

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2011年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 近藤格

所属機関名： 国立がん研究センター

所属部署名：創薬プロテオーム研究分野

所在地：東京都中央区築地5-1-1

電話：03-3542-2511

職名：分野長

内線：3004



1. 助成金額：1,000,000 円

2. 研究テーマ

プロテオーム解析による肝細胞癌の病態解明に基づく個別化医療実現のための新規診断技術の開発および創薬シーズの探索

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：近藤格

所属機関名：国立がん研究センター

中国側研究者氏名：樊 嘉

所属機関名：復旦大学

職名：研究職、分野長

部署名：創薬プロテオーム研究分野

職名：外科医、教授

部署名：中山医院

4. 当該研究における発表論文等

1. 第8回 日本プロテオーム学会 シンポジウム 「Cancer Proteomics for Biomarker Development」近藤格

2. 第51回 日本癌学会学術総会 シンポジウム 「がんプロテオーム解析によ

プロテオーム解析による肝細胞癌の病態解明に基づく 個別化医療実現のための新規診断技術の開発および創薬シーズの探索

研究者氏名：近藤格

所属機関：国立がん研究センター 創薬プロテオーム研究分野

研究者氏名：樊 嘉

所属機関：復旦大学中山医院外科

共同研究者：黄成、バイオマトリックス研究所

要旨

肝細胞癌は本邦でも中国でも悪性腫瘍による死亡原因としては主要な位置を占めている。肝細胞癌の患者の予後は一般にきわめて不良であり、新しい予防、診断、治療法の開発が求められている。遺伝背景を共有する日本と中国とが協力し、肝細胞癌の治療成績の向上を目指した研究にあたることは、国民の健康福祉の向上のみならず、両国の将来をともに形作ることにもつながるため重要な課題である。国立がん研究センターでは、かねてから復旦大学中山医院と共同で肝細胞癌の治療成績の向上を目指した基礎研究を行ってきた。臨床的には肝細胞癌では手術後の再発が大きな問題となっている。再発する臓器としては肝臓がもっとも多く、早期に肝内再発（転移）を来す症例の予後はきわめて不良である。肝内再発の分子機構を解明し、肝内再発を予測して未然に防いだり、肝内再発を見越した治療戦略を立てることによって、肝細胞癌の治療成績の向上が見込まれると考えられている。

国立がん研究センター研究所では、悪性腫瘍を対象とした大規模なプロテオーム解析が行われてきた。大型の二次元電気泳動装置や質量分析装置を用いた一般的なプロテオーム解析に加え、多数の抗体を用いた解析を行っていることが特色である。具体的には、転写因子やアポトーシス構成因子など、悪性腫瘍の発生や進展に関わることがわかっている分子経路に含まれているタンパク質について抗体を入手し、ウェスタンブロッティングを行うことで発現解析を行うというものである。一般的なプロテオーム解析では微量なタンパク質（たとえば転写因子など）を観察することはきわめて困難であり、しかも特定の分子パスウェイに含まれるタンパク質に的を絞って解析することはほぼ不可能である。しかしながら、抗体を用いた解析であれば可能である。たとえば、目的とする分子パスウェイに含まれるタンパク質すべてについて一つずつ抗体を使って調べることでパスウェイワイドな解析が可能になる。国立がん研究センター研究所ではいくつかの学術機関や民間企業との共同研究によって多数の抗体が使用できる環境にあり、このたびの研究ではその抗体を用いた解析を実施した。具体的には約600種類の核内因子に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングを実施した。

復旦大学中山医院は、中国でもっとも肝細胞癌の切除術が多く行われている医療機関であり、

年間約2000症例が肝細胞癌の手術を受けている。臨床のみならず手術検体を用いた基礎研究でも実績をあげている。術後の追跡調査も十分に行われており、臨床情報を用いた研究が可能である。

本研究では、国立がん研究センターのユニークなプロテオーム解析システムと復旦大学の臨床検体を用いて、肝細胞癌の早期再発に関わる核内因子を網羅的に調べた。結果的に、早期再発に関わると考えられる核内因子24種類、発癌に関わると考えられる核内因子148種類と特定した。免疫染色は中国国内でしかできないため、現在復旦大学にて組織アレイを用いた解析を実施中である。

Key Words: hepatocellular carcinoma, proteomics, western blotting, early intrahepatic recurrence, nuclear factors

緒言

肝細胞癌の治療成績の向上のための基礎研究として、早期の肝内再発に着目した研究はきわめて重要である。肝細胞癌は予後不良な疾患であるが、早期に再発を来す症例の予後はきわめて不良であること、さらに早期に再発を来す症例が多いこと、などからである。本研究では、国立がん研究センターのプロテオーム解析技術と、復旦大学中山医院の手術検体および臨床情報を用いた解析を実施した。

対象と方法

対象としたのは、復旦大学中山医院において肝細胞癌の根治切除術を施行された症例であり、手術検体を用いた解析を行った。手術検体としては、腫瘍組織50検体および非腫瘍組織50検体を使用した。手術検体はかならずしも同一の症例に由来するものだけではない。臨床検体を医学研究の目的に使用することについて文書による同意を提供者から得ている場合にのみ、検体を使用した。また、本研究は、復旦大学の倫理委員会の承認および国立がん研究センターの倫理委員会の承認を得て実施した。

発現解析の目的で、579種類の市販モノクローナル抗体を使用したウェスタンブロッティングを行った。国立がん研究センターと共同研究契約を締結しているバイオマトリックス研究所の抗体を使用した。手術検体より高濃度のウレアを含むバッファー（7M urea, 2M thiourea, 3% CHAPS, 1% Triton X-100）にてタンパク質を抽出した。SDS-PAGEによってタンパク質を分子量にしたがって分離した。分離はディスパーザブルの市販のゲル（ATTO社製）を使用した。予測される分子量にしたがってゲルの濃度を決定した。次に、分離されたタンパク質を電気的に膜に転写した。転写されたタンパク質に対して上記の抗体を反応させ、化学発光（ECL-Plus, GE）によって抗原抗体複合体を検出した。検出系にはLAS-3000（富士フィルム）を使用した。検出されたシグナルの定量を画像解析ソフトを用いて行った。発現の有意性の基準は、p値が0.05より小さく、しかもグループ間の平均の差が2倍より大きいこととした。

組織アレイは復旦大学中山医院で作成されたものを使用した。上記のウェスタンブロッティングに使用した抗体を用いて組織アレイを対象に免疫染色を行った。免疫染色の判定は復旦大学中山医院の病理医および外科医が行い、その結果の確認を国立がん研究センターの共同研究者とともにに行った。

結果

手術後2年以内に再発を来した25症例と、2年以上の観察期間中に再発を来していない25症例の比較を行った。腫瘍組織どうしの比較においては、21種類の核内因子が有意な発現差を示していた。同様の比較を非腫瘍組織どうしに行うと、3種類の核内因子が有意な発現差を示していた。

非腫瘍組織（50検体）と腫瘍組織（50検体）の比較を同様にウェスタンブロッティングで行い、148種類の核内因子が有意な発現差を示していることがわかった。

次に、同定された核内因子が肝細胞癌および非腫瘍組織のどの細胞に発現しているかを確認する目的で、組織アレイを用いた解析を行った。まず、再発に関わるとして同定された上気の24種類の核内因子、腫瘍組織と非腫瘍組織の間で発現差が認められた26種類の核内因子について免疫染色を実施した。すべての抗体が免疫染色にて反応性を示したわけではないが、ウェスタンブロッティングと同様な発現差を示す核内因子が同定された。さらに興味深いことに、ウェスタンブロッティングにおいて腫瘍組織で発現が高いとして同定された核内因子の中には、腫瘍内の血管内皮細胞に特異的に発現するものが含まれていることが分かった。

考察

本研究において、肝細胞癌の再発に関わる核内因子、発癌に関わると考えられる核内因子を同定することができた。核内因子はヒトゲノム上には約2000種類がコードされていると考えられている。我々は今回、その約3分の1を調べたことになる。このような解析は抗体を用いてのみ可能であるが、同様の解析が実施できる研究室は国立がん研究センター以外には国内外に存在しない。また、今回は臨床情報が付随した100検体の手術検体を使用した。国内では肝細胞癌の手術数は減っており、再発の情報が付加されたこれだけの数の手術検体を研究に使用することはかなり困難である。したがって、本研究は日本と中国のそれぞれの長所を活かした研究であると言える。

核内因子の異常がどのような遺伝子発現の異常を引き起こし、ひいては腫瘍細胞の形質に影響を与えているのかを調べるのが今後の課題である。その目的では、siRNAを用いて対象とする核内因子の発現を低下される実験を肝細胞癌の培養細胞を用いて実施しているところである。また、同定された核内因子がどのように臨床上有用であるのかを調べるのが最終的な目的であり、そのためには上記の機能解析の実験に加え、さらに多数症例にあたる必要がある。

今回の研究成果をもとにして、現在、復旦大学において組織アレイを用いた大規模な検証実験を行っているところである。対象とする核内因子は上記の50種類だけでなく、今回の解析で

発現差があると認められたものすべてである。

日本と中国との共同研究が、本研究助成金をもとにさらに発展し、両国の共同研究の成果として肝細胞癌の治療成績の向上を宣言できる日を目指してこれからも研究に励みたいと考えている。

2011年3月15日