検討した。いずれ

の抗体も肝細胞ではなく、間質とのみ反応するという事実から、今回作製した抗体は異常なタンパク質を検討するには不適切であったと判断した。

- 最近、当講座にリアルタイム PCR システムが導入され、候補遺伝子の機能解析に関連する核酸の定量解析や染色体のコピー数まで解析することが可能となり、研究期間終了後も引き続き本研究を行う予定である。同時に、肝細胞がんとの比較研究を目的とし、原発性肺がんを検索した結果 8p の高頻度欠失が明らかとなり、発がん過程との関連性が肝細胞がんと同様であることが示唆された。従って、本研究の結果から、発がん過程には 8p22-23.1 の欠損が重要な役割を果たしていることが考えられ、今後各種がん疾患の病態解明のツールとして利用できることが期待される。
- 我々は、更に上記の結果を踏まえて、がん幹細胞マーカーとして報告された *PROM1* に着目し、次の様な研究を進めている。*PROM1* がヒトの正常肝細胞において胎児期から恒常的に発現していることを確認した上で、肝細胞がんを対象とし、*PROM1* タンパク質の発現様式を検討した。その結果、すべての肝細胞がん症例において、非がん部肝細胞よりがん細胞における *PROM1* タンパク質の発現減弱・減少が認められた。そのうち、75%の症例においてタンパク質の完全消失現象が観察された。この結果から、*PROM1* は、肝細胞がんの発生過程において、がん抑制遺伝子としての働きをもつ可能性があると考えられる。この結果を 3 つの演題に取り纏め、平成 24 年度の第 101 回日本病理学会で発表した。

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)

研究代表者：

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ① 鹿 智恵、羽野 寛。肝細胞癌の発生・進展に関連する 8 番染色体短腕領域のマイクロサテライト解析 東京慈恵会医科大学雑誌 査読有 124; 99-106 (2009)

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 鹿 智恵 他 ヒト胎児正常組織におけるがん幹細胞マーカー *PROM1* の発現様式

- 第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 28 日、東京
- ② 鹿 智恵 他 原発性肝細胞がんの発生・転移におけるPROM1 の関連性について 第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 27 日、東京
 - ③ 鹿 智恵 他。各種先天性疾患の肝臓におけるPROM1 タンパク質の発現と意義 第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 27 日、東京
 - ④ Tomoe Lu et al. Expression of PROM1 protein and mRNA in human fetal and adult tissues. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association p62, October 3, 2011, Nagoya
 - ⑤ Tomoe Lu et al. Allelic imbalance at 8p and 13q in lung cancer: difference between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association September 23, 2010, Osaka
 - ⑥ Tomoe Lu et al. Update of microsatellite analysis at 8p21-23.2 in hepatocellular carcinoma 第99回日本病理学会総会 2010年4月28日、東京
 - ⑦ 鹿 智恵 他。原発性肺癌の発生における 8 番染色体短腕領域の染色体変化と各組織型との関連 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日、東京
 - ⑧ Tomoe Lu et al. Chromosomal allelic imbalance at 8p22-23 regions associated with both carcinogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma. 21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. August 3, 2009, Shanghai
 - ⑨ 鹿 智恵 他。マイクロサテライト解析による原発性肺癌の発生に関連する責任遺伝子の検索 第 98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 2 日、京都
 - ⑩ Tomoe Lu et al. Lack of association between *DLC-1* genetic alteration and hepatocarcinogenesis. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 28 2008, Nagoya
 - ⑪ 鹿 智恵 他。肝細胞がんの発生における*DLC-1*の関連性について 第97回日本病理学会総会 2008年5月17日、金沢市
 - ⑫ 鹿 智恵 他。肝細胞がんの発生における*DLC1* の関連性について 第 97 回日本病理学会総会 2008 年 5 月 15 日、金沢市

〔その他〕
ホームページ等

本研究に関連する一部の解析結果は、米国立衛生研究所Genetic Alterations in Cancer データベース <http://www.niehs.nih.gov/research/resources/databases/gac/index.cf> に収録された。

6. 研究組織

研究代表者

鹿 智恵 (LU TOMOE)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：10408453