

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461979

研究課題名(和文) マルチアレイ法を応用した肝細胞癌発症や再発に関わる背景肝因子の同定と応用

研究課題名(英文) Detection and application of the alteration in background liver with hepatocellular carcinoma utilizing multi array methods

研究代表者

野本 周嗣 (Nomoto, Shuji)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：40300967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：HCCの発症にはウイルス性の肝炎などの背景肝障害が関与し、さらに治癒切除後も多中心性発生再発の多いことがわかっており、背景肝における予後不良因子を抽出することは他のがん種と比較し、より重要である。そこで「正常肝:SuperNormal(SN)」「転移性肝がん摘出標本の非がん部」と「HCV陽性HCCの正常組織:HCV Corresponding Normal(CN)」を比較したマルチアレイ解析を行い、予後予測が可能である分子の抽出を行った。抽出された分子は背景肝異常を示すことから、HCCを未発症の肝硬変、慢性肝炎患者において「HCC易発症性を示すマーカー」となり得る可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：When assessing hepatocellular carcinoma (HCC), it is important to examine prognostic factors in the background normal liver tissue and consider malignant aspects of the primary lesion. Control samples, termed supernormal (SN) liver, were taken from 11 cases of metastatic secondary malignancies of the liver. We selected adjacent nonneoplastic liver tissue from a patient with HCC and liver cirrhosis by hepatitis C (CN) for comparison. Expression profiling and methylation arrays were performed. We identified genes showing differences in both arrays. The alteration of those genes' expression in corresponding background liver demonstrated significant correlation with worse survival. Expression of these genes in the background liver of HCC is likely to be a good biomarker for risk of HCC development. When assessing HCC, it is important to extract prognostic factors from background liver tissue as well as considering malignant factors of the primary cancer lesion.

研究分野：消化器外科

キーワード：マルチアレイ法 発現アレイ SNPアレイ メチル化アレイ MicroRNAアレイ

1. 研究開始当初の背景

HCC の発症にウイルス性の肝炎が大きく関与していることは周知された事実でありそれぞれのウイルスが発がんにどのように影響するかを検討する仕事が国内外で多くなされてきた。また、HCC はひとつの腫瘍に対する治療の後にも肝内に多発再発する傾向を示し、この再発巣に対し、どのようにアプローチし、診療をしていくかが予後に大きく関わる要素である。さらに、HCC の発症はウイルスだけに依存しているわけではなく、予後を規定する分子の検索も重要な検討事項であった。そこで、我々は教室で摘出術を行った HCC 検体を用いて、同一検体を3つのアレイ(発現アレイ、SNP アレイ、メチル化アレイ)で解析するトリプルアレイ法を考案し、新たながん関連遺伝子の抽出を目指し検討を行い、腫瘍で特異的に異常を認める分子により再発や予後に有意差を認めることを報告してきた。この手法は新規の関連分子を同定するのに非常に効果的な方法であった。

それに並行して、これまでに教室で切除術を行った同時性、異時性に多発した HCC のゲノムパターンを調べると(ミトコンドリアゲノム変異: Nomoto S. et al: Clin Cancer Res. 2002 Feb;8(2):481-7., 複数遺伝子のメチル化の異常パターン: Nomoto S. et al: Br J Cancer. 2007 Nov 5;97(9):1260-5.) 多発した病変はそれぞれのゲノム型が異なる多中心性発生が原発巣の転移であることよりもはるかに多く認められることも報告してきた。

これらの検討から考えると、HCC の場合、これまでのように「腫瘍因子」による悪性度を検討することにより再発しやすさや予後を予測することでは不十分であり、新たに「背景肝因子」を抽出することが重要であり、この検討が治療方針の立案などにも反映されるであろうという発想に至った。

2. 研究の目的

これまでにがんにおける遺伝子異常を抽出する試みは非常に多く行われてきた。多くは「背景組織」と「がん組織」を比較することによりこれらの異常は見つけ出されてきたのであるが、HCC においては、背景肝組織がすでに全くの正常でないことがほとんどであり、また、背景肝組織の予備能が予後に大きく影響することが様々な検討でわかっていた。しかし、その「背景肝因子」を抽出する試みはほとんど行われておらず、また、その方法も判らなかつた。

我々の教室での切除標本のライブラリーを生かし、さらに独自で考案した「トリプルアレイ法」を修飾した「マルチアレイ法」により予後と強く関連する「背景肝因子」を抽出することが可能であると考えられ

た。これまで行ってきた「腫瘍因子」との組み合わせにより、より信頼出来る予後の予測が可能となり、治療方針の立案にも役立つことが予想される。

さらには、これらの背景肝因子は HCC 未発症の肝障害患者において HCC 発症のリスクがどれくらいあるか、HCC 易発症性を示すマーカーとなりうる可能性がある。

3. 研究の方法

マルチアレイ法を行うために非常に quality の高い DNA と RNA の抽出が必要である。

このため、切除標本は手術室で切除された時点で、すぐさま、がん部、非がん部を正確に切り出し液体窒素等にて凍結する。特に RNA については RNeasy, MicroRNeasy を用いて抽出することになるので、手術室で切り出した組織をすぐに、RNA 安定化バッファーに浸し、そのまま粉砕して抽出の過程に移行することが重要である。DNA は比較的凍結保存した組織でも質の良いもの抽出することが可能であるが、組織の保存は -80 で注意深く行う。さらに、この際に重要なことは、組織を切り出した部位の病理切片を作成し、病理所見として、HCC 発症の母地としての特徴をしっかりと備え持った背景肝であることを確認する。これは、マルチアレイで比較する、正常肝と NASH 肝、HCV 陽性肝の差を明確にするために、大変重要な要素である。

さらに、同一症例で、異時的に肝切除術を行うことがある場合には、背景肝の変化を異時的にとらえるためにその時々で採取した組織でマルチアレイによる解析を行うことで、背景肝の変化を遺伝子学的に見る。

抽出された候補遺伝子について、患者検体を用いて、非がん部での発現や、さらにはがん部での発現も検討する。

抽出された遺伝子での患者検体での発現値を検討し、予後不良を示すマーカーとなりうるかを統計検討する。

4. 研究成果

まずは SN と CN の比較でそれぞれのアレイで異常な差を認める分子として THOP1 遺伝子を抽出した。当科で手術を行った 179 例の症例にてこの分子の発現検討を行うと低発現群が有意に予後不良であり、THOP1 遺伝子発現の低下が独立した予後不良因子であることが判明したためこれを (Ann Surg Oncol. 2014 Jun;21 Suppl 3:S443-450.) に報告し掲載された。また、HCC 切除術後の予後不良因子のバイオマーカーとして特許申請(特願 2013-178264)を行った。

SN と比較して CN での値が発現アレイで 2.378 と上昇し、メチル化アレイで低下している(脱メチル化: SN: 0.749, CN: 0.125) 分子として JAK2 遺伝子を抽出した。100 症例で mRNA 発現を検討すると、CN でアレイの

結果のように発現が SN 平均値より上昇した症例は 3 例で、これらには脱メチル化を認めたがその他の症例ではおおむね低下しており、JAK2 発現量(JAK2x103/GAPDH)の平均値は SN: 35.21 ± 21.38, CN: 6.21 ± 5.99 と有意に CN での低下を認めた (p<0.001). 腫瘍での発現はさらに 3.59 ± 4.86 と低下していた. CN での発現低値は高中分化型 HCC と有意な相関を示した (p=0.014). また発現を高値 70%(n=70), 低値 30%(n=30) で群分けすると、発現が高い群は有意に生存率が増悪 (p=0.017) し多変量解析でも独立した予後不良因子となった (p=0.032). 腫瘍の発現の平均値の群分けでは生存率に差を認めなかった (p=0.405).

さらに SN と比較して CN において極めて発現が上昇していた 2 分子について、新規性と有用性を認められ「肝細胞がん易発症性マーカー」となりうる可能性があると考え特許申請を行った。

<引用文献>

Nomoto S. et al: Clin Cancer Res. 2002 Feb; 8(2):481-487.

Nomoto S. et al: Br J Cancer. 2007 Nov 5; 97(9):1260-1265.

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 4 件)

Sonohara F, Nomoto S, Inokawa Y, Hishida M, Takano N, Kanda M, Nishikawa Y, Fujii T, Koike M, Sugimoto H, Kodera Y, High expression of Janus kinase 2 in background normal liver tissue of resected hepatocellular carcinoma is associated with worse prognosis, 査読有, 33 巻(2), 2015, pp767-773, DOI:10.3892/or.2014.3621

Takano N, Hishida M, Inokawa Y, Hayashi M, Kanda M, Nishikawa Y, Iwata N, Kobayashi D, Tanaka C, Yamada S, Nakayama G, Fujii T, Sugimoto H, Koike M, Fujiwara M, Kodera Y, Nomoto S, CCNJ detected by triple combination array analysis as a tumor-related gene of hepatocellular carcinoma, International journal of Oncology, 査読有, 46 巻(5), 2015, pp1963-1970, DOI:10.3892/ijo.2015.2892

野本周嗣、猪川祥邦、園原史訓、神田光郎、杉本博行、藤井 努、小寺泰弘. 背景肝のアレイ解析により抽出した TPPP 遺伝子発現が肝細胞癌切除後の予後に与える影響、肝臓、査読有、56 巻 (suppl.2), 2015、pp750-750、<http://www.myschedule.jp/70jsgs/sea>

[rch/detail_program/id:2378](http://www.myschedule.jp/70jsgs/sea/rch/detail_program/id:2378)

Nomoto S, Hishida M, Inokawa Y, Takano N, Kanda M, Nishikawa Y, Fujii T, Koike M, Sugimoto H, Kodera Y, Expression Analysis of THOP1 in Background Liver, a Prognostic Predictive Factor in Hepatocellular Carcinoma, Extracted by Multiarray Analysis, Annals of Surgical Oncology, 査読有, 21 巻 (suppl3), 2014, pp443-450, DOI:10.1245/s10434-014-3581-1

[学会発表](計 12 件)

野本周嗣、猪川祥邦、園原史訓、神田光郎、杉本博行、藤井 努、小寺泰弘. 背景肝のアレイ解析により抽出した TPPP 遺伝子発現が肝細胞癌切除後の予後に与える影響. JDDW2015, 2015.10.8 グランドプリンス新高輪・国際館パミール (東京都港区)

野本周嗣、園原史訓、猪川祥邦、菱田光洋、神田光郎、藤井 努、小池聖彦、杉本博行、藤原道隆、小寺泰弘. 切除治療後 HCC の腫瘍と背景肝とにおける AKR1B10 遺伝子発現の大小と予後との関係についての検討. 第 70 回日本消化器外科学会総会、2015.7.16 アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)

Shuji Nomoto, Fuminori Sonohara, Yoshikuni Inokawa, Mitsuro Kanda, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera. Alteration of Aldo-keto reductase family 1, member B10 (AKR1B10) expression among tumor and background non-tumorous tissue of curatively resected hepatocellular carcinoma is associated with worse prognosis. AACR Annual Meeting 2015(American Association for cancer Research), 2015.4.21 Philadelphia (America)

野本周嗣、菱田光洋、猪川祥邦、神田光郎、杉本博行、藤井 努、小池聖彦、中山吾郎、藤原道隆、小寺泰弘. 肝細胞がんの背景肝の異常から抽出した予後因子 THOP/JAK2 の検討. 第 52 回日本癌治療学会学術集会、2014.8.29 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

猪川祥邦、野本周嗣、菱田光洋、高野奈緒、神田光郎、杉本博行、藤井 努、小池聖彦、藤原道隆、小寺泰弘. 背景肝のアレイ抽出により抽出した TPPP 遺伝子発現が肝細胞癌切除後の予後に与える影響. 第 69 回日本消化器外科学会総会、2014.7.17 郡山市民文化センター (福島県郡山市)

野本周嗣、菱田光洋、猪川祥邦、高野奈緒、神田光郎、杉本博行、藤井 努、小池聖彦、藤原道隆、小寺泰弘. 正常肝と HCC 背景肝の比較でのマルチアレイ法に

より抽出した JAK2, THOP1 遺伝子発現の検討 . 第 69 回日本消化器外科学会、2014.7.17 郡山市民文化センター (福島県郡山市)

野本周嗣、菱田光洋、猪川祥邦、神田光郎、杉本博行、藤井 努、小寺泰弘 . 正常肝と HCC 背景肝の比較でのマルチアレイ法により抽出した JAK2 遺伝子発現の検討 . 第 50 回日本肝臓学会、2014.5.29 ホテルニューオータニ (東京都千代田区)

Yoshikuni Inokawa, Shuji Nomoto, Mitsuhiro Hishida, Nao Takano, Mitsuro Kanda, Michitaka Fujiwara, Masahiko Koike, Hiroyuki Sugimoto, Tsutomu Fujii, Goro Nakayama, Suguru Yamada, Chie Tanaka, Daisuke Kobayashi, Naoki Iwata, Yasuhiro Kodera. Correlation between worse prognosis and lower expression of the TPPP gene in patients with hepatocellular carcinoma, detected by multiarray analysis. AACR Annual Meeting 2014(American Association for cancer Research), 2014.4.8 San Diego (America)

Shuji Nomoto, Mitsuhiro Hishida, Yoshikuni Inokawa, Nao Takano, Mitsuro Kanda, Yasuhiro Kodera. Correlation between worse prognosis and higher expression of the JAK2 gene in corresponding non-neoplastic tissue in patients with hepatocellular carcinoma, extracted by multiarray analysis. AACR Annual Meeting 2014(American Association for cancer Research), 2014.4.8 San Diego (America)

Mitsuhiro Hishida, Shuji Nomoto, Yoshikuni Inokawa, Nao Takano, Mitsuro Kanda, Naoki Iwata, Chie Tanaka, Daisuke Kobayashi, Yoko Nishikawa, Suguru Yamada, Goro Nakayama, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera. ZGPAT gene expression in non-tumor hepatocellular carcinoma tissue is a likely biomarker for survival risk. AACR Annual Meeting 2014(American Association for cancer Research), 2014.4.7 San Diego (America)

野本周嗣、菱田光洋、猪川祥邦、高野奈緒、杉本博行、藤井 努、神田光郎、小池聖彦、藤原道隆、小寺泰弘 . 正常肝と HCC 背景肝の比較から抽出した JAK2 遺伝子の発現の検討 . 第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014.4.5 国立京都国際会館 (京都府京都市)
野本周嗣、猪川祥邦、菱田光洋、神田光

郎、杉本博行、竹田 伸、藤井 努、小池聖彦、藤原道隆、小寺泰弘 . 背景肝の比較から抽出した予後予測因子、THOP1 遺伝子の mRNA 発現の検討 . 第 68 回日本消化器外科学会総会、2013.7.19 シーガイアコンベンションセンター (宮崎県宮崎市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 6 件)

名称: 肝細胞癌に関する診断のために有用な背景肝因子及びその利用

発明者: 野本周嗣

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2013-178264

出願年月日: 2013 年 8 月 29 日

国内外の別: 国内

名称: 肝細胞癌に関する診断のために有用な背景肝因子及びその利用

発明者: 野本周嗣

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2013-178264

出願年月日: 2013 年 8 月 29 日

国内外の別: 外国

名称: 肝細胞癌に関する診断のために有用な背景肝因子及びその利用

発明者: 野本周嗣

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2013-184448

出願年月日: 2013 年 9 月 5 日

国内外の別: 国内

名称: 肝細胞癌に関する診断のために有用な背景肝因子及びその利用

発明者: 野本周嗣

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2013-184448

出願年月日: 2013 年 9 月 5 日

国内外の別: 外国

名称: 肝細胞癌に関する診断のために有用な背景肝因子及びその利用

発明者: 野本周嗣

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2015-030710

出願年月日: 2015 年 2 月 19 日

国内外の別: 国内

名称: 肝細胞癌に関する診断のために有用な背景肝因子及びその利用

発明者：野本周嗣
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：2015-030710
出願年月日：2015年2月19日
国内外の別：外国

取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野本 周嗣 (NOMOTO, Shuji)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：40300967

(2) 研究分担者

杉本 博行 (SUGIMOTO, Hiroyuki)
名古屋大学・医学系研究科・講師
研究者番号：20437007

神田 光郎 (KANDA, Mitsuro)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00644668

(3) 連携研究者

連携研究者なし

(4) 研究協力者

猪川 祥邦 (INOKAWA, Yoshikuni)
(平成 27 年度)