

学位論文題名

Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis : identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma

(肝細胞癌の多段階発癌過程における遺伝子発現解析：
早期肝細胞癌の分子マーカーとしての HSP70 の同定)

学位論文内容の要旨

緒言

肝炎ウイルスによる慢性肝障害を背景に生じる肝細胞癌において、前癌病変に相当する腺腫様過形成から上皮内癌ないし微小浸潤癌に相当する早期肝細胞癌、更に進行肝細胞癌へと進展することが明らかになってきた。早期肝細胞癌の多くは異型度が低く、浸潤・破壊性発育の所見に乏しい癌であるために、その病理診断、前癌病変である腺腫様過形成との鑑別が問題となり、細胞増殖活性や様々な分子、遺伝子の変化などが検討されてきているが、実用的なものはない。また多段階発癌の分子機構は今なお不明な点が多い。Oligonucleotide array は数万の遺伝子発現情報を網羅的に解析できる技術であり、これを用いて肝細胞癌の多段階発癌過程における mRNA level での遺伝子発現解析を行い、早期肝細胞癌に有用なマーカーを同定し、多段階発癌の分子機構の解明を行うことを目的とした。

実験方法

- (1) 対象は1999年から2001年まで国立がんセンター中央病院にて外科的に切除された“Nodule-in-Nodule”type HCCの7症例。非腫瘍部、早期肝細胞癌部、進行肝細胞癌部をとりわけ、AGPC法によりtotal RNAを抽出。それぞれのtotal RNA 10 µgから、Super Script Choice System (Gibco-BRL)を用いてcDNAを合成後、BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo)によりcRNAを合成。15 µgのcRNAをOligonucleotide array (Gene Chip, Human Genome-U95Av2, Affymetrix)にhybridizationさせ、遺伝子発現解析(12600gene)を行った。Cluster解析のソフトとしてはGene Spring (Silicon Genetics)を用い、Pearson correlationに基づいて解析を行った。
- (2) (1)の解析において早期肝細胞癌部で発現の亢進を認めた遺伝子については Real-Time Quantitative RT-PCR(ABI prism 7700 Sequence Detector)を施行。
- (3) 多段階発癌過程 215 症例(腺腫様過形成; AH 18 例、異型腺腫様過形成; AAH 15 例、早期肝細胞癌; early HCC 63 例、“Nodule-in-Nodule”type HCC 41 例、進行肝細胞癌; Progressed HCC 78 例)の免疫組織染色を施行。1988 年から 2002 年までに当院で外科的に切除された肝細胞がん 215 症例のホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用いて免疫組織化学的に HSP70 の発現を調べ、多段階発癌との相関を検索した。キシレンで脱パラフィン、アルコールで脱水後、0.3%過酸化水素水含有メタノール中に室温で 30 分留置し、リン酸緩衝食塩水 PBS で

洗浄後、120℃、20分オートクレーブ処理した。次に2%正常ブタ血清を含むPBSに30分浸した後、HSP70に対するモノクローナル抗体(SC-24)を滴下し、4℃の湿潤密閉器内で一晚静置した。PBSで洗浄後、ビオチン化二次抗体を滴下し、室温で30分反応させた。PBSで洗浄後、abidin-biotin-peroxidase detection kit (Vectastain Elite ABC kit)で発色させた。1視野100細胞をカウントし、核、細胞質の染色の陽性率を調べ、 $P < 0.05$ をもって統計学的有意差として扱った。

結果

(1) 非腫瘍部、早期肝細胞癌部、進行肝細胞癌部が、遺伝子発現レベル(hierarchical clustering algorithm)により分けられ、それらを識別し得る遺伝子群を同定した。これらのうちで、2倍以上発現に差のあった遺伝子を選別し、更にこの中で早期肝細胞癌部において最も特異的な遺伝子(Mann-Whitney U-test; $P < 0.001$)としてHSP70を同定した。

(2) HSP70のPrimerを設定しReal-Time Quantitative RT-PCRを施行したところ、多段階的に発現の上昇を認め、mRNA levelでの再現性が確認された。

(3) 腺腫様過形成から進行肝細胞癌までの多段階発癌過程215症例の免疫組織染色では、前癌病変(腺腫様過形成、異型腺腫様過形成)ではHSP70の発現を認めず、早期肝細胞癌でHSP70の発現を認め、更にその発現量は発癌過程に応じて多段階的に増加を示し、早期肝細胞癌の有用なマーカーと考えられた。

考案

最近のcDNA microarrayまたはoligonucleotide array technologyの目覚ましい進歩により、一度に数万の遺伝子発現を解析することが可能となった。この多数の遺伝子発現情報に基づき、癌の正確な病型分類、予後、治療の感受性予測などが行われている。

肝炎ウイルスによる慢性肝障害を背景に生じる肝細胞癌において、癌は多段階に進展することが明らかになってきたが、その過程における分子レベルでの診断、メカニズムはいまなお不明である。

我々は、“Nodule-in-Nodule”type HCCの非腫瘍部、早期肝細胞癌部、進行肝細胞癌部のmRNAレベルで発現の比較を行い、遺伝子発現(hierarchical clustering algorithm)によりそれらが分けられることを示し、多段階発癌過程においてそれぞれの過程が分子レベルで明瞭に異なることを示した。またHSP70が、RNA、蛋白レベルで非腫瘍部に比較し早期肝細胞癌部、進行肝細胞癌部で多段階的に過剰発現し、肝細胞癌の多段階発癌に関与していることを示した。更に重要なことに、前癌病変との鑑別が問題となる早期肝細胞癌に有効なマーカーであることも多症例から立証した。

HSP70は分子シャペロンとして、細胞がさまざまなストレスにさらされた時に生じる変性蛋白質に結合し、その沈澱を防ぐ機能を有する。HSP70の過剰発現は食道、胃、大腸、膵臓、乳腺、子宮、腎臓など多臓器の癌で報告がある。癌における過剰発現の原因として、癌部では非癌部に比較し多くのストレスにさらされ、その結果としてHSP70の発現が多いと考察されている。早期肝細胞癌では、血流の低下によるhypoxiaの環境下などで、多くのストレスにさらされHSPの発現が上昇していることが推察される。

HSP70に加え、多段階発癌に関与していると考えられる分子を幾つか同定した。免疫グロブリンは肝細胞癌での発現低下、またmidkine gene、collagen type Iは肝細胞癌で過剰発現の報告があり、従来報告に一致する所見である。granulin、type I sigma receptor、nma、Lipocalin 2は他臓器癌で過剰発現の報告があり、肝細胞癌の多段階発癌過程において新たな知見と考えられる。CAP2の機能についてはいまなお不明であるが、その相同性の高いCAPは酵母においてCYR1と

complex を形成する。CAP2 は肝細胞癌の多段階発癌過程で、多段階的に発現が亢進していた (Real time RT-PCR; unpublished observation)。今後肝細胞癌の多段階発癌過程において、これら遺伝子の更なる解析が重要であると考えられる。

結語

肝細胞癌の多段階発癌過程における遺伝子発現解析を行った。HSP70 は肝細胞癌の多段階発癌過程に関与しており、早期肝細胞癌の有用な分子マーカーであると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 藤 堂 省

副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis : identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma

(肝細胞癌の多段階発癌過程における遺伝子発現解析：
早期肝細胞癌の分子マーカーとしての HSP70 の同定)

“Nodule-in-Nodule”type HCC は、肝細胞癌における多段階発癌過程の良いモデルであり、7 症例の“Nodule-in-Nodule”type HCC を用いて Oligonucleotide array による遺伝子発現解析を行った。非腫瘍部、早期肝細胞癌部、進行肝細胞癌部をとりわけ、AGPC 法により total RNA を抽出。それぞれの total RNA 10 μ g から cRNA を合成し、Oligonucleotide array (Gene Chip, Human Genome-U95Av2, Affymetrix) に hybridization させ、遺伝子発現解析(12600gene)を行った。Cluster 解析のソフトとしては Gene Spring (Silicon Genetics)を用い、Pearson correlation に基づいて解析を行った。非腫瘍部、早期肝細胞癌部、進行肝細胞癌部が遺伝子発現レベル(hierarchical clustering algorithm)により分けられ、それらを識別し得る遺伝子群を同定した。これらのうち早期肝細胞癌部において最も特異的な遺伝子として HSP70($P<0.001$)を同定し、real time RT-PCR、免疫組織染色を行ったところ、mRNA、蛋白レベル($P<0.001$)での再現性を得た。腺腫様過形成から進行肝細胞癌までの多段階発癌過程 215 症例の免疫組織染色では、前癌病変(腺腫様過形成、異型腺腫様過形成)では HSP70 の発現を認めず、早期肝細胞癌で HSP70 の発現を認め、更にその発現量は発癌過程に応じて多段階的に増加を示した。HSP70 は肝細胞癌の多段階発癌に関与しており、更に重要なことに前癌病変との鑑別が問題となる早期肝細胞癌の診断に有効なマーカーであると考えられた。

口頭発表に際し、副査の藤堂教授より、使用した chip における遺伝子数、検体に使用した肝細胞癌の組織型、門脈浸潤について、肝細胞癌における早期癌、肝内転移、多中心性発生の定義について、肝細胞癌における HSP Family の発現についての質問があった。申請者は、本実験に使用した chip の遺伝子数は 12600 であり、EST、同一遺伝子を省くと実際の遺伝子数は 7000-8000 と考えられること、また検体に使用した肝細

胞癌の組織型は、早期肝細胞癌部では全例高分化、進行肝細胞癌部では 2 例高分化、5 例中分化であり、門脈浸潤のある症例は 1 例であったこと、早期肝細胞癌、肝内転移、多中心性発生については、原発性肝細胞癌取り扱い規約(第 4 版)に基づき回答した。HSP Family については、従来 HSP27 が肝細胞癌で過剰発現の報告があり、更に HSP27、HSP90 が本実験の chip でも癌部において過剰発現があることを述べ、HSP70 のみが早期肝細胞癌で過剰発現となることに関しては、今後の更なる研究が必要であると回答した。また副査の浅香教授より、HSP70 の生物学的意義、肝細胞癌組織での過剰発現の原因について質問があった。申請者は、HSP70 が c-myc、H-ras などの遺伝子と協同し、malignant transformation に関与していること、telomerase の安定化や、antiapoptosis に関与していることを述べ、また早期肝細胞癌では、血流の低下による hypoxia の環境下などで、多くのストレスにさらされ HSP の発現が亢進していることが推察されることを回答した。更に主査の吉木教授より、chip のロット間による data の差異、手術検体における阻血による HSP70 の発現の変異、chip の臨床応用、chip による肝硬変から肝癌発生の予測についての質問があった。申請者は、chip 間の data の差異については oligonucleotide array における Normalization、再現性のある data のみの使用について述べ、更に他の種類の chip で行った場合、同様の遺伝子発現 level が得られる事は予測不能であること、今後は他の chip も使用して既に報告のある論文も参考にし、肝細胞癌でより客観的で有用な data の作成が望まれることを回答した。阻血に関しては、非癌部、癌部ともに同一の検体からであり、両者における阻血の条件は同一であると考えられ、HSP70 は癌部において、恒常的に過剰発現していると考えられると回答した。臨床応用に関しては、既存の画像診断、病理診断には及ばないが、遺伝子発現 level からみた癌の病型診断は今後治療の一躍を担うものと期待されると回答した。肝硬変から肝癌発生に関する遺伝子発現解析は、今後長期的な prospective study が必要であると回答した。

本研究は、HSP70 が肝細胞癌の多段階発癌に関与しており、更に前癌病変との鑑別が問題となる早期肝細胞癌の診断に有効なマーカーであるという点で高く評価され、今後は HSP70 の肝細胞癌における分子生物学的検討が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。