

主論文の要旨

***CCNJ* detected by triple combination array  
analysis as a tumor-related gene of  
hepatocellular carcinoma**

〔トリプルアレイ法を用いた肝細胞癌における新規癌関連遺伝子  
としての *CCNJ* 遺伝子の抽出と検討〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

高野 奈緒

## 【緒言】

肝細胞癌（HCC）は原発性肝癌の 80-90%を占め、予後不良の癌である。今日、画像による診断技術や新しい治療法の進歩により予後は改善されてきたが、依然術後の再発率は高く、その多くは残肝再発であり、HCC の発癌過程に関与する癌関連遺伝子の分子生物学的アプローチによる同定は治療成績の向上につながると考えられる。我々はこれまでに、メチル化アレイ、発現アレイ、Single nucleotide polymorphism (SNP) アレイを組み合わせたトリプルアレイ法により新規 HCC 関連遺伝子の抽出し、報告してきた。今回我々は、トリプルアレイ法を用いて新たに Cyclin J (*CCNJ*) 遺伝子を新規癌関連遺伝子として抽出し、HCC 患者における臨床病理学的因子、予後との相関について検討した。

## 【対象と方法】

68 歳女性、背景に慢性 C 型肝炎のある HCC 患者の手術標本の癌部、非癌部検体に対し、トリプルアレイ法を用いて癌関連候補遺伝子として *CCNJ* 遺伝子を抽出した。同遺伝子の発現を制御する機序はプロモーター領域のメチル化であると仮定し、抽出された候補遺伝子に対して、9 種類の HCC 細胞株及び当教室にて 1994 年から 2001 年までに肝切除を施行した 85 例の HCC 患者の癌部、非癌部の検体を用い、メチル化特異的 PCR (MSP)、及び定量 RT-PCR にて評価を行った。定量 RT-PCR では非癌部、癌部での発現が変わらないことが証明されている GAPDH をコントロールに用いた。さらに、臨床病理学的因子、予後との相関について検討した。

## 【結果】

68 歳女性の HCC 切除標本におけるトリプルアレイ法では、*CCNJ* 遺伝子は、メチル化アレイにおいて、非癌部のメチル化値は 0.112 であるのに対し、癌部ではメチル化値 0.906 と強いメチル化を認めた (Table 1)。発現アレイにおいては、癌部における *CCNJ* 遺伝子の発現は非癌部と比べ高度な低下を認めた ( $\log_2$  ratio -2.3) (Table 2)。また、SNP アレイでは遺伝子座 10q24.1 のコピー数は正常であり (Table 3)、LOH は認めなかった (Figure 1)。これら結果により、*CCNJ* 遺伝子の癌部における発現低下にはメチル化が関与していると考えられ、HCC 細胞株及び切除症例 85 例における検討を行った。

HCC 細胞株は、HepG2, Hep3B, HLE, HLF, HuH1, HuH2, HuH7, PLC/PRF/5, SK-Hep1 の 9 種類を用いて検討を行った。MSP では、HepG2, HLF, SK-Hep1 の 3 種の細胞株にてメチル化を認めた (Figure 2A)。これらの細胞株に 5-aza 処理を施すと、*CCNJ* 遺伝子の発現回復が確認された (Figure 2B)。また、MSP でメチル化を認めた SK-Hep1 と、メチル化を認めなかった Hep3B についてバイサルファイトシークエンスを行うと、SK-Hep1 ではほぼ全てが CG であり、Hep3B では、TG であったことより、MSP は正しく働くことが確認された (Figure 3)。

続いて手術症例 85 例について検討を行った。患者背景は、年齢中央値: 61.6 歳 (21-

77 歳), 男女比 : 72 : 13, C 型肝炎 : 61 例, B 型肝炎 : 16 例であり, 観察期間中央値 : 63.4 ヶ月 (2.3- 208.9 ヶ月) であった. MSP では, 67 例 (78.8%) に癌部での *CCNJ* 遺伝子のメチル化を認めた. また, *CCNJ* 遺伝子は非癌部に対し癌部にて有意な発現低下を認めた ( $P < 0.0001$ ) (Figure 4). 癌部でのメチル化を認めた症例では, *CCNJ* 遺伝子の著明な発現低下を認めた ( $P = 0.003$ ) (Figure 5). さらに, 癌部での *CCNJ* 遺伝子のメチル化を認め, かつ *CCNJ* 遺伝子の発現低下を認めた症例では, 有意な全生存期間の低下を認めた ( $P = 0.038$ ) (Figure 6).

### 【考察】

*CCNJ* 遺伝子はサイクリンファミリーのひとつである. サイクリンファミリーは, 細胞周期の制御に関わることが分かっており, G2 期から M 期への移行には CDK1 とサイクリンとの複合体, G1 期から S 期への移行には CDK2 とサイクリンとの複合体が必要である. ほ乳類では 20 種類以上が同定されており, 機能解析が進んだものに関しては発癌に関わる報告がなされている. HCC においては, *CCND1*, *CCNE* と発癌との関連が報告されており, 細胞周期のチェックポイントの障害により, HCC の発生に関与しているとの報告がある. *CCNJ* は, ショウジョウバエの胚の S 期において, CDK2 と複合体として発見されたが, ヒトにおける機能は不明であり, 発癌に関する報告はほとんどない.

サイクリンファミリーの多くは細胞周期のチェックポイント機構に関連するものであり, その過剰発現は癌の増殖を来す報告が多いが, 一方で, *CCNG2* については胃癌, 大腸癌, 腎癌, 甲状腺癌などで進行度や組織学的悪性度の高いもの, 予後の悪いもので発現低下が報告されており, 癌抑制遺伝子としての働きが示唆されている. *CCNG2* は他のサイクリンファミリーと異なり, Protein Phosphatase 2A (PP2A) と結合し, CDK2 を阻害することで G1 期から S 期への移行を制御し, 細胞周期に対し抑制的に働くとされている.

今回我々は, HCC 検体における癌部での *CCNJ* の有意なメチル化及び発現の低下を確認した. また, *CCNJ* の癌部でのメチル化, かつ発現量の低下を認めた症例では有意な予後の増悪を認めており, *CCNJ* も *CCNG2* と同様に, 細胞周期を抑制的に制御することで, HCC の進行に抑制的に働く遺伝子である可能性が示唆された.

### 【結論】

今回我々は, HCC の癌関連遺伝子として, トリプルアレイ法を用いて *CCNJ* 遺伝子を同定した. *CCNJ* 遺伝子は HCC の新しい予後予測遺伝子である可能性が示唆されるとともに, その発現低下にはメチル化が関与していると考えられた. *CCNJ* 遺伝子のメチル化は HCC の 79.8 % で確認され, 汎用性のあるバイオマーカーとして活用できる可能性があると考えられた. また, トリプルアレイ法は新規癌関連遺伝子の抽出に有用であると考えられた.