
肝細胞癌においてメチル化により発現が抑制されている
遺伝子の網羅的検討

(13670490)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

千葉大学附属図書館



20003814427

平成15年3月

研究代表者 今関 文夫

(千葉大学大学院医学研究院 講師)

は し が き

研究組織

研究代表者：今関 文夫（千葉大学大学院講師）
研究分担者：横須賀 収（千葉大学大学院講師）
研究分担者：深井 健一（千葉大学医学部医員）

研究経費

平成13年度	1,700 千円
平成14年度	1,700 千円
計	3,400 千円

研究発表

（1）学会誌等

Sumi H, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology*. 2003;37:19-26.

Kawai S, et al. Evaluation of the clinical usefulness of COBAS AMPLICOR HCV MONITOR assay (ver2.0): Comparison with AMPLICOR HCV MONITOR assay (ver1.0) and HCV core protein level. *J Med Virol*. 2002;68:343-51.

Kawai S, et al. State of HBV DNA in HBsAg-negative, anti-HCV-positive hepatocellular carcinoma: existence of HBV DNA possibly as nonintegrated form with analysis by Alu-HBV DNA PCR and conventional HBV PCR. *J Med Virol*. 2001;64:410-8.

（2）口頭発表

深井 健一、横須賀 収、今関 文夫、税所 宏光。肝癌細胞株においてメチル化異常により発現が抑制されている遺伝子群の検討-cDNA マイクロアレイを用いて-。第5回日本肝臓学会大会 平成13年10月17日。

新井 誠人、千葉 哲博、横須賀 収、税所 宏光、関 直彦、深井 健一、田川 まさみ、今関 文夫。肝再生における gene expression profile。第88回日本消化器病学会総会 平成14年4月25日。

新井 誠人、横須賀 収、関 直彦。肝癌細胞株における脱メチル化剤処理の影響：In-house マイクロアレイを用いた経時的解析。第6回日本肝臓学会大会



102
KAN
学術部
蔵

平成14年10月24日。

千葉 哲博、深井 健一、横須賀 収。肝細胞癌における epigenetic な修飾により発現が抑制されている遺伝子の検討。第44回日本消化器病学会大会 平成14年10月24日。

(3) 出版物 なし

千葉大学附属図書館



20003814427

要旨

種々の癌において転写調節領域の異常メチル化により発現が低下し、発癌と関連すると考えられる複数の遺伝子が報告されている。肝細胞癌においても p16INK4a 遺伝子の異常が報告されているが、他にも複数の遺伝子が同様の機序により発現が低下している可能性がある。そこで、メチル化酵素阻害剤と cDNA マイクロアレイを用い、異常メチル化に伴う転写抑制が認められる遺伝子の検討を行なった。6 種類の肝癌培養細胞 (HLE, HuH7, HepG2, PLC/PRF/5, Hep3B, HuH6) をメチル化酵素阻害剤 5-azaCdR 処理の前と後で抽出、精製した poly(A)⁺ RNA を標識してプローブとした。癌に関連する既知の遺伝子 557 個がスポットされた cDNA マイクロアレイを用い、5-azaCdR 処理により発現が上昇する遺伝子を解析した。プロモーター領域 CpG 配列のメチル化を確認するため、抽出した DNA を sodium bisulfite で処理後、塩基配列を決定した。また、一部の遺伝子についてはメチル化特異的プライマーにより肝細胞癌標本の癌部、非癌部におけるメチル化を検討した。上記 6 種類の各培養細胞において 5-azaCdR 処理により 5 倍以上発現が増加していた遺伝子は、それぞれ 11、14、9、7、11、19 種類であった。これら遺伝子の中で複数の培養細胞株で 5 倍以上発現が増加していた遺伝子は 14 個で、そのうち転写調節領域の CpG アイランドに異常メチル化がみられたのは E-cadherin、HAI 2、IGFBP2、COL1A2、CTGF、Fibronectin 1 の 6 種類の遺伝子であった。このうち HAI 2 では、高頻度に癌部特異的に異常メチル化が認められた。メチル化酵素阻害剤と cDNA マイクロアレイを組み合わせることにより、異常メチル化により転写が抑制されている遺伝子の網羅的解析が可能であった。その中で、HAI 2 は HGF の活性を抑制すると考えられており、異常メチル化による発現抑制を介して、癌の増殖や浸潤に関与する可能性が示唆された。

はじめに

我が国における肝細胞癌の年間死亡者は約3万5千人で、男性では第3位である。その肝細胞癌の90%以上が肝炎ウイルスの持続感染にともなう慢性肝炎、肝硬変を発生母地としており、B型肝炎ウイルス (HBV) が約15%、C型肝炎ウイルス (HCV) が約80%を占める。肝細胞癌における発癌機構については、ウイルス発癌と遺伝子異常の観点から種々検討されている。

B型肝炎ではウイルスDNAが高頻度に染色体DNAに組み込まれている。我々も以前に、サザンブロット法により12例全例にHBVDNAが組み込まれていることを示した¹⁾。また、ノーザンブロット法により、組み込まれたウイルス遺伝子と隣接する宿主遺伝子の融合遺伝子と考えられるRNAの存在を報告した²⁾。これらウイルス遺伝子の組込みは染色体の転座を引き起こしたり、稀ではあるが隣接する遺伝子にシスに働いて発現に異常をきたす可能性がある。HBVのX蛋白は宿主遺伝子にトランスに働いて発現を活性化することがわかっており、X蛋白発現トランスジェニックマウスでは肝癌の発生が報告されている³⁾。一方、C型肝炎ではB型と異なりウイルス核酸の染色体への組み込みはなく、ウイルスの産生するコア蛋白やNon-structural (NS) 3蛋白にTransformation活性が、NS5Aのアミノ端を欠いた蛋白にtransactivation活性が報告されている。また、HCV core 蛋白発現トランスジェニックマウスで高率な肝細胞癌の発生が報告されている⁴⁾。

遺伝子異常に関しては、多くの肝細胞癌で染色体の欠失や癌抑制遺伝子 p53 や Rb 遺伝子などの異常が報告されている。p53 は細胞周期とアポトーシスの制御に関連するキーとなる遺伝子で、殆どの癌で約50%の異常が報告されている。我々の以前の検討⁵⁾ では、肝細胞癌 20 例中 p53 遺伝子の点突然変異は 3 例 (15%) にみられ、コドン 176 (エクソン 5)、コドン 236 (エクソン 7)、コドン 294 (エクソン 8) の 3 ケ所であった。p53 遺伝子のある染色体 17p の LOH (Loss of heterozygosity) は 14 例中 5 例 (36%) に認められ、全体では 20 例中 6 例 (30%) に異常がみられた。p53 の異常は、腫瘍径 3 cm 以上の進行した肝癌にみられ、肝癌進展の後期に関与する遺伝子異常と考えられた。肝発癌の初期に関与する遺伝子異常に関しては良くわかっていない。近年、プロモーター領域の異常メチル化による遺伝子発現の低下が発癌、特に初期の病態に関与しているのではないかとされている。Rb 蛋白の機能を調節する CDK4/6 の活性を抑制する p16INK4a は癌抑制遺伝子と考えられており、肝細胞癌ではこの遺

伝子の変異は殆どみられず、プロモーター領域の異常メチル化による遺伝子の発現低下が関与していると報告されている。我々の検討⁶⁾でも、肝癌 39 例のうち癌部では 27 例 (69%) に異常メチル化が認められたが、非癌部では 23 例中 1 例 (4%) のみであった。

癌細胞では、一般に遺伝子全体で見ると CpG アイランドの低メチル化がおきている⁷⁾が、癌抑制遺伝子など特定の遺伝子の転写調節領域の異常メチル化による発現低下が種々の癌の発生に密接に関連していることが示されている。肝細胞癌でも、p16INK4a 遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化が高頻度に認められるが、他にも同様の機序で複数の遺伝子の発現が抑制されている可能性がある。そこで、メチル化酵素阻害剤と cDNA マイクロアレイを用い、6 種類の肝癌細胞株において異常メチル化に伴う転写抑制が認められる遺伝子の検討を行なった^{8、9)}。

対象および方法

1) 培養細胞と 5-azaCdR 処理

6 種類の肝癌培養細胞 (HLE, HuH7, HepG2, PLC/PRF/5, Hep3B, HuH6) は、10%牛胎児血清と 1%ペニシリン/ストレプトマイシン含んだ DMEM 培養液を用い、5%CO₂ を含む大気下で 37°C で培養した。メチル化酵素阻害剤である 5-Aza-2-deoxycytidine (5-azaCdR) は 1 μM にて 96 時間培養液中に加えた。5-azaCdR を含んだ培養液は 24 時間毎に交換した。

2) cDNA マイクロアレイによる解析

6 種類の肝癌培養細胞から AGPC 法で total RNA を抽出し、oligo dT カラムを用いて poly(A)⁺RNA を精製した。1 μg の poly(A)⁺RNA を鋳型とし、AMV Reverse Transcriptase による逆転写反応で Cy3-dUTP を取り込ませプローブとした。同様に、5-azaCdR 未処理の培養細胞から得られた poly(A)⁺RNA は Cy5-dUTP で標識した。これらを混合し、癌に関連する既知の遺伝子 557 種類がスポットされた cDNA マイクロアレイ (宝酒造) 上でハイブリダイゼーションを行い、5-azaCdR 処理により発現が上昇する遺伝子を解析した。

3) Sodium bisulfite 遺伝子シーケンス法

遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化状態を調べるために、肝癌培養細胞から抽出した DNA 1 μg を Herman らの方法¹⁰⁾ で 50°C 18 時間 bisulfite 処理を行なった後、PCR 法で増幅した。PCR 産物は、TOPO TA クローニングベクター (Invitrogen) を用いてクローニングし、それぞれ 10 個ずつのクローンを ABI PRISM Dye Deoxy Terminator Cycle sequencing キット (Applied Biosystems) で反応し、ABI 377 DNA Sequencer を用いて塩基配列を決定した。

4) メチレーション特異的 PCR 法

外科的切除により得られた 10 例の肝細胞癌症例の癌部、非癌部の凍結組織より抽出した DNA を用いて、遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化状態を調べた^{8, 9)}。

成績

1. cDNA アレイの結果

6種類の培養細胞（HLE, HuH7, HepG2, PLC/PRF/5, Hep3B, HuH6）において5-azaCdR 処理により5倍以上発現が増加していた遺伝子は、それぞれ11、14、9、7、11、19種類であった。これら遺伝子の中で複数の培養細胞株で5倍以上発現が増加していた遺伝子は14個で、HGF-activator inhibitor type 2 (HAI 2)、E-cadherin、COL1A2 (procollagen type I alpha 2)、IGFBP2 (insulin-like growth factor binding protein-2)、CTGF (connective tissue growth factor)、FN1 (fibronectin 1)、CyclinA2、ITGAV (Integrin α V)、RHAMM (hyaluronan-mediated motility receptor)、CSE1L (chromosome segregation 1-like)、Lumican、RhoGDI (Rho-dissociation inhibitor beta)、COL3A1 (collagen type III alpha 1)、Osteonectin であった。

上記14個の遺伝子についてプロモーター領域にメチル化の標的となる CpG アイランドが存在するかどうかを調べたところ、Lumican、RhoGDI、COL3A1、Osteonectin の4個の遺伝子には存在しないことが解り、これら遺伝子の発現上昇は2次的なものであると考えられた。

CpG アイランドを有する10個の遺伝子のメチル化酵素阻害剤処理後の発現の変化を表1に示す。数倍から数百倍の遺伝子発現量の変化がみられ、細胞により異なり多様であった（文献ふかい）。マイクロアレイの結果を確認するため5-azaCdR 処理前後の細胞から抽出した total RNA を用いて RT-PCR 法により遺伝子発現量の変化を検討したところ、脱メチル化剤処理によりこれらすべての遺伝子発現が上昇していることが確認された（data not shown）⁹⁾。

2. プロモーター領域メチル化状態の検討

プロモーター領域の異常メチル化が直接転写の抑制に関与しているかどうかを確認するため、sodium bisulfite 遺伝子シーケンス法によりプロモーター領域の CpG 配列のメチル化の検討を行なった。10個の遺伝子のうち CyclinA2、Integrin α V、hyaluronan-mediated motility receptor、chromosome segregation 1-like の4個は、どの培養細胞においても殆どメチル化が認められず、脱メチル化剤処理による遺伝子発現の上昇は2次的なものであると考えられた。

HAI 2 遺伝子プロモーター領域の CpG アイランド の解析では、5-azaCdR 処理により著明に発現量の増加した HLE、HuH7、Hep3B においては高度にメチル化が

認められたが、HepG2、HuH6 においてはメチル化が一定の領域と一部のクローンに限定されていた。一方、PLC/PRF/5 ではプロモーター領域のメチル化はほとんど認められなかった。従って、各細胞におけるメチル化の頻度はマイクロアレイの結果と良く相関していた⁹⁾。

E-cadherin は 5-azaCdR 処理により HepG2 では 8.7 倍に増加しメチル化の程度と良く相関していたが、他の 5 種類の肝癌細胞では低メチル化状態であった。従って、HuH7 を含め他の培養細胞で発現上昇がみられた要因としては 5-azaCdR 処理による 2 次的な遺伝子発現の変化による可能性が考えられた⁸⁾。

HLE と Hep3B ではプロモーター領域の一部にメチル化が認められ、もともとの IGFBP2 遺伝子の発現量は低かったが、脱メチル化剤処理により Hep3B では発現量の増加がみられた。HepG2 では高度なメチル化がみられたが、脱メチル化剤処理により遺伝子発現の上昇は認められなかった。HuH7、PLC/PRF5、HuH6 ではプロモーター領域のメチル化は認められず、脱メチル化剤処理後の上昇は 2 次的なものと考えられた⁸⁾。

HuH6 は CTGF 遺伝子プロモーター領域に高度のメチル化がみられ、脱メチル化剤による発現の増加が認められたが、HLE、HuH7、Hep3B、PLC/PRF/5 にはメチル化は認められず、脱メチル化剤による発現上昇は 2 次的なものと考えられた⁸⁾。

FN1 はどの培養細胞でも高度のメチル化がみられたが、Hep3B と HuH6 ではもともとの発現量が高く、他の 4 種類の細胞と Hep3B では脱メチル化剤により発現の増加が認められた⁸⁾。

Bisulfite sequencing 法によるプロモーター領域の DNA メチル化を検討した代表例として、COL1A2 遺伝子の結果を Figure 1 に示す。COL1A2 は、マイクロアレイの結果では 5-azaCdR 処理により HuH7、Hep3B、PLC/PRF/5 の 3 種類の細胞で発現量が 5 倍以上増加していた (Table 1)。プロモーター領域の CpG アイランドの解析では、もともと発現量が低く 5-azaCdR 処理により発現量の増加した Hep3B、PLC/PRF/5 では比較的高度にメチル化が認められたが、もともと発現量が高かった HuH7 ではメチル化の程度は軽かった。HepG2、HuH6、HLE は 5-azaCdR 処理により発現量の増加は軽度であったが、メチル化の程度は HuH6、HLE は軽度であったのに対し、HepG2 では比較的高度のメチル化がみられた (Figure 1)。

3. ヒト肝癌組織における遺伝子メチル化状態の検討

肝細胞癌 10 例における HAI 2 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を、凍結肝組織から抽出した DNA を用いてメチレーション特異的 PCR 法により検討した。HAI 2 遺伝子は癌部では 8 例がメチル化状態であるのに比し、非癌部では 1 例のみがメチル化状態であり、臨床検体においても癌部では高率にメチル化が認められることがわかった (Table 2)。代表例を Figure 2 に示す。症例 1 では癌部にのみメチル化がみられ、症例 2 では癌部、非癌部ともに非メチル化の状態であった。他の COL1A2、IGFBP2、CTGF、FN1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態は、IGFBP2 が癌部で高頻度であったが、非癌部でも同等で差がみられなかった。しかし、メチル化特異的な PCR のバンドはほとんどの症例で癌部の方が非癌部より明らかに強く認められた。

考察

近年、cDNA マイクロアレイと DNA メチル化阻害剤を用いて大腸癌で発現の上昇する遺伝子の網羅的検討が報告されている¹¹⁾。今回我々は、5-azaCdR 処理した肝癌培養細胞としない細胞で、557 の癌関連遺伝子の発現の違いをマイクロアレイを用いて比較した。557 個の遺伝子のうち脱メチル化剤処理により複数の培養細胞株で発現が 5 倍以上上昇した遺伝子は 14 個 (2.5%)、そのうちプロモーター領域に CpG アイランドを有する遺伝子は 10 個 (1.8%)、さらにその CpG アイランドのメチル化により遺伝子発現が抑制されていると考えられた遺伝子は 6 個 (1.1%) であった。

その 6 個の遺伝子の中で、HAI 2 は HGF activator 活性の抑制を介して Hepatocyte growth factor の活性を抑制すると考えられており、その遺伝子発現が多く肝癌培養細胞と肝細胞癌組織で異常メチル化により抑制されていることが示された。その結果として細胞増殖促進、細胞運動促進、抗アポトーシス作用を有する HGF 活性の制御が不十分となり、癌の増殖や浸潤に関与するのではないかと考えられた。最近、ヒト脳腫瘍 glioblastoma でも組織分化度が低くなるにつれ HAI 2 遺伝子の発現が低下することが示されている。腫瘍培養細胞に HAI 2 遺伝子を導入すると細胞の浸潤性が抑制されることから、HAI 2 は細胞外基質を分解するプラスミンやセリンプロテアーゼ活性を直接抑制すると考えられている¹²⁾。

E-cadherin は上皮細胞の接着に関与し、細胞内で α -、 β -、 γ -カテニンとの結合を介して細胞骨格アクチンと結合している。E-cadherin 遺伝子は染色体 16q22.1 にあり、肝癌組織では高頻度でこの領域の LOH が認められており、またプロモーター領域のメチル化による遺伝子発現の低下と発癌との関連も既に報告されている¹³⁾。また E-cadherin の裏打ち蛋白の一つである β -カテニンは axin 1、APC、GSK3 β とともに、Wnt シグナル伝達系を介して細胞増殖に関与しているが、肝癌では約 3 割に遺伝子変異による異常が認められている¹⁴⁾。

他の 4 個の遺伝子は、ヒト肝癌組織で癌部だけでなく非癌部でも同程度にメチル化が認められたが、MSP によるバンドは癌部の方が強いことから、量的な違いが示唆された。また、正常肝から慢性肝炎の進展に伴い徐々にメチル化が生じている可能性もあり非癌部におけるメチル化の意義を検討する必要がある。COL1A2 遺伝子の発現は細胞の癌化に伴い減少し、これには遺伝子プロモーター領域のメチル化が関与していることが知られている¹⁵⁾。IGFBP はファミリーを

形成しており、IGF と血中で結合しその機能を調節していると考えられている。IGFBP2 は胎児肝や成人脳で発現が高く、ヒトの前立腺癌や脳腫瘍グリオブラストーマで強い発現が認められている¹⁶⁾。一方、食道癌では発現の低下が認められており¹⁷⁾、組織により働きが異なるのかも知れない。同じファミリーのIGFBP3 は肝細胞癌でプロモーター領域のメチル化による発現低下が報告されている¹⁸⁾。CTGF は様々な組織の線維化や瘢痕形成、創傷の治癒、血管新生、骨の形成などに関与している。TGF- β の下流にある遺伝子で、TGF- β の持つ種々の生理活性のうち特に線維化に関連した作用を起こすが、乳癌培養細胞ではアポトーシスにも関与していると報告されている¹⁹⁾。FN1 は細胞接着、細胞運動や細胞形態の維持に関わる糖蛋白で、多くの腫瘍細胞で発現の低下が報告されている。FN1 の発現減少により細胞接着の低下や接触阻止機構の喪失がもたらされ、腫瘍細胞に有利に働くと考えられる²⁰⁾。

557 個の遺伝子がスポットされたマイクロアレイから、異常メチル化により発現が直接抑制されている遺伝子 6 個 (1.1%) が抽出された。これら遺伝子の中には細胞の増殖、浸潤に関連した遺伝子があり、今後、これら遺伝子の機能異常と発癌との関連をさらに検討する必要がある。現在、4600 個の遺伝子がスポットされたマイクロアレイを用いて同様の検討を行ない、さらに数十の候補遺伝子が抽出されている。メチル化酵素阻害剤と cDNA マイクロアレイを組み合わせることにより、異常メチル化により転写が抑制されている遺伝子の網羅的解析が可能であり、候補遺伝子は今後さらに増えてくると考えられる。これら遺伝子の機能、発癌との関連を調べることにより、発癌機構の解明、肝癌の治療へつながると期待される。

文献

1. Imazeki F, Omata M, Yokosuka O, Okuda K. Integration of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1986; 58: 1055-1060.
2. Imazeki F, Yaginuma K, Omata M, Okuda K, Kobayashi M, Koike K. RNA transcripts of hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1987; 7: 753-757.
3. Koike K, Moriya K, Iino S, Yotsuyanagi H, Endo Y, Miyamura T et al. High level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1994; 19: 810-819.
4. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K et al. Hepatitis C virus core protein induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998; 4: 1065-1068.
5. Nose H, Imazeki F, Ohto M, Omata M. p53 gene mutations and 17p allelic deletions in hepatocellular carcinoma from Japan. *Cancer* 1993; 72: 355-360.
6. Fukai K, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H. Alteration of INK4 gene in human hepatocellular carcinoma. (in submission)
7. Lin C-H, Hsieh S-Y, Sheen I-S, Lee W-C, Chen T-C, Shyu W-C et al. Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 4328-4243.
8. Chiba T, Fukai K, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H. Comprehensive analysis of genes suppressed by hypermethylation in hepatocellular carcinoma using cDNA microarray. (in submission)
9. Fukai K, Yokosuka O, Chiba T, Hirasawa Y, Tada M, Imazeki F, Saisho H. Hepatocyte growth factor activator inhibitor-2/placental bikunin (HAI-2/PB) gene is frequently hypermethylated in human hepatocellular carcinoma. (in submission)
10. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:9821-9826.
11. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, Herman JG, Baylin SB. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet*. 2002; 31:141-149.
12. Hamasuna R, Kataoka H, Meng J-Y, Itoh H, Moriyama T, Wakisaka S et al. Reduced expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type-2/ placental bikunin (HAI-2/PB) in human glioblastomas: implication for anti-invasive role of

HAI-2/PB in glioblastoma cells. *Int J Cancer* 2001; 93: 339-345.

13. Kanai Y, Ushijima S, Hui A-M, Ochai A, Tsuda H, Sakamoto M et al. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 1997; 71: 355-359.

14. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8847-8851.

15. Sandmeyer S, Smith R, Kiehn D, Bornstein P. Correlation of collagen synthesis and procollagen messenger RNA levels with transformation in rat embryo fibroblasts. *Cancer Res* 1981; 41: 830-838.

16. Fuller GN, Rhee CH, Hess KR, Caskey LS, Wang R, Bruner JM et al. Reactivation of insulin-like growth factor binding protein 2 expression in glioblastoma multiforme: a reactivation by parallel gene expression profiling. *Cancer Res* 1999; 59: 4228-4232.

17. Hu YC, Lam KY, Law S, Wong J, Srivastava G. Profiling of differentially expressed cancer-related genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using human cancer cDNA arrays: overexpression of oncogene MET correlates with tumor differentiation in ESCC. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3519-3525.

18. Hanafusa T, Yumoto Y, Nouse K, Nakatsukasa H, Onishi T, Fujikawa T et al. Reduced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and its promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2002; 176:149-58.

19. Hishikawa K, Oemar BS, Tannert FC, Nakaki T, Luscher TF, Fujii T. Connective tissue growth factor induces apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7. *J Biol Chem* 1999; 274: 37461-37466.

20. Wolf M, El-Rifai W, Tarkkanen M, Kononen J, Serra M, Eriksen EF et al. Novel findings in gene expression detected in human osteosarcoma by cDNA microarray. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 123: 128-132.

表 1 プロモーター領域に CpG アイランドを有する遺伝子の脱メチル化剤 Aza-C 処理後の発現の変化

遺伝子名	肝癌培養細胞					
	HLE	HuH7	Hep3B	HepG2	PLC/PRF/5	HuH6
HAI 2	24.0	17.2	141	2.7	1.0	4.4
E-cadherin	1.9	5.8	3.0	8.7	4.4	0.8
COL1A2	4.4	14.7	25.3	1.7	7.4	2.1
IGFBP2	1.7	2.2	7.3	0.9	1.4	5.4
CTGF	5.2	4.5	3.2	1.6	2.1	6.8
FNI	5.4	2.0	4.1	5.6	2.2	1.1
Cyclin A2	2.0	753	6.8	5.4	8.6	0.4
ITGAV	6.0	10.3	0.4	3.1	4.8	1.3
RHAMM	3.7	6.7	1.2	9.0	7.7	0.5
CSE1L	6.0	6.0	0.5	3.1	4.8	1.3

表 2 ヒト肝細胞癌組織における各種遺伝子プロモーター領域のメチル化の検討

遺伝子	検体数	メチル化の認められた検体	
		癌部	非癌部
HAI2	10	8	1
COL1A2	10	4	5
IGFBP2	10	8	9
CTGF	10	1	3
FNI	10	3	4

Figure 1

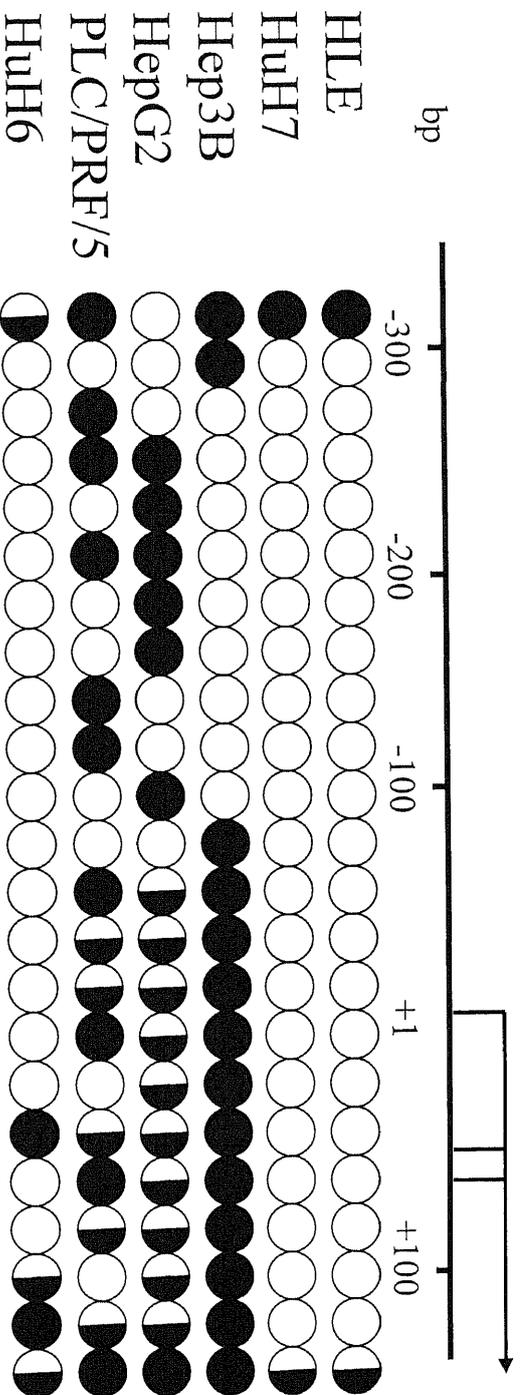
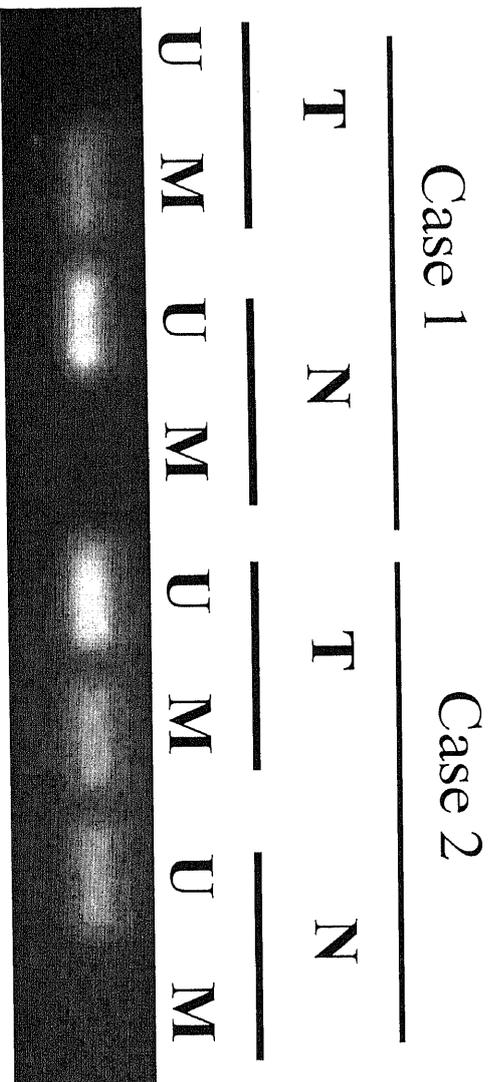


Figure 2



図の説明

図 1 COL1A2 遺伝子プロモーター領域 (-300~+100 塩基) の CpG 配列メチル化の検討。6 種類の肝癌培養細胞から抽出した DNA を sodium bisulfite で処理後、PCR 法で増幅しクローニングを行ない、10 クローンずつ DNA sequence を施行しプロモーター領域の CpG 配列のメチル化の検討を行なった。小さな○が1つの CpG に対応する。●はメチル化、○は非メチル化を示す。

図 2 ヒト肝細胞癌症例の HAI 2 遺伝子メチル化特異的 PCR による異常メチル化の検討。T、癌部；NT、非癌部；M、メチル化特異的 PCR；U、非メチル化特異的 PCR。症例 1 の癌部ではメチル化のみ、症例 2 の癌部ではメチル化と非メチル化のバンドが認められる。