

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590772

研究課題名 (和文) 肝細胞癌における肝移植治療後の予後因子としての遺伝子メチル化の研究

研究課題名 (英文) Impact of gene silencing on the recurrence of hepatocellular carcinoma after living-donor liver transplantation

研究代表者

西村 貴文 (NISHIMURA TAKAFUMI)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：40378732

研究成果の概要 (和文)：生体肝移植は肝細胞癌の根治治療の一つであるが、本研究はがん抑制遺伝子のプロモーターメチル化による不活性化が再発予測に有用であるか否かを検討することを目的として行われた。50 例の癌および非癌肝硬変組織より DNA を抽出し、combined bisulfite restriction analysis 法により *APC*, *CDKN2A*, *HIC1*, *RASSF1A*, *GSTP1*, *RUNX3*, *PRDM2*, *SOCS1* のプロモーター領域を解析したところ、これらの領域のメチル化は非癌部に比べて明らかに癌部で高頻度に認められたが、肝細胞癌の再発との正の相関は認められなかった。

研究成果の概要 (英文)：This study was conducted to elucidate whether epigenetic silencing of tumor suppressor genes in the tumor predict the recurrence of hepatocellular carcinoma after living-donor liver transplantation. Tumor and non-tumor tissues were obtained from 50 patients and promoter methylations of *APC*, *CDKN2A*, *RASSF1A*, *HIC1*, *GSTP1*, *RUNX3*, *PRDM2*, and *SOCS1* were examined by combined bisulfite restriction analysis method (COBRA). Although higher levels of promoter methylation in tumor than non-tumor were noted, none of these were correlated to the recurrence of hepatocellular carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌に対する外科的治療として従来肝切除術が行われてきたが、肝両葉に腫瘍が多発する症例においては肝移植治療が唯一の根治治療である。しかし、肝内の腫瘍を根絶

しても術後に転移再発を来すことがありそのような症例の予後は不良である。欧米では脳死患者をドナーとする脳死肝移植が主流であるが、ミラノ基準 (単結節 5cm 以下または 3cm 以下 3 結節まで; 主要血管に侵襲がな

い；遠隔転移がない)を満たす症例は比較的前後が良好であり、ミラノ基準を超える症例では再発率が高いことが知られている

(Mazzaferro ら, *N Engl J Med* 1996; 334: 693-9)。一方本邦においては生体肝移植が主流であるため、脳死肝移植に比べてドナーの候補が見つかる場合が多く、適応の拡大が期待される。当院肝胆膵移植外科では従来より、肝内に腫瘍が限局している症例では腫瘍径・結節数にかかわらず、主要血管侵襲や遠隔転移が認められない場合には原則的に適応として肝移植治療を行ってきた。2004年までの93例の治療成績においては、予想されるようにミラノ基準を超える症例ではミラノ基準内の症例に比べてやはり再発率が高いものの(35% vs 15%)、4年生存率は59%であり、ミラノ基準外の症例においても肝移植治療により長期生存が期待できる症例が約6割存在することが示された(Takada ら, *Liver Transpl* 2006;12:912-9)。一方でミラノ基準内の症例においても再発が認められているため、このような転移再発を術前に予測することは肝移植治療の適応決定の上で極めて重要である。

外科的根治術後の転移再発の予後因子として腫瘍の生物学的悪性度が挙げられるが、その評価方法は形態的診断のみならず分子病理学的な診断にも基づく必要がある。我々は従来より肝細胞癌のゲノム異常について詳細に解析を行ってきたが、中でもTP53遺伝子変異(Nishida ら, *Cancer Res* 1993;53:368-372)や特定の染色体領域の欠失や重複(以下染色体短腕をp, 長腕をq, 欠失を-, 重複を+とすると、-1p, +1q, -4q, -8p, +8q, -13q, -16q, -17pなど。Nishimura ら, *Cancer Genet Cytogenet* 2006;167:57-65)は高頻度に認められており、肝細胞癌の発生・進展に関わる重要な因子であると考えられる。このうち-16q, -17pは肝切除後の転移再発の予後不良因子であり、染色体欠失の多い症例では再発が多いことも我々の研究から示されている(Nishida ら, *Oncology* 2002;62:141-8.)。

肝移植治療後の転移再発の予後不良因子としてはFinkelstein らが-1p, -17p 或いはアレル欠失指数(Fractional Allelic Loss, FAL)高値を挙げている(*Hepatology* 2003;37:871-9)。また、TP53遺伝子変異も肝移植治療後の予後不良因子であるという報告もなされている(Guzman ら, *Mod Pathol* 2005;18:1498-1503)。

以上のような背景から我々は現在、移植治療を受けた肝細胞癌症例の網羅的染色体解析及びTP53遺伝子変異解析を行い、これらゲノム異常に基づいた転移再発の予測式を構築する探索的研究を行っている。

このように染色体異常やTP53遺伝子異常

は肝細胞癌の悪性度に関わる主要なゲノム異常であると考えられるが、一方でプロモーター領域のメチル化による遺伝子(特に癌抑制遺伝子)の不活化も癌に特徴的なゲノム異常として知られている。我々の肝細胞癌を用いた研究においてもAPC, GSTP1, CDKN2A, HIC1, CACNA1G, RUNX3, SOCS1などの遺伝子プロモーター領域のメチル化が高頻度に検出され、βカテニンの遺伝子変異との相関が認められることからこれらは肝発癌の一つの主要な経路と考えられている(Nishida ら, *Cancer Res* 2007;67:4586-94)。

## 2. 研究の目的

本研究はプロモーター領域のメチル化によるがん抑制遺伝子の不活化が肝移植後の肝細胞癌の予測因子として有用であるか否かを検討するために行われた。

## 3. 研究の方法

(1) 対象：対象は京都大学医学部附属病院肝胆膵移植外科において2004年4月から2010年3月までに生体肝移植治療を受けた症例のうち肝細胞癌を有するものとした。文書によるインフォームドコンセントを得たのち、手術時に病理部に提出された標本から癌組織および非癌部肝硬変組織を取得した。

(2) DNA抽出：DNA抽出はproteinase K-フェノール・クロロホルム法を用いた。

(3) 遺伝子プロモーター領域のメチル化の検出：Combined bisulfite restriction assay法を用いた。すなわち、ゲノムDNAをEpitect@Bisulfiteキット(キアゲン、東京)を用いてbisulfite処理することによりメチル化を受けていないCpGジヌクレオチドのシトシンをウラシルに変換し、標的領域をPCRにて増幅した後、制限酵素により切断し2%アガロース上で電気泳動した。これをGellLogic 200 Imaging System (Eastman Kodak Company, Rochester, NY)を用いて定量解析することにより制限酵素で切断されたCpGメチル化DNAに由来するPCR産物と制限酵素で切断されなかったCpG非メチル化DNA由来のPCR産物との比を算出した。

(4) ゲノム上の繰り返し配列のメチル化定量解析：ヒトゲノム上に高頻度に認められる繰り返し配列であるAlu, LINE1, Sat2領域のメチル化を定量するために、MethyLight法を行った。すなわち、StepOne™リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて、Bisulfite処理したDNAを鋳型とし、メチル化特異的プローブを用いてメチル化DNAのコピー数を定量解析した。

(5) 統計解析：癌部と非癌部のメチル化レベ

ルの比較には unpaired t test を用いた。再発までの期間 (Time to recurrence) に関する生存曲線を Kaplan-Meier 法を用いて推定し、各遺伝子におけるメチル化の有無を因子としてこれら生存曲線を Log-rank 法にて比較検討した。

#### 4. 研究成果

2004年4月より2010年3月までに京都大学医学部附属病院肝胆膵移植外科において生体肝移植を受けた肝細胞癌症例50例より検体を取得し解析を行った。

各癌抑制遺伝子におけるプロモーター領域のメチル化は非癌部肝硬変組織に比し癌部において明らかに高率に認められた(図1)。

2010年3月現在50例中6例に肝細胞癌の再発が認められた。これら再発した6例と再発を認めていない46例について各癌抑制遺伝子のメチル化率をt検定により比較したところ、再発症例に有意に高率にメチル化が検出されるがん抑制遺伝子は認められなかった。*SOCS1* 遺伝子についてはむしろ再発症例においてメチル化は低率であった( $p=0.02$ )。ゲノム上の繰り返し配列のメチル化については再発症例においてAlu配列の低メチル化が認められた( $p=0.018$ )。

次に再発までの期間 (Time to recurrence) を Kaplan-Meier 法を用いて推定し、癌抑制遺伝子のプロモーター領域の有無 (カットオフ値を20%とした) およびゲノム上の繰り返し配列のメチル化が高度に認められる症例と低い症例 (カットオフ値はそれぞれAluで60%, LINE1で40%, Sat2で30%とした) についてその差を Log-rank 検定を用いて比較検討した(図2)。*APC*, *RASSF1A* についてはメチル化を認める症例で再発が多い傾向が認められたが、統計学的有意差は検出されなかった(各々 $p=0.52$ ,  $p=0.44$ )。*HIC1*, *SOCS1* についてはむしろメチル化のない症例において再発が多く認められた(各々 $p=0.026$ ,  $p<0.001$ )。このことはこれらの遺伝子の低メチル化によって示される一部の予後の悪いサブグループの存在を示唆すると考えられた。

今後はさらにすでに解析を進めている各症例の染色体異常解析 (DNA コピー数解析)、*TP53*, *CTNNB1* などの遺伝子変異解析とデータを統合し、更に有用な予後因子の探索を行う予定である。

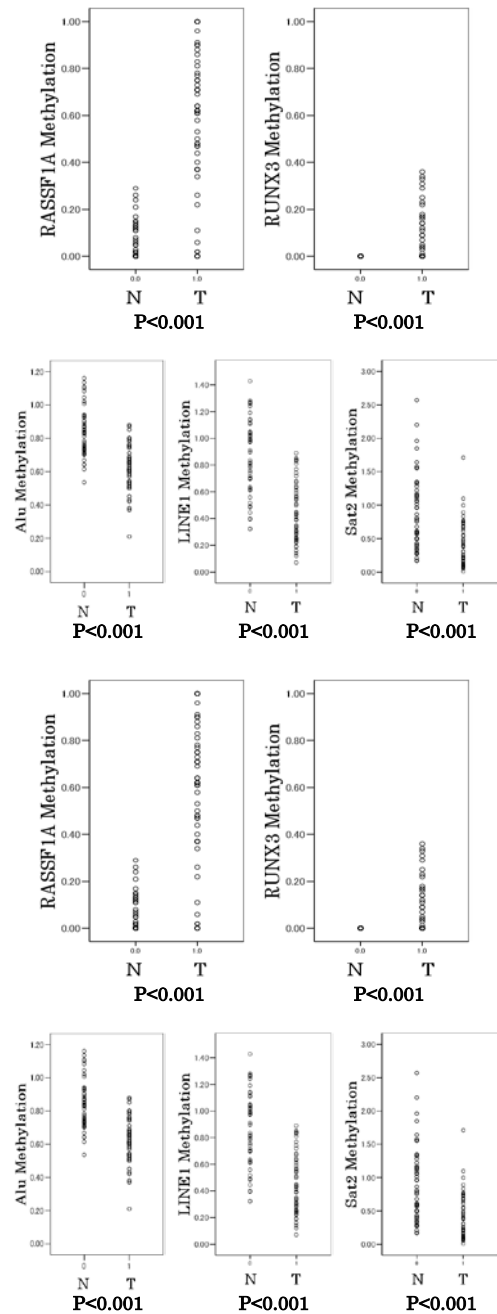


図1 非癌部(N)および癌部(T)における癌抑制遺伝子および繰り返し配列のメチル化レベルの比較

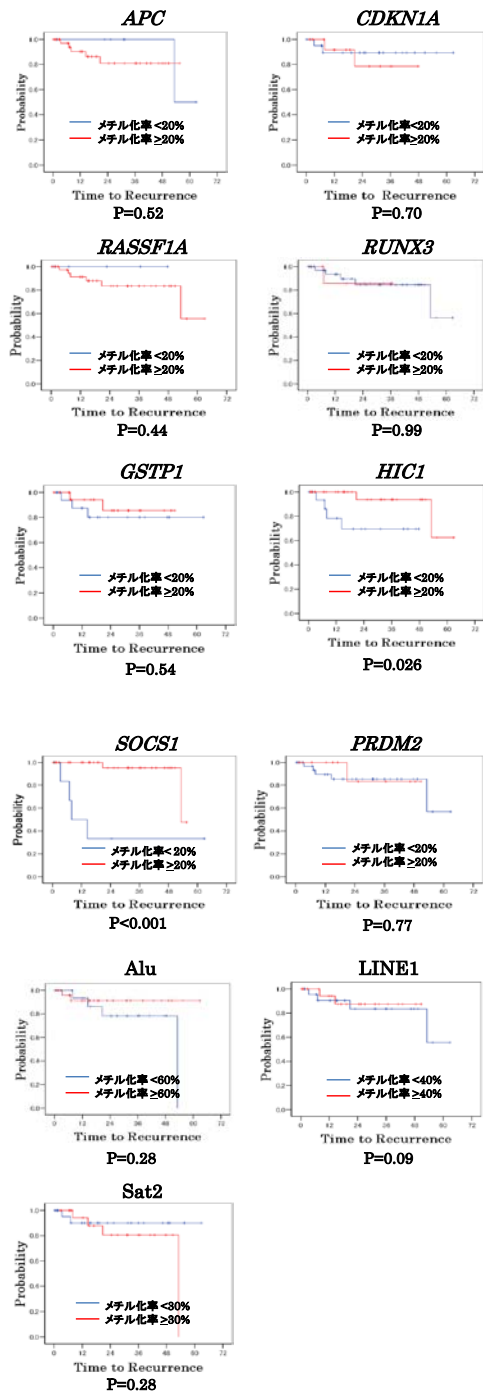


図2 癌抑制遺伝子および繰り返し配列のメチル化の有無による再発までの期間 (Time to recurrence) の比較

## 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 12 件)

1. Nishida N. Impact of hepatitis virus and aging on DNA methylation in human hepatocarcinogenesis. *Histol Histopathol*. 2010;25:647-54.

2. Kanai M, Nishimura T(8 番目), 他全 23 名. A multi-institution phase II study of gemcitabine/S-1 combination chemotherapy for patients with advanced biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010, in press 査読あり

3. Kanai M, Nishimura T(7 番目), 他全 15 名. A phase I/II study of gemcitabine-based chemotherapy plus curcumin for patients with gemcitabine-resistant pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010, in press 査読あり

4. Yukiko Mori, Takafumi Nishimura(2 番目), 他全 14 名. Oxaliplatin-free interval as a risk factor for hypersensitivity reaction among colorectal cancer patients treated with FOLFOX. *Oncology* 2010, in press 査読あり

5. Kanai M, Nishimura T(6 番目), 他全 16 名. Associations between glutathione S-transferase pi Ile105Val and glyoxylate aminotransferase Pro11Leu and Ile340Met polymorphisms and early-onset oxaliplatin-induced neuropathy. *Cancer Epidemiol* 2010;34:189-93 査読あり

6. Okuchi Y, Kawamura J, Nishimura T(6 番目), 他全 8 名. VEGF hypersecretion as a plausible mechanism for pseudo-meigs' syndrome in advanced colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2010;40:476-81 査読あり

7. Yanagihara K, Nishimura T(6 番目), 他全 15 名. Phase II study of S-1 and docetaxel for previously treated patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;66:913-8 査読あり

8. Kanai M, Nishimura T(4 番目), 他全 15 名. A history of smoking is inversely

correlated with the incidence of gemcitabine-induced neutropenia. Ann Oncol. 2009 Aug;20(8):1397-401 査読あり

9. Onoue M, Nishimura T(7 番目), 他全 12 名. UGT1A1\*6 polymorphism is most predictive of severe neutropenia induced by irinotecan in Japanese cancer patients. Int J Clin Oncol 2009;14:136-42 査読あり

10. Nishimura T. Total number of genome alterations in sporadic gastrointestinal cancer inferred from pooled analyses in the literature. Tumor Biol 29:343-350, 2008 査読あり

11. Matsumoto S, Nishimura T(2 番目), Kawamura J, 他全 15 名. Safety and efficacy of modified FOLFOX6 for treatment of metastatic or locally advanced colorectal cancer: a single-institution outcome study. Chemotherapy 54:395-403, 2008 査読あり

12. Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, Ikai I, Boland CR, Goel A. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2008;47:908-18.

[学会発表] (計 2 件)

1. 西村貴文、西田直生志、上本伸二、福田善弘. 肝細胞癌に対する生体肝移植治療後の転移再発予測因子としての遺伝子メチル化の検討. 第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪) 2010. 9. 22;P-0787

2. 西村貴文、西田直生志、出口典子、木下絵里、上田幹子、高田泰次、上本伸二、福田善弘. Clonal relationship of multi-nodular hepatocellular carcinoma in patients undergoing living-donor liver transplantation. 第 67 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2008. 10. 28;P-1270

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

<平成 21 年度-平成 22 年度>

西村 貴文 (NISHIMURA TAKAFUMI)

京都大学・大学院医学研究科・特定講師

研究者番号：40378732

<平成 20 年度>

福田善弘 (FUKUDA YOSHIHIRO)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50127130

### (2) 研究分担者

<平成 20 年度-平成 21 年度>

西田 直生志 (NISHIDA NAOSHI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60281755

<平成 20 年度>

西村 貴文 (NISHIMURA TAKAFUMI)

京都大学・大学院医学研究科・特定講師

研究者番号：40378732

上田 幹子 (UEDA MIKIKO)

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20322159

### (3) 連携研究者

<平成 22 年度>

西田 直生志 (NISHIDA NAOSHI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60281755