

Title	Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma provides deeper biological insight from genomic data
Author(s)	橘高, 信義
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49832">https://hdl.handle.net/11094/49832</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	橘 高 信 義
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 22774 号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma provides deeper biological insight from genomic data (肝細胞癌における網羅的遺伝子解析と分子間ネットワーク解析から得られるより深い分子生物学的知見)
論文審査委員	(主査) 教授 土岐祐一郎 (副査) 教授 森 正樹 教授 野口眞三郎

## 論文内容の要旨

## 〔 目 的 〕

近年、DNAチップ技術の進歩・普及とともに膨大な量の遺伝子発現情報が蓄積されるようになってきた。網羅的遺伝子発現解析によって得られる多数の遺伝子の変動は、分子間相互作用により連動しているものが多く、文献情報により構築された分子間ネットワークのデータベースへ照合させることにより、既知のpathwayと関連する癌化シグナルの特徴的な遺伝子集合として抽出することが可能となる。今回われわれは、100例の原発性肝細胞癌を対象に網羅的なヒト全遺伝子発現解析に分子間ネットワーク解析を組み合わせ、肝細胞癌の発育・進展に特徴的発現を示す遺伝子を同定するとともに、その蛋白発現と臨床的意義について検証した。

## 〔 方法ならびに成績 〕

ヒト全遺伝子型DNAチップ (Ace-Gene Human 30K; DNA Chip Research Inc.) を用い、7例の正常肝から抽出したmRNAのmixtureをcontrol referenceとして、Stage Iから Stage IVAの肝細胞癌100例の網羅的遺伝子発現情報を取得した。次に、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity systems, Mountain View, CA; <http://www.ingenuity.com>) を用い、DNAチップで得られた遺伝子発現情報をup loadし、各遺伝子の発現量と相関を分子間ネットワークとして視覚的に認識、整理した。特に高発現している遺伝子が集中する領域を、癌に関連する重要なシグナルが含有されている可能性が高いという観点からhotspot regionとして着目した。それぞれのhotspotにおいて既存のpathwayに関与深い遺伝子に対して、定量的RT-PCRによりその発現定量性を確認し、さらにモノクローナル抗体を用いた免疫染色法により個々の蛋白レベルでの発現を検討した。

## 〔 結 果 〕

ネットワーク解析から比較的高発現遺伝子が多く集中する2か所のhotspot (1, 2) に着目した。hotspot1にはintegrin signalに関連する遺伝子群が多く含まれており、そのうち癌部で1.5倍以上高発現しているOsteopontin (SPP1)、Glypican3 (GPC3) を肝細胞癌の発育・進展に関与深いkey遺伝子として同定した。また、hotspot2に関しては、Akt/NF-kB signalに関連する遺伝子が多く含まれ、同様に、Annexin2 (ANXA2)、S100A10、Vimentin (VIM) をkey遺伝子として同定した。定量的RT-PCRにより無作為に選んだ20例を対象に上記5遺伝子はいずれも高発現することが確認された。次に、DNAチップデータにて100例中80例以上で高発現の認められたGPC3、ANXA2、S100A10に関してそれぞれの蛋白発現を調べた。文献上肝細胞癌で重要な役割を担うと注目されているGPC3は、10例中7例にて癌部での高発現が認められ、とくに細胞質が良く染まる傾向にあった。また今回、新規に肝臓癌関連遺伝子として同定したANXA2とS100A10は、ANXA2は20例中16例で、S100A10は20例中17例にて癌部での高発現が認められ、染色パターンはほぼ同様に細胞質から特に細胞膜で高発現していることが認められた。さらに、hotspotの活性化と肝臓癌の発育・進展の関連性について、hotspotに含まれる各遺伝子の発現パターンと臨床病理学的因子を比較検討した。hotspot1を構成する遺伝子を用いて肝細胞癌100例の再クラスター解析を行うと、大きく3つのグループに分かれ、高発現しているグループからそれぞれGroupA1, A2, A3として、臨床病理学的因子との関連性について調べた。まず予後との比較から、遺伝子レベルで活性化していると考えられるGroupA1のほうがA3に比して、Disease Free Survival, Overall Survivalのいずれにおいても予後の悪いことがわかった。腫瘍病理学的因子との関連性についても、より活性化していると考えられるGroup A1のほうで、有意に肝内転移が多く、腫瘍径が大きく、そして病理学的にも低分化の傾向が認められた。また、Hotspot2でもほぼ同様の結果が得られた。

## 〔 総 括 〕

DNAチップと遺伝子ネットワーク解析を組み合わせ、高発現遺伝子の集中する領域に着目することで、効率的に肝細胞癌の発育・進展に関与深い分子の検索・同定が可能となってきた。今回我々は、すでに癌関連分子として報告されているGPC3以外にも、新規の癌関連蛋白としてANXA2、S100A10の同定に成功した。

## 論文審査の結果の要旨

網羅的遺伝子発現解析によって得られる多数の遺伝子の変動は、分子間相互作用により連動しているものが多い。これを文献情報により構築された分子間ネットワークへ適応させることにより多数の遺伝子変動はいくつかの癌化シグナルのクラスターとして集積する。今回われわれは、100例の原発性肝細胞癌を対象に網羅的なヒト全遺伝子発現解析に分子間ネットワーク解析を組み合わせ、肝細胞癌に特徴的な遺伝子を同定するとともに、その蛋白発現と臨床的意義について検証した。まず癌部で高発現する遺伝子がネットワーク上集積する領域 (hotspot) が、主にintegrinやAkt/NF-kB パスウェイなど癌の発育・進展に関わる遺伝子群より構成されることを確認した。ついで各パスウェイで中心的なkey遺伝子としてGPC3、ANXA2、S100A10を同定し、組織免疫染色にてそれらの癌部での発現亢進を確認するとともに、各パスウェイを構成する遺伝子レベルでの変動が臨床的な予後、病理学的因子にも関与することを確かめた。このような複合的解析は、臨床的にも意義深い新規の癌関連蛋白の同定に寄与するものと考えられ、学位に値するものと認める。