

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 遺伝子発現プロファイルをもちいた肝細胞癌の分類、および肝癌新規腫瘍マーカー候補遺伝子 GPC3 の機能解析

指導教官 幕内雅敏教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 9 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 緑川 泰

日本における死亡原因の第一位を占めている癌は、高齢化社会の進む現在、社会的にも医学的にも重要な疾患である。

1980 年代初めにヒトの癌遺伝子がクローニングされたことをうけ、それまでいくつかの研究分野に別れていた癌研究の流れは、癌を分子レベルで理解する分子遺伝学及び分子生物学へとシフトした。その結果、数々の癌遺伝子および癌抑制遺伝子がクローニングされ、診断や治療に大きく貢献した。その後、「ヒトゲノムの全シーケンスを解析して癌をはじめとするあらゆる疾患の原因を解明しよう」というスローガンのもとで進められてきたヒトゲノム解析計画は、国際コンソーシアムおよびアメリカの Celera Genomics 社によって 2001

年のヒトゲノムのドラフトシーケンス発表にたどり着いた。しかし、当初のスローガンにあったように、ゲノム情報が癌のメカニズムの解明に大きく貢献したと同時に、ゲノムに書き込まれている情報だけで規定されない、例えば、mRNA 発現の制御といった遺伝子発現解析や翻訳後修飾を含むタンパク質の包括的な解析といったポストゲノム解析の重要性が明らかになった。このような流れをうけ、DNA マイクロアレイは遺伝子発現を網羅的に解析する技術として急速に普及している。マイクロアレイ技術はガラス面上などの限られた範囲に DNA 配列などを貼りつけておき、ハイブリダイゼーションの原理により遺伝子転写産物の量を測定するものである。測定する RNA サンプルに標識をすることと多数の遺伝子を同時に測定できることに特長があり、Brown らによって開発され実用化されてきた。

本研究ではまず第一段階として肝細胞癌 25 例、非癌部 24 例について GeneChip により約 12000 種類の遺伝子の発現レベルを調べ、その発現強度を多変量解析の一つである主成分分析法を用いて解析をおこなった。その発現パターンを 3 次元空間にマッピングすることにより各検体の分類を試みたところ、癌部と非癌部との間には明瞭な分類が可能であった。ついで癌部のみについて、臨床データ（年齢、性別、肝炎ウィルス、再発率）および病理所見（腫瘍径、分化度、被膜形成、隔壁形成、血管浸潤、漿膜浸潤）についての分類を試みたところ、分化度において低分化型肝癌が他の中分化型肝癌、高分化型肝癌と異なる発現パターンを示した。また、上記の因子を規定する distinct gene を選択するために Mann-Whitney U test をおこない、その U 値に対して permutation test を行った。その結果、上述の肝癌分化度に加えて血管浸潤

についても統計学的有意差をもって distinct gene を選択することが可能であった。低分化型肝癌および血管浸潤を有する肝癌で発現が上昇する上位 50 遺伝子の機能をみてみると、低分化型肝癌では細胞周期に関連する遺伝子が含まれ、腫瘍増殖速度が亢進している状態と一致する結果であった。一方で血管浸潤を伴う肝癌では細胞周期関連の遺伝子は含まれず、Ras や Rho ファミリー遺伝子が含まれていた。このように遺伝子発現プロファイル解析により、異なる癌進展様式においては異なる遺伝子群が関与していることが示された。

第二段階として、高分化型肝癌から中分化型肝癌への脱分化に関与する遺伝子の同定をおこなった。上述した実験では主成分分析、Mann-Whitney U test では高分化型肝癌と中分化型肝癌の間に有意な発現パターンの差は認められなかった。そこで本実験では結節内結節像を呈する肝癌の癌発育の特徴を利用し、外側の高分化型肝癌と内側の中分化型肝癌を比較することにより、個体差のない検体間での差を観察した。外側の腫瘍と内側の腫瘍との比較では 76 遺伝子の発現が肝癌脱分化に際して上昇する一方で、33 遺伝子の発現強度が低下していた。さらに別の高分化型肝癌 5 例、中分化型肝癌 5 例についてこれらの遺伝子の発現パターンを調べたところ、12 遺伝子 (LAMA3, PPIB, ADAR, PSMD4, NDUFS8, D9SVA, CCT3, GBAP, ARD1, RDBP, CSRP2, TLE1) の発現上昇と 4 遺伝子 (CP, IL7R, CD48, PLGL) の発現低下が統計学的有意に認められた。最後に他の高分化型肝癌 5 例、中分化型肝癌 7 例をもちいて上記 16 遺伝子について RT-PCR により発現強度を比較検討したところ、GeneChip の結果とほぼ同じ傾向であった。このように、単なる発現プロファイルの比較

では差がなかった高分化型肝癌と中分化型肝癌の間でも、肝癌進展の特性を利用して肝癌脱分化に寄与すると考えられる遺伝子群の選択が可能であった。

第三段階として、肝癌で遺伝子発現が上昇している Glypican3 (GPC3) に着目し、発現上昇の割合と肝発癌における同遺伝子の役割について考察した。GPC3 の肝細胞癌における転写レベルでの発現上昇の報告はすでにさされているが、翻訳レベルでの上昇についてはいまだ不明であった。そこでまず抗 GPC3 モノクローナル抗体を樹立し、この抗 GPC3 モノクローナル抗体を用いた肝癌細胞株のタンパク質の発現解析をおこなったところ、mRNA の発現量とタンパク質の発現量は相関した。さらに肝癌切除検体 52 例についてウェスタンブロット法によりタンパク発現レベルを調べたところ、43%の腫瘍で GPC3 の発現が上昇していた。このことは GPC3 が肝癌腫瘍マーカーとして利用しようとするとともに、肝癌において GPC3 が肝癌になんらかの作用を及ぼしている可能性が示唆された。では、増殖を抑制すると考えられる GPC3 が何故肝発癌で発現上昇しているのかを調べるために、GPC3 が増殖因子の働きを抑制することに着目し、FGF2, IGF2, BMP-7, TGF-beta, HB-EGF に対して GPC3 が影響を及ぼすかどうかを MTT アッセイにより検討した。その結果、GPC3 は BMP-7 の細胞増殖抑制効果を抑制し、さらにルシフェラーゼアッセイで実際に BMP-7 のシグナル伝達を抑制していることを明らかにした。このことは GPC3 が増殖抑制因子の効果を制御することにより癌発育に有利に働く可能性があることを示唆するものである。