

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592002

研究課題名(和文) エピジェネティクスに基づく肝癌予後予測のためのハイブリッド型血液テスト

研究課題名(英文) Predictive blood system with use of methylation signatures for outcome of hepatocellular carcinoma

研究代表者

飯塚 徳男 (Iizuka, Norio)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80332807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：トレーニングセット(63例)を用いて、20から6遺伝子まで絞り込み、それらのメチル化をPCRで定量化してスコアシステムを構築した。もっとも感度・特異度の高い遺伝子の組み合わせおよびスコア式を決定した(4個の遺伝子で感度56%、特異度68%)。テストセット(新たな62例)に対し、この予測システムは60%以上の感度、特異度を示した。今回の研究では、大変興味深い結果(125例におけるメチル化遺伝子の陽性数が肝癌の予後と密接に関連する)を得たので、この成果も海外雑誌に報告するとともに、本研究の進捗過程で見出した方法論の特許申請を行った。その他、関連する成果報告を海外雑誌および国内での学会にて行った。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a minimally invasive predictive blood test with use of methylation signature specific to hepatocellular carcinoma (HCC) for outcome of HCC. Out of 20 methylation genes with CpG islands in the promoter and exon 1 regions, we identified 6 genes, such as CFTR, RAS1A, and BASP, linked to metastatic potentials of HCC. We found that 6-genes predictive scoring system had sensitivity and specificity of 56% and 68% in predicting outcome of HCC in the training set. The system worked well (sensitivity and specificity of more than 60%) in the test set. Moreover, we found that number of genes positive for methylation is critical to understanding of metastatic potentials of HCC. We reported the relevant results in the form of 9 papers (2 Anticancer Res., 4 Int J Oncol., 1 J Transl Med, 1 Oncol Rep, and 1 Frontiers in Pharmacology) and read 3 papers at academic meetings. We obtained a patent linked to methodology for the system.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝癌 メチル化 血清DNA

## 1. 研究開始当初の背景

肝癌は増加中の疾病であり、世界で1年間に62万人 (Parkin DM, *CA Cancer J Clin* 2005)が、日本では毎年約2万人が肝癌に罹患している(第18回全国原発性肝癌追跡調査報告)。

肝癌は再発率の高い予後不良な悪性腫瘍のひとつであり、効果的な個別化治療を行うために治療前に施行可能な低侵襲かつ簡易な予後予測検査の開発が切望される。

我々は、今までにゲノム情報を駆使したマイクロアレイ解析により、肝癌の進展および転移能と関連する多くの遺伝子を同定・解明し、世界でトップレベルの肝癌遺伝子データベース (Iizuka *et al.*, *Cancer Res*, 2002; Iizuka *et al.*, *Oncogene*, 2003)を構築してきた。また、独自のアルゴリズムを駆使して、少数遺伝子群による高精度な肝内再発予測システムを確立してきた (Iizuka *et al.*, *LANCET* 2003, 2004)。

以上の研究背景を基に、豊富な遺伝子情報を駆使して、高転移能を獲得した肝癌症例において、メチル化により発現低下を示す遺伝子に焦点をあて、それらの血中遊離メチル化DNA量を測定することにより、肝癌の予後予測に応用できるかもしれないという仮説を立てた。この仮説の正当性を証明するため、まずはプールしてきた転移関連遺伝子の中から *in silico* 検索により、プロモーター領域に CpG アイランドを有するサイクリン D2 (CCND2) に焦点をあて、予備実験を行った結果、CCND2 mRNA が予後不良な肝癌で発現低下していることをリアルタイム RT-PCR により確認し、その発現低下にプロモーター領域のメチル化が関与することを証明した。さらに癌原発巣とともに末梢血液中にメチル化 CCND2 を

検出する症例は有意に予後不良であることを併せ報告した (Tsutsui *et al.*, *Clin Chim Acta*, 2010) (基盤研究 C: 研究課題番号 21591749)。このように、末梢血中のセルフフリー DNA は腫瘍由来のメチル化マーカーのソースとして相応しく、複数遺伝子のメチル化解析により、高精度な肝癌の予後予測が十分可能であることを確認した。

## 2. 研究の目的

以上の研究背景から、本研究の目的は肝癌患者の予後を低侵襲かつ正確に予測できる血液テスト開発を行うことである。

## 3. 研究の方法

- (1) 肝癌再発に関わる新規遺伝子の同定  
CCND2 遺伝子のような発現パターンを示すメチル化遺伝子候補を同定する。そのために、ニンプルジェン高密度アレイ解析 (ヒト全遺伝子発現解析) を予後不良肝癌および予後良好肝癌の各 10 例で行い、Fisher criterion (Iizuka *et al.*, *Cancer Res* 2002) に基づき予後不良肝癌で発現低下した遺伝子を識別能力順にランキングする。これらの遺伝子はプールしてきた DNA アレイ情報や新たにリアルタイム RT-PCR を行いその発現パターンの再現性を検証する。
- (2) リストされた遺伝子のプロモーター領域における CpG アイランドの有無確認  
各遺伝子のウェブ情報を基に CpG アイランドの有無を確認する。
- (3) 定量的メチル化解析方法 (Q-MSP) の確立。  
癌組織と非癌部肝組織における BIS 処理後の各遺伝子のプロモーター領域のシーケンシングによる最適なメチル化解析ポジション (癌と非癌部肝で最も差異のある領域) を同定する。このステップの成果は今後の予測システムの診断性能に大きく影響するため、必要に応じパイロシーケンシングを追加する。

プライマーおよびタックマンプロブの設定を行い、ライトサイクラー(現有設備)によるメチル化遺伝子定量法を確立する。

同一患者において、癌組織から抽出したDNAと血清中のセルフリーDNAとのペアサンプルを用いて、ターゲット遺伝子のメチル化状態がどの程度両サンプル間で合致するかを検証する。

(4) 『肝癌特異的にメチル化が生じているか?』を検証・・・HCV感染患者との比較。

HCV陽性患者の中で肝癌を発症している患者と未発症の患者において末梢血中の各遺伝子のメチル化状態を定量し、そのメチル化が癌特異的な現象であることを検証する。

(5) 治癒切除症例の予後と各遺伝子のメチル化率との関連性の検証。

トレーニングサンプル(肝癌患者40人の血清)を用いて、末梢血中の各遺伝子のメチル化状態と予後との関連性を検証し、ハイブリッド型予測システムに使う候補遺伝子を選定する。

(6) *in silico*にてハイブリッド型予測システムを構築する。

(7) ハイブリッド型予測システムの性能評価を新規登録肝癌患者の血清で行う。

#### 4. 研究成果

プールしたアレイデータおよび新規解析した全ゲノム対応アレイ解析データから、予後不良の肝癌で発現が低下し、且つ、プロモーター領域にCpGアイランドを保有する遺伝子20個を同定した。

さらに、肝癌特異的にメチル化による発現低下とともに、予後不良と直結する6遺伝子CFTR, RAS1A, SRD5A2, CCND2, SPINT2, BASPに絞り込んで、以下の実験を行った。63例の肝癌患者の血清DNAにおける上記6遺伝子のメチル化をPCRで定量化してスコアシステムを構築した。6遺伝子からN個の遺伝子を選び、スコア化を行い、もっ

とも感度・特異度の高い組み合わせおよびスコア式を決定した(4個の遺伝子で感度56%、特異度68%)。さらに、メチル化遺伝子の陽性数が肝癌の予後と密接に関連することを海外雑誌に報告するとともに、本研究の進捗過程で見出した方法論の特許申請を行った。その他、関連する成果報告を海外雑誌および国内での学会にて行った。

#### 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)

Kanekiyo S, Iizuka N, Tsunedomi R, Tokumitsu Y, Hashimoto N, Tokuhisa Y, Maeda Y, Iida M, Sakamoto K, Tamesa T, Fujita Y, Yoshino S, Hazama S, Hamamoto Y, Oka M. Preoperative serum methylation signature as prognostic tool after curative hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2015 35(2):997-1007. 査読有

Tokumitsu Y, Tamesa T, Matsukuma S, Hashimoto N, Maeda Y, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Ueno T, Hazama S, Ogihara H, Fujita Y, Hamamoto Y, Oka M, Iizuka N. An accurate prognostic staging system for hepatocellular carcinoma patients after curative hepatectomy. *Int J Oncol.* 2015 Mar;46(3):944-52. doi: 10.3892/ijo.2014.2798. Epub 2014 Dec 17. 査読有

Hazama S, Takenouchi H, Tsunedomi R, Iida M, Suzuki N, Iizuka N, Inoue Y, Sakamoto K, Nakao M, Shindo Y, Kanekiyo S, Tokumitsu Y, Yoshimura K, Maeda N, Maeda K, Maeda Y, Matsui H, Yoshino S, Nakamura Y, Fujita Y, Hamamoto Y, Okamoto M, Fujita T, Kawakami Y, Oka M. Predictive

biomarkers for the outcome of vaccination of five therapeutic epitope peptides for colorectal cancer. Anticancer Res. 2014 Aug;34(8):4201-5. 査読有  
他・英文6報

〔学会発表〕(計3件)

兼清信介、飯塚徳男、恒富亮一、徳光幸生、橋本憲輝、徳久善弘、前田祥成、飯田通久、坂本和彦、為佐卓夫、岡正朗 血清メチル化遺伝子による肝細胞癌切除後の予後予測 第114回日本外科学会定期学術集会 2014年4月3日 国立京都国際会館(京都府・京都市)

兼清信介、飯塚徳男、恒富亮一、徳光幸生、橋本憲輝、徳久善弘、前田祥成、飯田通久、坂本和彦、為佐卓夫、藤田悠介、浜本義彦、岡正朗 メチル化遺伝子に基づいた切除後肝細胞癌の肝内早期再発予測 第72回日本癌学会総会 2013年10月3日-5日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

兼清信介、飯塚徳男、恒富亮一、徳光幸生、橋本憲輝、徳久善弘、前田祥成、飯田通久、坂本和彦、為佐卓夫、岡正朗 血清メチル化遺伝子による肝細胞癌切除後の予後予測 第113回日本外科学会定期学術集会 2013年4月11日-13日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計1件)

名称：情報処理装置と情報処理プログラム並びに情報処理方法  
発明者：浜本義彦、飯塚徳男  
権利者：国立大学法人山口大学  
種類：特許  
番号：第5669162号  
出願年月日：2014年7月18日  
取得年月日：2014年12月26日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 徳男 (IIZUKA, Norio)  
山口大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：80332807

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし