

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-139742

(P2007-139742A)

(43) 公開日 平成19年6月7日(2007.6.7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574 Z N A A	2 G O 5 4
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 M	4 H O 4 5
<b>GO 1 N 33/536 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	
<b>GO 1 N 21/78 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/536 B	

審査請求 未請求 請求項の数 28 O L 外国語出願 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-112806 (P2006-112806)	(71) 出願人	502403420 財団法人奇美醫院 台湾台南縣永康市中華路901號
(22) 出願日	平成18年4月14日 (2006.4.14)	(74) 代理人	100065215 弁理士 三枝 英二
(31) 優先権主張番号	11/282, 888	(74) 代理人	100076510 弁理士 掛樋 悠路
(32) 優先日	平成17年11月18日 (2005.11.18)	(74) 代理人	100099988 弁理士 齋藤 健治
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	蔡 順 隆 台湾台南縣永康市中華路901號
		Fターム(参考)	2G054 AA06 CA22 CA23 CE02 EA03 GA04 4B063 QA19 QQ02 QQ53 QR32 QR55 QS16 QS25 QS34 QX02

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝細胞癌の素因および／または予後を決定するためのバイオマーカー

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma) (HCC) のバイオマーカーを提供する。

【解決手段】 肝内小結節を有するか有すると思われる被験体、特に、B型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスの少なくとも1つに感染した者における肝細胞癌 (HCC) の素因を決定するための方法、ならびにHCCを有するかまたは有すると思われる被験体の予後評価のための方法が開示され、ここで、Wnt-1がHCCのバイオマーカーとして使用される。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験体における肝細胞癌の素因 (predisposition) をインビトロで決定するための方法であって、

該被験体から採取した肝臓検体を腫瘍部分と非腫瘍部分へ分離すること；

該腫瘍部分と該非腫瘍部分における W n t - 1 発現のレベルをそれぞれ検出すること；

該腫瘍部分における W n t - 1 発現の検出レベルを該非腫瘍部分のそれと比較して、比率値を得ること；および

該被験体が、得られた該比率値に基づいて肝細胞癌に素因を有する (predisposed to) が否かを決定すること (ここで、該被験体は、得られた該比率値が 1 よりも大きい場合、肝細胞癌に素因を有すると決定される)

10

を包含する、方法。

## 【請求項 2】

前記被験体が、B 型肝炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルスの少なくとも 1 つに感染している、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記肝臓検体が、肝内小結節 (hepatic nodule) を含む前記被験体の肝臓の部分から採取される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記肝臓検体が、部分切除および右葉切除 (right lobectomy) から選択される外科手術によって前記被験体から採取される、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

前記肝臓検体が、肝生検、吸引 (aspiration) または腹腔鏡検査によって前記被験体から採取される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記非腫瘍部分のそれと比較した場合の、前記腫瘍部分における前記 W n t - 1 発現の検出レベルの増加が、NF - B 活性化と関連している、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記 W n t - 1 発現のレベルが、W n t - 1 遺伝子の m R N A 転写物を定量することによって検出される、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 8】

W n t - 1 遺伝子の m R N A 転写物の定量が、以下の方法：ハイブリダイゼーション、ノーザンブロッティング、および定量的ポリメラーゼ連鎖反応の少なくとも 1 つを使用して行われる、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記 W n t - 1 発現のレベルが W n t - 1 蛋白質を定量することによって検出される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

W n t - 1 蛋白質の定量が、以下の方法：ゲル電気泳動、ウェスタンブロッティング、酵素免疫検定法、例えば酵素結合イムノソルベント検定法、放射免疫測定法、免疫組織化学、およびプロテオミクスの少なくとも 1 つを使用して行われる、請求項 9 に記載の方法。

40

## 【請求項 11】

W n t - 1 蛋白質の定量が、W n t - 1 蛋白質に特異的に結合する抗体ベースの結合部分を使用して行われる、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記抗体ベースの結合部分が検出可能なラベルで標識される、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記ラベルが、放射性ラベル、ハプテンラベル、蛍光ラベル、および酵素ラベルからな

50

る群から選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記抗体ベースの結合部分が抗体である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

肝細胞癌を有するかまたは有すると思われる被験体の予後 ( prognosis ) をインビトロで評価するための方法であって、

該被験体から採取した肝臓検体を腫瘍部分と非腫瘍部分へ分離すること；

該腫瘍部分と該非腫瘍部分における W n t - 1 発現のレベルをそれぞれ検出すること；

該腫瘍部分における W n t - 1 発現の検出レベルを該非腫瘍部分のそれと比較して、比率値を得ること；および

得られた該比率値に基づいて該被験体の予後を評価すること ( ここで、該被験体は、

( i ) 得られた該比率値が 2 より大きい場合、6 ヶ月以下の予後；

( i i ) 得られた該比率値が 1 ~ 2 である場合、6 ~ 1 8 ヶ月の予後；および

( i i i ) 得られた該比率値が 1 未満である場合、少なくとも 1 8 ヶ月の予後

を有すると評価される )

を包含する、方法。

【請求項 1 6】

前記被験体が、B 型肝炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルスの少なくとも 1 つに感染している、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記肝臓検体が、肝内小結節 ( hepatic nodule ) を含む前記被験体の肝臓の部分から採取される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記肝臓検体が、部分切除および右葉切除 ( right lobectomy ) から選択される外科手術によって前記被験体から採取される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記肝臓検体が、肝生検、吸引 ( aspiration ) または腹腔鏡検査によって前記被験体から採取される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記非腫瘍部分のそれと比較した場合の、前記腫瘍部分における前記 W n t - 1 発現の検出レベルの増加が、NF - B 活性化と関連している、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 W n t - 1 発現のレベルが、W n t - 1 遺伝子の m R N A 転写物を定量することによって検出される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 2】

W n t - 1 遺伝子の m R N A 転写物の定量が、以下の方法：ハイブリダイゼーション、ノーザンブロットイング、および定量的ポリメラーゼ連鎖反応の少なくとも 1 つを使用して行われる、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 W n t - 1 発現のレベルが W n t - 1 蛋白質を定量することによって検出される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 4】

W n t - 1 蛋白質の定量が、以下の方法：ゲル電気泳動、ウェスタンブロットイング、酵素免疫検定法、例えば、酵素結合イムノソルベント検定法、放射免疫測定法、免疫組織化学、およびプロテオミクスの少なくとも 1 つを使用して行われる、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

W n t - 1 蛋白質の定量が、W n t - 1 蛋白質に特異的に結合する抗体ベースの結合部分を使用して行われる、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

10

20

30

40

50

前記抗体ベースの結合部分が検出可能なラベルで標識されている、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記ラベルが、放射性ラベル、ハプテンラベル、蛍光ラベル、および酵素ラベルからなる群から選択される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記抗体ベースの結合部分が抗体である、請求項 25 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma) (HCC) のバイオマーカーとしての Wnt-1 の発見に関する。該発見に基づいて、本発明は、肝内小結節 (hepatic nodule) を有するか有すると思われる被験体、特に、B 型肝炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルスの少なくとも 1 つに感染した者における HCC の素因 (predisposition) を決定するための方法、ならびに HCC を有するかまたは有すると思われる被験体の予後評価 (prognostic evaluation) のための方法を提供し、ここで、Wnt-1 が HCC のバイオマーカーとして使用される。

【背景技術】

【0002】

2. 関連技術の説明

癌からの生存において最も重要な因子の 1 つは、早期段階での検出である。癌の早期事象を検出する臨床検査は、癌進行に介入しこれを防止する機会を提供する。遺伝子プロファイリングおよびプロテオミクスの発展に伴って、特定の癌を診断および予後予測 (prognose) ために使用され得る分子マーカーまたは“バイオマーカー”の同定が顕著に進歩した。

【0003】

例えば、Sanford D. Markowitzらに付与された US 5,866,323 は、患者の細胞中の TGF- $\beta$  についての機能タイプ II レセプター (functional type II receptor) (RII) の非存在の検出による、癌の診断または予後予測 (prognosis) のための方法を開示している。

【0004】

John Fruehaufらに付与された US 6,303,324 B1 は、ヒト癌患者における疾患過程の予後予測を行うための方法を開示しており、該方法は以下の工程を包含する：(a) ヒト癌患者から腫瘍のサンプルを得る工程；(b) 該腫瘍サンプルにおける p53 蛋白質の核局在のレベルを測定し、そして該腫瘍サンプル中の p53 蛋白質の核局在のレベルを比較し、そして該腫瘍サンプル中の p53 蛋白質の核局在のレベルと非侵襲性・非転移性腫瘍サンプル中の p53 蛋白質の核局在のレベルとを比較する工程；(c) 該腫瘍サンプル中のトロンスポンジン 1 発現のレベルを測定し、そして非侵襲性・非転移性腫瘍サンプル中のトロンスポンジン 1 発現のレベルを比較する工程；(d) 腫瘍サンプル中の微小血管新生の程度を免疫組織化学によって測定し、そして該腫瘍サンプル中の微小血管新生の程度と非侵襲性・非転移性腫瘍サンプル中の微小血管新生の程度とを比較する工程；ここで、該予後は、更なる新生物性疾患の可能性を考慮することから予想され、これは、腫瘍サンプルの核局在のレベルが、非侵襲性・非転移性腫瘍サンプル中の p53 蛋白質の核局在のレベルよりも大きく；腫瘍サンプル中のトロンスポンジン 1 発現のレベルが、非侵襲性・非転移性腫瘍サンプル中のトロンスポンジン 1 発現のレベルより低く；ならびに腫瘍サンプル中の微小血管新生の程度が、非侵襲性・非転移性腫瘍サンプル中の微小血管新生の程度よりも大きい場合になされ；そしてここで、該ヒト癌患者は、乳癌または前立腺癌を有する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 5 】

Alexander Lopataらに付与されたUS 6,607,894 B1は、子宮洗浄におけるマトリクスメタロプロテイナーゼ - 2 および / またはマトリクスメタロプロテイナーゼ - 9 のレベルの測定により、子宮内膜癌の存在および / または危険性を評価するための方法を開示している。該方法は、質的または量的であり得、そして大規模スクリーニングおよび臨床試験に適応可能である

US 特許出願公開公報20050048542 A1は、癌患者における予後決定のための非侵襲性・量的試験を開示している。試験は、特定のメッセンジャーRNA (mRNA) または対応の遺伝子発現産物の腫瘍レベルの測定に頼る。これらmRNAまたは蛋白質レベルは、数的スコアを生じる多項式 (アルゴリズム) へ入れられ、これは、再発危険性 (再発スコア) または治療への患者応答の可能性 (応答スコア) を示している。

10

## 【 0 0 0 6 】

WO 2005/071387 A1は、患者から得られる生物学的サンプル中のADAM12のレベルを評価することによる、上皮起源の癌の診断および予後予測のための方法を開示している。

## 【 0 0 0 7 】

癌検出の分野において顕著な進歩があるにもかかわらず、臨床適用において容易に使用され得る種々の癌についての新規のバイオマーカーの同定についての必要性が当該分野において依然として存在している。

## 【 0 0 0 8 】

B型肝炎ウイルス (HBV) およびC型肝炎ウイルス (HCV) は、それぞれ、世界中で3億5千万および1億7千万を超える人々に感染している (Purcell, R.H. (1993), *Gastroenterology*, 104:955-963)。両ウイルスは、慢性的に感染された被験体において共通の特徴を共有しており、肝臓における類似の組織病理学的変化、ならびに慢性肝炎から、肝硬変および最終的には肝細胞癌 (HCC) への共通の臨床的進展 (clinical evolution) を含む (S.L. Tsai and Y.F. Liaw (1995), *Digest. Surg.*, 12:7-15; K. Okuda (1992), *Hepatology*, 15:948-963; S.S. Thorgeirsson and J.W. Grisham (2002), *Nature Genet.*, 31:339-346)。

20

## 【 0 0 0 9 】

慢性ウイルス性肝炎を有する患者について、初期HCCについてのスクリーニングは、治療処置ストラテジーの設定を可能に得、そして抗ウイルス治療は、HCCの引き続いての発生の危険性を減少させ得る。確立された肝細胞癌を有する患者について、同時の慢性ウイルス性肝炎または肝硬変の存在は、予後および生存に影響を与え得、そして損なわれた肝機能のために治療オプションを変化させ得る。

30

## 【 0 0 1 0 】

HCCについての診断方法における近年の進歩にもかかわらず、予後予測は、依然として、一般的に粗末である。転移性または局所的に進行したHCCを有する患者は、通常、抗癌治療に対する反応性に乏しい。処置していない患者は通常3~4ヶ月で死亡し、処置した患者は、彼らが治療に応答した場合は、6~18ヶ月生存し得る。長期の生存が、場合によっては、非侵襲性癌について、成功した部分的肝切除 (successful subtotal hepatectomy) 後に見られる。肝臓の正常な代謝および貯蔵機能は損なわれているので、患者は、栄養および出血合併症の危険性がある。進行した肝硬変を有する患者は、一般的に、腫瘍の程度とは無関係に、合併症、例えば、脳障害、静脈溜出血、および敗血症に倒れる。

40

## 【 0 0 1 1 】

肝臓切除 (hepatic resection) は、この腫瘍の処置の中心のままであり、そして唯一の一貫した長期の生存を提供する (N. Nagasue et al. (2001), *British Journal of Surgery*, 88:515-522)。現在、肝臓切除は、患者の10~15%についてのみ実行可能である。この低い切除可能率についての理由としては、肝臓切除の任意の形態を排除する、広範囲の局所疾患 (extensive local disease)、肝外疾患 (extrahepatic disease) の存

50

在および乏しい機能的肝臓リザーブ (poor functional liver reserve) が挙げられる (T.K. Seow et al. (2001), *Proteomics*, 1:1249-1263)。

【0012】

HCCは、それが臨床的に表れる前に、進行した段階に達し得るので、危険性のある個人について、6ヶ月間隔での定期的なスクリーニングが推奨される。これは、腫瘍小結節 (tumor nodule(s)) の存在を検出するための肝臓の経腹超音波スキャンの実施および血清腫瘍マーカー - フェト - プロテイン (AFP) の測定を必要とする (T.K. Seow et al. (2001), *Proteomics*, 1:1249-1263)。

【0013】

いくつかの研究は、腫瘍組織 (J. Kim et al. (2002), *Electrophoresis*, 23: 4142-4156; S.O. Lim et al. (2002), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291: 1031-1037; K.S. Park et al. (2002), *Int. J. Cancer*, 97: 261-265)、または患者の血清 (F.L. Naour et al. (2002), *Mole. Cell. Proteomics.*, 1:197-203) のいずれかからの、HCCのプロテーム分析を報告している。全てが、肝細胞癌発生に関連する特異的因子またはHCCの早期診断のための新規の腫瘍マーカーを同定するように試みたが、これらのゴールは到達には遠いようである (R.C.M.Y. Liang et al. (2002), *J. Chromatogr. B.*, 771:303-328; T.K. Seow et al. (2001), *Proteomics*, 1:1249-1263)。

【0014】

以前同定されたマーカー、例えば、AFP、血清フェリチン、 $\alpha$ -グルタミルトランスペプチダーゼアイソエンザイム、アルカリホスファターゼ、デス -  $\alpha$  - カルボキシプロトロンビン、 $\alpha$  - 1 - アンチトリプシン、アルドラーゼA、5' - ヌクレオチドホスホジエステラーゼ、組織ポリペプチド抗原、および  $\alpha$  - 1 - フコシダーゼ (T.K. Seow et al. (2001), *Proteomics*, 1:1249-1263) は、HCCを診断および治療するための努力を促進したが、この腫瘍の診断および治療を更に改善するために、HCCについての更なるマーカーおよび治療ターゲットの同定についての必要性が、依然として存在している。

【0015】

Wnt遺伝子は、N - 結合グリコシル化 (N-linked glycosylation) によって修飾されている、膜内外ドメイン (transmembrane domains) を欠いている、38 - 45 kDaの、分泌システインリッチ蛋白質のファミリーをコードする (K.M. Cardigan and R. Nusse (1997), *Genes Dev.*, 11:3286-3305)。これらの分泌Wnt蛋白質は、細胞表面上またはその付近の細胞外マトリクス蛋白質に結合し (associate with)、そしてオートクラインまたはパラクライン効果 (autocrine or paracrine effects) を発し得る。19の公知のヒトWnt遺伝子の第一メンバー、Wnt - 1は、その腫瘍形成特性のために初めて発見された (R. Nusse and H.E. Varmus (1982), *Cell*, 31:99-109)。ウイングレス (wingless)、Wnt - 1のハエ相同体 (the fly homolog of Wnt-1) の引き続いての発見は、癌発生遺伝子を含有すると判ったシグナリング経路を組み立てることへの道を開いた (K. M. Cardigan and R. Nusse (1997), *Genes Dev.*, 11:3286-3305; P. Polakis (2000), *Genes Dev.*, 14:1837-1641)。

【0016】

ヒト癌におけるWnt遺伝子の過剰発現 (overexpression)、および特には過小発現 (underexpression) について (K.M. Cardigan and R. Nusse (1997) (前述); P. Polakis (2000) (前述); J. Taipale, and P.A. Beachy (2001), *Nature*, 411: 349-354; D. Kalderon (2002), *Trends Cell. Biol.*, 12: 523-531; Ariel Ruiz i Altaba et al. (2002), *Nature Rev. Cancer*, 2 (5): 361-370; J.R. Miller, et al. (1999), *Oncogene*, 18: 7860-7872)、ならびに血液学的悪性疾患における無調節の (dysregulated) Wntシグナリングについて (F.J.T. Staal and H.C. Clevers (2005), *Nature Rev. Immunol.*, 5: 21-30) の多数の報告が存在する。Wntリガンドまたはレセプターをコードする遺伝子の増幅、再配列または突然変異に対するより説得力のある証拠が、例えば、P. Polakis (2000) (前述); J. Taipale, and P.A. Beachy (2001) (前述); D. Kalderon (2002) (前述); Ariel Ruiz i Altaba et al. (2002) (前述); J.R. Miller, et al. (1999) (

前述)において見られ得、ここで、Wnt突然変異は、結腸直腸癌の85%、類腫瘍の74%、およびヘパトблаストーマの67%において生じると報告された。

【0017】

核因子 B (nuclear factor B) (NF- $\kappa$ B) は、多くの炎症性および免疫学的蛋白質、例えば、サイトカイン、インターフェロン、主要組織適合遺伝子複合体蛋白質、接着分子、および誘導性一酸化窒素シンターゼ (inducible nitric oxide synthetase) を調節する、重要な転写因子 (transcription factor) である。従って、NF- $\kappa$ B は、細胞生理学およびアポトーシスの制御において重要な役割を果たす。NF- $\kappa$ B は、Rel 蛋白質のダイマーであり、そして通常、2つのサブユニット、RelA (p65) および NF- $\kappa$ B1 (p50) からなる。静止条件下で、NF- $\kappa$ B ダイマーは、NF- $\kappa$ B 10  
ダイマーが核へ入ることを阻止する阻害 B (I $\kappa$ B) 蛋白質との相互作用により、細胞質中で隔離される。該細胞が刺激によって活性化されると、I $\kappa$ B 蛋白質は、リン酸化され、そして迅速に分解する。遊離形態の NF- $\kappa$ B は、核へ輸送され、そして標的遺伝子のイントロニックエンハンサー (intronic enhancer) と結合し、遺伝子転写を誘発する。

【0018】

蓄積された証拠は、HBV (M. Doria et al. (1995), EMBO J., 14:4747-57; F. Su and R.J. Schneider (1996), J. Virol., 70: 4558-4566; R. Weil et al. (1999), Mol. Cell Biol., 19: 6345-6354; J. Diao et al. (2001), Cytokine Growth F. R., 12:189-205; H. Kim et al. (2001), Biochem. Biophys. Res. Commun., 286:886-894) および HCV (D.I. Tai et al. (2000), Hepatology, 31: 656-664; H. Yoshida et al. (2001), 20  
J. Biol. Chem., 276: 16399-16405; P. Boya et al. (2001), Hepatology, 34: 1041-48; G. Gong et al. (2001), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:9599-9604; H. Marusawa et al. (1999), J. Virol., 73: 4713-4720) の両方ともが、核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) を活性化し得ることを示している。NF- $\kappa$ B の構成的および/または誘導性活性化が、HBV 陽性細胞系 Hep3B および HCV トランスフェクトされた HepG2 細胞、ならびに HBV および HCV 感染された肝臓組織において確立された (D.I. Tai et al. (2000), Hepatology, 31: 656-664; P.J. Chiao et al. (2002), Cancer, 95:1696-1705; D.I. Tai et al. (2000), Cancer, 89: 2274-2281)。活性化 NF- $\kappa$ B は、免疫組織学化学的染色、電気泳動移動度シフトアッセイ (electrophoretic mobility shift assay) (EMSA)、およびスーパーシフトアッセイ (supershift assay) によって実証され 30  
得る。免疫における NF- $\kappa$ B の重要性は議論の余地が無い (W.C. Sha (1998), J. Exp. Med., 187:143-146; Q. Li (2002), Nature Rev. Immunol., 2:725-734)。最近の証拠は、NF- $\kappa$ B およびその活性化経路はまた、腫瘍発生についても重要であることを示している (D. Hanahan and R.A. Weinberg (2000), Cell, 100:57-70; M. Karin et al. (2002), Nature Rev. Cancer, 2: 301-310; E. Pikarsky et al. (2004), Nature, 431: 461-466; A. Lin and M. Karin (2003), Semin. Cancer Biol., 13: 107-114)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

NF- $\kappa$ B 活性化と関連する以前の報告に基づいて、HBV および HCV の両方に共通の NF- $\kappa$ B 関連肝細胞癌発生 (NF- $\kappa$ B-related hepatocarcinogenesis) の可能な機構が存在することが、提案される。この仮説を試験するために、本発明者は、HBV および/または HCV に感染した患者から採取した対の腫瘍および非腫瘍組織における NF- $\kappa$ B 活性化をそれぞれ分析した。驚くべきことに、本発明者は、より高いレベルの NF- $\kappa$ B 結合 Wnt-1 蛋白質 (NF- $\kappa$ B-associated Wnt-1 protein) が、HBV および HCV の少なくとも1つに感染した患者から採取した対の肝臓検体の非腫瘍部分においてよりも腫瘍部分において検出されるということを見出した。更に、Wnt-1 の増強された発現が、HBV および HCV の少なくとも1つに感染した患者における HCC の発生に臨床的に関連している。 40

【0020】

本発明者の知る限りでは、W n t - 1 が H C C の発生に密接に関連していることは、文献において報告されていない。本発明者の知見に基づいて、W n t - 1 を H C C のバイオマーカーとして使用する、肝内小結節 (hepatic nodule) を有するか有すると思われる被験体、特に、H B C と H C V の少なくとも 1 つに感染した者における H C C の素因を決定するための方法、ならびに H C C を有するかまたは有すると思われる被験体の予後評価のための方法を開発することが可能である。

【課題を解決するための手段】

【0021】

発明の要旨

従って、第一の局面によれば、本発明は、

肝内小結節を有するか有すると思われる被験体における肝細胞癌の素因 (predisposition) を決定するための方法であって、

該被験体から採取した肝臓検体を腫瘍部分と非腫瘍部分へ分離すること；

該腫瘍部分および該非腫瘍部分における W n t - 1 発現のレベルをそれぞれ検出すること；

該腫瘍部分における W n t - 1 発現の検出レベルを該非腫瘍部分のそれと比較して、比率値を得ること；および

該被験体が、得られた該比率値に基づいて肝細胞癌に素因を有する (predisposed to) か否かを決定すること (ここで、該被験体は、得られた該比率値が 1 よりも大きい場合、肝細胞癌に素因を有すると決定される)

を包含する方法を提供する。

【0022】

第二の局面において、本発明は、

肝細胞癌を有するかまたは有すると思われる被験体の予後評価 (prognostic evaluation) のための方法であって、

該被験体から採取した肝臓検体を腫瘍部分と非腫瘍部分へ分離すること；

該腫瘍部分および該非腫瘍部分における W n t - 1 発現のレベルをそれぞれ検出すること；

該腫瘍部分における W n t - 1 発現の検出レベルを該非腫瘍部分のそれと比較して、比率値を得ること；および

得られた該比率値に基づいて該被験体の予後を評価すること (ここで、該被験体は、

( i ) 得られた該比率値が 2 より大きい場合、6 ヶ月以下の予後 (prognosis) ；

( i i ) 得られた該比率値が 1 ~ 2 である場合、6 ~ 18 ヶ月の予後；または

( i i i ) 得られた該比率値が 1 未満である場合、少なくとも 18 ヶ月の予後

を有すると評価される)

を包含する方法を提供する。

【0023】

本発明の上記および他の特徴および利点は、添付の図面を参照する好ましい実施形態の以下の詳細な説明において明らかとなる。

【0024】

発明の詳細な説明

本明細書の目的のために、用語“含む (comprising)”は“含むが限定されない (including but not limited to)”を意味し、そして用語“含む (comprises)”は対応の意味を有すると明確に理解される。

【0025】

先行技術刊行物が本明細書において参照しても、このような参照は、該刊行物が当該分野、台湾または他の国における共通の一般的知識の一部を形成するという承認を構成しないことが理解されるべきである。

【0026】

別に規定されない限り、本明細書において使用される全ての技術および科学用語は、本

10

20

30

40

50

発明が属する技術の当業者によって一般的に理解される意味を有する。

【0027】

種々の実質性肝臓疾患 (parenchymal liver diseases) は、肝炎、線維症、および最終的には肝硬変に至り得る。硬変肝臓は、再生性小結節 (regenerative nodules) を含み、そしてまた異形成小結節 (dysplastic nodules) ならびに肝細胞癌 (HCC) を含み得る。1995年以来、改変された命名法は、2つのグループに肝内小結節を分類した：再生性病巣 (regenerative lesions) および異形成または新生物性病巣 (dysplastic or neoplastic lesions)。

【0028】

異形成または新生物性病巣は、推定されるかまたは証明された遺伝的変性によって引き起こされる異常成長の組織学的特徴を示す肝細胞から構成される。異形成または新生物性小結節は、肝細胞腺腫、異形成病巣 (dysplastic foci)、異形成小結節、およびHCCを包含する。

【0029】

異形成病巣 (dysplastic focus) は、直径1mm未満の肝細胞のクラスターとして規定され、異形成を有するが悪性度について明確な組織学的判定基準を有さない。異形成 (dysplasia) は、該病巣を構成する細胞のクラスター内の、核および細胞質変化の存在 (例えば、重篤な核異型へ最小量のもの) および増加した量の細胞質脂肪またはグリコーゲンを示す。異形成病巣は、肝硬変において一般的であり、そして非肝硬変肝臓において一般的でない。異形成は、小さいまたは大きい細胞タイプのものであり得る。

【0030】

異形成小結節 (dysplastic nodule) は、少なくとも直径1mmの肝細胞の小結節領域であり、異形成を有するが悪性度について明確な組織学的判定基準を有さない。これらの小結節は、通常、肝硬変肝臓において見られる。異形成小結節は、低グレードまたは高グレードであり得る。低グレード異形成を有する小結節は、変化した肝臓実質細胞構造ならびに増加した核 - 細胞質比を有する増加した数の細胞を示し得る。高グレード異形成を有する小結節は、サイズおよび形状が可変である核を含有する、肝細胞の層の増加した厚みを示す。

【0031】

HCCは、肝細胞性分化 (hepatocellular differentiation) を有する細胞から構成される悪性新生物である。小さなHCCは、直径2cm以下と規定される。HCCと高グレード異形成小結節とを区別するために使用される判定基準は、明確には規定されていない。ほとんどの小さなHCCは、確信をもって異形成小結節と組織学的に区別することが出来ない。更には、癌の病巣 (foci of carcinoma) は、他に良性異形成小結節において見られ得る。

【0032】

上記説明は、Shahid M. Hussain et al. (2002), RadioGraphics, 22:1023-1039から引用され、この開示は、その全てが、参照によって本明細書中に組み込まれる。

【0033】

HBVおよびHCVでの慢性感染は、肝炎、肝硬変、および肝細胞癌 (HCC) に病因学的に関連する。ウイルスは両方とも、肝細胞においてNF- $\kappa$ B活性化を誘発すると報告されている。HBVおよびHCVの両方に共通のNF- $\kappa$ B関連肝細胞癌発生 (NF- $\kappa$ B-related hepatocarcinogenesis) の可能な機構を探究するために、本発明者は、HBVおよびHCVの少なくとも1つに感染した患者から採取した対の腫瘍および非腫瘍肝臓組織において、NF- $\kappa$ B結合蛋白質複合体 (NF- $\kappa$ B associated protein complexes) を分析した。NF- $\kappa$ B結合蛋白質の量を、2-D Eゲルにおける蛋白質スポット強度 (protein spot intensity) によって半定量的に測定した。NF- $\kappa$ Bシグナリング複合体と関連した蛋白質スポットを、機能的プロテオーム分析 (functional proteomics analysis) によって研究した (R. Aebersold and M. Mann (2003), Nature, 422:198-207; E. Phizicky et al. (2003), Nature, 422:208-215)。

## 【0034】

本発明の研究プロトコルを図1に図示する。手短に言えば、HBVおよびHCVの少なくとも1つに感染した患者から採取した対の腫瘍/非腫瘍肝組織を、以下の分析に供した：EMSA/スーパーシフトアッセイ、免疫沈降(IP)、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動(2-DE)、銀染色および/またはSYPRO-Ruby染色、IP蛋白質スポットのMALDI-Q-TOF分析、および抗-Wnt-1抗体を使用するウェスタンブロットティング。

## 【0035】

図6を参照して、抗-p50および/または抗-p65を使用してIPで処理した2-DEゲル上においてポジティブに染色されたものに等しい20個の蛋白質スポットを、ImageMaster 2D Platinum Software, version 5.0 (Amersham Biosciences)を組み合わせたTyphoon 9200 ImageMaster (Amersham Biosciences)を使用して、任意に選択しそして共にマッピングした。

## 【0036】

別の2-DEゲルを、図6の銀染色した2-DEゲルについて使用したものと同一の条件下で実行した。SYPRO-Ruby染色後、図6に示されるそれらのスポットに対応する20個の蛋白質スポットを、イン-ゲルトリプシン消化(in-gel trypsin digestion)に供し、続いてMALDI-TOF質量分析計を使用して質量分析を行った。

## 【0037】

これらの分析した20個の蛋白質スポットのうち、“MI205434”と呼ばれる蛋白質スポットは、MALDI PMF分析によるデータベースサーチ結果(後述の表3を参照のこと)、抗-ヒトWnt-1を使用するHCC患者番号1および5の対の検体の2-DEウェスタンブロット分析からの実験結果(図11を参照のこと)、ならびに8個の更なるHCC患者からの検体の1-DEウェスタンブロットにおけるデンシトメトリー分析からの実験結果(即ち、患者番号10~17、図12を参照のこと)に基づいて、Wnt-1蛋白質(NCBIアクセッションナンバーP04628)であると示唆された。

## 【0038】

本発明者の結果は、HBVおよび/またはHCVに感染した患者から採取した対の肝臓検体の腫瘍および非腫瘍部分におけるNF- $\kappa$ Bの構成的活性化(constitutive activation)を明らかにした。更に、驚くべきことに、より高いレベルのNF- $\kappa$ B結合Wnt-1蛋白質が、HBVおよびHCVの少なくとも1つに感染した9人の患者(即ち、後述の表1に列挙されるHCC患者番号1~9)から採取した対の肝臓検体の非腫瘍部分よりも腫瘍部分において検出されることが判明した。更に、Wnt-1の増強された発現は、HBVおよびHCVの少なくとも1つに感染したこれら9人の患者において、HCCの発生に臨床的に関連している。NF- $\kappa$ B結合Wnt-1蛋白質(NF- $\kappa$ B-associated Wnt-1 protein)の観察された増強された発現は、更に、8個の更なる対のHCC検体(即ち、患者番号10~17、図12を参照のこと)のイムノブロット分析によって立証された。本発明者の研究は、NF- $\kappa$ B結合Wnt-1蛋白質の増強された発現は、B型肝炎およびC型肝炎関連肝細胞癌発生の共通事項(common denominator)であり得ることを示唆している。従って、NF- $\kappa$ BおよびWnt-1蛋白質は、HCCの処置および肝細胞癌発生の化学的予防のために非常に有効な治療剤を設計することにおける潜在的な標的として使用され得る。

## 【0039】

更には、術後1年以内で検出された肝臓内拡散(intrahepatic spread)、早期の再発、門脈腫瘍血栓症(portal vein tumor thrombosis)、および遠位転移(distant metastases)を、悪い予後(poor prognosis)と分類した。今までのところ研究された42人のHCC患者において、高レベルのWnt-1発現(腫瘍/非腫瘍 2)は、外科手術治療を受けたこれらの患者において悪い予後に関連した。

## 【0040】

従って、本発明によれば、肝内小結節を有するかまたは有すると思われる被験体にお

る肝細胞癌の素因 (predisposition) を決定するための方法であって、

該被験体から採取した肝臓検体を腫瘍部分と非腫瘍部分へ分離すること；

該腫瘍部分および該非腫瘍部分における W n t - 1 発現のレベルをそれぞれ検出すること；

該腫瘍部分における W n t - 1 発現の検出レベルを該非腫瘍部分におけるそれと比較して、比率値を得ること；および

該被験体が、得られた該比率値に基づいて肝細胞癌に素因を有する (predisposed to) か否かを決定すること (ここで、該被験体は、得られた該比率値が 1 よりも大きい場合、肝細胞癌に素因を有すると決定される)

を包含する方法が提供される。

10

【0041】

本発明によれば、試験される被験体は、肝臓問題を有している患者、特に B 型肝炎ウイルスと C 型肝炎ウイルスの少なくとも 1 つに感染した者である。

【0042】

本発明によれば、該被験体に存在する肝内小結節 (hepatic nodule) は、臨床プラクティスにおいて広く使用される種々の身体検査、例えば、超音波、コンピュータ連動断層撮影 (CT)、磁気共鳴画像法 (MRI) などによって検出され得る。肝内小結節はそれ自体臨床的に検出され得るが、肝内小結節が良性または前悪性または悪性であるかを決定することが依然として必要であり得る。

【0043】

本発明によれば、肝臓検体は、好ましくは、肝内小結節を含有する被験体の肝臓の部分から採取される。

20

【0044】

本発明によれば、該肝臓検体は、部分切除および右葉切除 (right lobectomy) から選択される外科手術によって、あるいは肝生検 (liver biopsy)、吸引 (aspiration) または腹腔鏡検査によって、該被験体から採取される。次いで、該肝臓検体を、該検体に含まれる肝臓組織の全体的外観 (gross appearances) に基づいて、腫瘍部分および非腫瘍部分に分離する。

【0045】

本発明の研究によれば、該非腫瘍部分におけるそれと比較した場合の、該腫瘍部分における該 W n t - 1 発現の検出レベルの増加が、N F - B 活性化と関連している。

30

【0046】

W n t - 1 発現のレベルは、当業者に公知の手段によって測定され得る。本発明によれば、一般的に、抗体、または抗体等価物を使用して、肝臓検体における W n t - 1 発現のレベルを検出することが好ましい。しかし、m R N A 転写物 (mRNA transcripts) の分析によって W n t - 1 発現を測定することのような、W n t - 1 発現の検出のための他の方法もまた使用され得る。

【0047】

m R N A のレベルを評価するための方法は、当業者に周知である。例えば、W n t - 1 遺伝子の m R N A 転写物を定量することは、以下の方法の少なくとも 1 つを使用して行われ得る：ハイブリダイゼーション、ノーザンブロットイング、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) など。

40

【0048】

例として、ノーザンブロットイングと関連して、R N A の調製は、変性アガロースゲル上において実行され、そして適切な支持体 (例えば、活性化セルロース、ニトロセルロースまたはガラスまたはナイロン膜) へ移される。次いで、標識された (例えば、放射標識された) c D N A または R N A を、該調製物へハイブリダイズさせ、洗浄し、そしてオートラジオグラフィのような方法によって分析する。R N A 転写物の検出のための別の一般的なアプローチは、R T - P C R であり、これは、c D N A へ m R N A を逆転写し、続いてポリメラーゼ連鎖反応を行うことを包含する。あるいは、m R N A 発現は、D N A

50

アレイ、チップまたはマイクロアレイにおいて検出され得る。DNAアレイを作製する方法およびそれらの使用法は、当該分野において周知である（例えば、US 6,618,679、US 6,379,897、US 6,664,377、US 6,451,536およびUS 6,548,257を参照のこと）。

【0049】

本発明の好ましい実施形態において、Wnt-1発現のレベルは、以下の方法の少なくとも一つを使用して、Wnt-1蛋白質を定量することによって測定される：ゲル電気泳動、ウェスタンブロッティング、酵素免疫検定法、例えば、酵素結合免疫ソルベント検定法（ELISA）、放射免疫測定法、免疫組織化学、プロテオミクスなど。

【0050】

本発明の好ましい実施形態において、Wnt-1蛋白質の定量は、Wnt-1蛋白質に特異的に結合する抗体ベースの結合部分（antibody-based binding moiety）を使用して行われる。本発明のより好ましい実施形態において、該抗体ベースの結合部分は、放射性ラベル、ハプテンラベル、蛍光ラベル、および酵素ラベルからなる群から選択される、検出可能なラベルで標識される。

【0051】

用語“抗体ベースの結合部分”または“抗体”は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な決定基、例えば、Wnt-1蛋白質に特異的に結合する（これと免疫反応する）抗原結合部位を含む分子を包含する。用語“抗体ベースの結合部分”は、任意のアイソタイプの全ての抗体（例えば、IgG、IgA、IgM、IgEなど）を包含するように意図され、そしてまたWnt-1蛋白質と特異的に反応性であるそのフラグメントを包含する。

【0052】

抗体は、従来技術を使用してフラグメント化され得る。従って、用語“そのフラグメント”は、特定の蛋白質と選択的に反応し得る、蛋白質分解的に切断された（proteolytically-cleaved）または組換え的に調製された（recombinantly-prepared）抗体分子部分のセグメントを包含する。このような蛋白質分解および/または組換えフラグメントの非限定的な例は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fv、dab（dabs）およびペプチドリンカーによって連結されたVLおよびVHドメインを含有する一本鎖抗体（single chain antibodies）（scFv）を包含する。該scFvは、共有結合または非共有結合されて2以上の結合部位を有する抗体を形成し得る。

【0053】

用語“抗体ベースの結合部分”は、ポリクローナル、モノクローナル、または抗体および組換え抗体の他の精製調製物を包含する。用語“抗体ベースの結合部分”は、更に、ヒト化抗体、二重特異的（bi-specific）抗体、および抗体分子から誘導される少なくとも一つの抗原結合決定基を有するキメラ分子を包含するように意図される。

【0054】

好ましい実施形態において、該抗体ベースの結合部分は、検出可能に標識される。本明細書中で使用される場合、“標識された抗体（labeled antibody）”は、検出可能な手段によって標識されている抗体を含み、そして酵素的に、放射活性的に、蛍光的に、および化学発光的に標識されている抗体を含むが、これらに限定されない。抗体はまた、c-Myc、HA、VSV-G、HSV、FLAG、V5、またはHISのような、検出可能なタグ（tag）で標識され得る。

【0055】

Wnt-1の検出のために抗体ベースの結合部分を使用する本発明の方法において、肝臓検体中に存在するWnt-1蛋白質のレベルは、検出可能に標識された抗体から発せられたシグナルの強度に相関する。

【0056】

1つの好ましい実施形態において、抗体ベースの結合部分は、抗体を酵素へ連結することによって、検出可能に標識される。次いで、酵素は、その基質へ暴露されると、例えば、分光測光的、蛍光測定的または可視的手段によって、検出可能であり得る化学部分を生

成する様式で、該基質と反応する。本発明の抗体を検出可能に標識するために使用され得る酵素としては、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ - V - ステロイドイソメラーゼ (delta-V- steroid isomerase)、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ - グリセロホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホースラディシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アルパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース - VI - ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。化学発光は、抗体ベースの結合部分を検出するために使用され得る別の方法である。

#### 【0057】

検出はまた、種々の他の免疫測定法を使用して達成され得る。例えば、抗体を放射性標識することによって、放射免疫アッセイ (radioimmune assays) の使用により該抗体を検出することが可能である。放射性同位体は、ガンマカウンターまたはシンチレーションカウンターの使用のような手段によって、あるいはオートラジオグラフィーによって、検出され得る。本発明の目的のために特に有用である同位体は、 $^3\text{H}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、および  $^{125}\text{I}$  である。

#### 【0058】

蛍光性化合物で抗体を標識することも可能である。蛍光的に標識された抗体を好適な波長の光へ暴露すると、その存在は、蛍光に起因して検出され得る。最も一般的に使用される蛍光標識化合物は、中でも、CYE色素、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリセリン (phycoerytherin)、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルデヒド (*o*-phthaldehyde) およびフルオレスカミンである。抗体はまた、 $^{152}\text{Eu}$ 、またはランタニド系の他のもののような蛍光発光金属 (fluorescence emitting metals) を使用して検出可能に標識され得る。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) のような金属キレート基 (metal-chelating groups) を使用して、抗体へ結合され得る。抗体はまた、それを化学発光化合物へカップリングすることによって、検出可能に標識され得る。次いで、化学発光 - 抗体の存在は、化学反応の過程の間に生じる発光の存在を検出することによって測定される。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、ルシフェリン、イソルミノール (isoluminol)、テロマティックアクリジニウムエステル (theromatic acridinium ester)、イミダゾール、アクリジニウム塩およびオキサレートエステルである。

#### 【0059】

上述されるように、Wnt - 1 蛋白質の量またはレベルは、酵素結合免疫ソルベント検定法 (ELISA)、放射免疫測定法 (RIA)、免疫ラジオメトリックアッセイ (IRMA)、ウェスタンブロットティング、または免疫組織化学のような、免疫アッセイによって検出され得る。抗体アレイまたはプロテインチップもまた使用され得る (例えば、米国特許第6,329,209号および第6,365,418号; ならびに米国特許出願公開公報第20030013208A1号、第20020155493A1号および第20030017515A1号を参照のこと)。

#### 【0060】

プロテオミクスは、典型的に、以下の工程を包含する: (1) 2 - D ゲル電気泳動 (2 - D PAGE) によるサンプル中の個々の蛋白質の分離; (2) 例えば質量分析または N 末端配列決定 (N-terminal sequencing) による該ゲルから回収された個々の蛋白質の同定; ならびに (3) バイオインフォマティクスを使用する該データの分析。プロテオミクス方法は、遺伝子発現プロファイリングの他の方法の有用な補足であり、そして本発明に従う HCC のバイオマーカーのプロダクトを検出するために、単独でまたは他の方法と組み合わせて使用され得る。

#### 【0061】

質量分析法は、当該分野において周知であり、そして生体分子 (例えば、蛋白質) を定量および / または同定するために使用されている。従って、本発明の方法において、Wnt - 1 蛋白質はまた、MALDI / TOF (飛行時間型 (time-of-flight))、SELD

10

20

30

40

50

I / T O F、液体クロマトグラフィー - 質量分析 ( L C - M S )、ガスクロマトグラフィー - 質量分析 ( G C - M S )、高速液体クロマトグラフィー - 質量分析 ( H P L C - M S )、キャピラリー電気泳動 - 質量分析、核磁気共鳴分光測定、またはタンデム質量分析 ( tandem mass spectrometry ) ( 例えば、M S / M S、M S / M S / M S、E S T - M S / M S など ) のような質量分析法を使用して検出され得る。例えば、米国特許出願公開公報第20030199001号、20030134304号、20030077616号を参照のこと ( これらは、参照により本明細書中に組み込まれる )。

#### 【 0 0 6 2 】

本発明によれば、肝細胞癌を有するかまたは有すると思われる被験体の予後評価 ( prognostic evaluation ) のための方法であって、

10

該被験体から採取した肝臓検体を腫瘍部分と非腫瘍部分へ分離すること；

該腫瘍部分および該非腫瘍部分における W n t - 1 発現のレベルをそれぞれ検出すること；

該腫瘍部分における W n t - 1 発現の検出レベルを該非腫瘍部分におけるそれと比較して、比率値を得ること；および

得られた該比率値に基づいて該被験体の予後を評価すること ( ここで、該被験体は、

( i ) 得られた該比率値が 2 より大きい場合、6ヶ月以下の予後 ( prognosis ) ；

( i i ) 得られた該比率値が 1 ~ 2 である場合、6 ~ 18ヶ月の予後；または

( i i i ) 得られた該比率値が 1 未満である場合、少なくとも 18ヶ月の予後

を有すると評価される )

20

を包含する方法もまた提供される。

#### 【 0 0 6 3 】

肝細胞癌を有するかまたは有すると思われる被験体の予後を評価するための方法の局面に関する詳細および細部は、上記で議論される被験体における肝細胞癌の素因を決定するための方法の局面のそれらと実質的に同一であると理解され、そしてこれは、適切である場合は、肝臓検体、分析などに関する上記の記載は、肝細胞癌を有するかまたは有すると思われる被験体の予後を評価するための方法の局面に必要な変更を加えて適用されることを意味する。

#### 【 0 0 6 4 】

本発明の予後予測方法 ( prognostic method ) は、H C C を有するかまたは有すると思われる患者についての処置の適切なコースを決定するために有用である。処置のコースは、癌についての診断後または処置後に患者について採用される治療手段 ( therapeutic measures ) をいう。例えば、癌再発、拡散、または患者生存についての可能性の決定は、治療へのより保存的なまたはより根治的なアプローチが採用されるべきかどうか、あるいは処置モダリティ ( treatment modalities ) を組み合わせるべきかどうかを決定するに役立つ。例えば、癌再発の可能性がある場合、化学療法、放射線、免疫療法、生物学的修飾物質治療 ( biological modifier therapy )、遺伝子治療、ワクチンなどでの外科的処置を先行するかまたは追従すること、あるいは患者が処置される期間を調節することが、有利であり得る。

30

#### 【 0 0 6 5 】

本発明はまた、肝内小結節を有するかまたは有すると思われる被験体における H C C の診断 ( 素因 ) および / または予後予測 ( prognosis ) のための診断キットの製造を考え、ここで、W n t - 1 発現のレベルを定量し得る試薬が含まれる。

40

#### 【 0 0 6 6 】

本発明は、以下の実施例によって更に説明される。しかし、以下の実施例は、例示目的のためだけに意図され、そして実際に本発明を限定すると解釈されるべきではないことが理解される。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 0 6 7 】

実施例

50

材料および方法：

1. 肝臓組織サンプルの収集：

インフォームドコンセントを、本発明において研究される被験体の各々から、彼らの肝臓組織の寄贈について得、そして本発明の研究プロトコルは、1975 Declaration of Helsinkiの倫理指針に適合した。

【0068】

Chi-Mei Medical Center (台南、台湾) および Chang-Gung Memorial Hospital (タオエン (Taoyen)、台湾) において肝臓腫瘍の外科的処理を受けた9人のHCC患者 (患者番号1~9) の新鮮な切除検体を、手術直後、腫瘍および非腫瘍部分に分離した。表1は、これら9人の患者の臨床的特徴 (clinical features) を要約している。The Tumor and Serum Bank of Chi-Mei Medical Centerから得た8個の異なる対のHCC検体 (患者番号10~17) を、同様に、腫瘍および非腫瘍部分へ分離し、そして検証のために研究した。全てのHCC検体を、実験前、-70℃で保存した。

10

【0069】

【表1】

表1. 本発明において研究される9人のHCC患者の臨床的特徴

患者番号	年齢 (歳)	性別	腫瘍		臨床的段階 (Child-Pugh)	ウイルス	バックグラウンド	手術
			段階	組織病理学 (hispathology)				
1	50	F	I	poor-HCC	A	HCV	CH	部分切除
2	60	M	I	well-HCC	A	HCV	AC	部分切除
3	53	M	I	poor-HCC	A	HCV	AC	部分切除
4	62	F	II	mod-HCC	A	HCV	LC	部分切除
5	75	M	II	well-HCC	A	HBV	CH	部分切除
6	49	M	II	poor-HCC	A	HBV	AC	部分切除
7	51	F	I	well-HCC	A	HBV	LC	部分切除
8	75	M	II	mod-HCC	A	HBV	LC	部分切除
9	55	M	II	poor-HCC	B	HBV+HCV	LC	Rt 葉切除

20

注: M, 男性; F, 女性; poor-HCC, あまり分化していない肝細胞癌; well-HCC, 十分に分化したHCC; mod-HCC, 中程度に分化したHCC; HBV, B型肝炎ウイルス; HCV, C型肝炎ウイルス; LC, 肝硬変; AC, 活性肝硬変 (active cirrhosis); CH, 慢性肝炎

30

【0070】

2. 肝臓組織からの蛋白質サンプルの調製：

蛋白質を、研究下のHCC検体から抽出した。2つのグループの実験を並行して行い、一方は、腫瘍および非腫瘍部分に予め分割された各々の対のHCC検体について個々に実行し、そして他方は、9個の対のHCC検体の腫瘍および非腫瘍部分のプールされた総蛋白質についてそれぞれ行った。

40

【0071】

サンプルは、実験の間中ずっと氷上で維持した。腫瘍および非腫瘍部分に分離された各々のHCC検体の各々について、0.06~0.08gの凍結肝臓組織を、液体窒素と共に冷却されたステンレススチール乳鉢および乳棒を使用して粉末に砕いた。得られた組織粉末を、5mLの溶解緩衝液 (lysis buffer) (7M尿素、2Mチオ尿素、4% CHAPS、10mM Tris、および1mM PMSF) と混合し、そしてこのようにして得られた混合物を、4℃で1時間、Potterタイプホモジナイザーを使用してホモナイゼーションに供した。破壊されていない細胞および結合組織を、4℃で3時間、21,000×gでの遠心分離によって、該ホモジネートから除去した。上澄みを回収し、そして使用まで-70℃で保存した。

50

## 【0072】

回収した上澄みの蛋白質濃度を、PlusOne™ 2-D Quant Kit (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) を使用して定量した。5 mL 溶解緩衝液中の 0.2 g の凍結肝臓組織は、5 ~ 10 mg/mL の最終蛋白質濃度を与えた。このようにして調製された蛋白質サンプルを、免疫沈降および 2-D E 電気泳動実験において使用した。

## 【0073】

他方で、引き続いての 1-D E 電気泳動実験において使用した蛋白質サンプルを、以前に記載された Bradford 蛋白質アッセイ (Bradford protein assay) によって定量した。

## 【0074】

## 3. EMSA およびスーパーシフトアッセイ:

核および細胞質蛋白質抽出物を、標準プロトコルに従って調製した (S.M. Abmayr and J.L. Workman (1991), Preparation of nuclear and cytoplasmic extracts from mammalian cells. In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman J. G., Smith, J.A., and Struhl, K. eds., Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons; 12.1.1-12.1.9)。

## 【0075】

該 HCC 検体の腫瘍および非腫瘍部分についての NF- $\kappa$ B の電気泳動移動度シフトアッセイ (Electrophoretic mobility shift assay) (EMSA) およびスーパーシフトアッセイ (supershift assay) を、以前に記載された手順 (D.I. Tai et al. (2000), Hepatology, 31:656-664; および D.I. Tai et al. (2000), Cancer, 89:2274-2281) に従って行った。

## 【0076】

4. NF- $\kappa$ B 結合蛋白質複合体の免疫沈降:

上述の 9 個の対の HCC 検体の腫瘍および非腫瘍部分から調製した該蛋白質サンプルの各々 (500  $\mu$ g) を、1 mL の再水和緩衝液 (rehydration buffer) (7 M 尿素、2 M チオ尿素、4% CHAPS、0.5% IPG 緩衝液および数滴のプロモフェノールブルー) に溶解し、続いて、4 で 1.5 時間、抗-NF- $\kappa$ B p50 抗体 (抗-p50) または抗-NF- $\kappa$ B p65 抗体 (抗-p65) (Biogenesis, Poole, UK) のいずれか 10  $\mu$ L と混合した。得られた免疫複合体、即ち、NF- $\kappa$ B 結合蛋白質複合体 (NF- $\kappa$ B-associated protein complexes) を、Protein A Sepharose™ CL-4B ビーズ (Amersham Biosciences) により製造業者の使用説明書に従って回収した。

## 【0077】

## 5. 二次元電気泳動 (2-D E):

表 1 (前述) に列挙される 9 人の HCC 患者の検体の腫瘍部分から回収された免疫複合体を、プールし、次いで、標準プロトコル (P.H. O'Farrell (1975), J. Biol. Chem., 250:4007-4021) および以前に記載される詳細な手順 (C.L. Lee et al. (2003), Proteomics, 3:2472-2486) に従って、変性条件下、12.5% ポリアクリルアミドゲルを使用して二次元電気泳動 (2-D E) 分析に供した。

## 【0078】

本発明の実験において、免疫沈降から回収された該 NF- $\kappa$ B 結合蛋白質複合体に加えて、表 1 (前述) に列挙される 9 人の HCC 患者の検体の腫瘍および非腫瘍部分からの総蛋白質を、並行して実験した。

## 【0079】

## 6. 銀染色:

蛋白質スポット可視化を提供するために質量分析と適合性である、改変した銀染色法 (modified silver staining method) を、本発明の研究プロトコルにおいて使用した (C.L. Lee et al., (2003), Proteomics, 3:2472-2486)。簡単に言えば、2-D E 後のポリアクリルアミドゲルを、30 分間、水中 50% メタノール / 10% 酢酸において固定し、

10

20

30

40

50

続いて15分間5%メタノール中でインキュベートした。その後、2-DEゲルを、各々5分間、Milli-Q水で3回洗浄し、次いで、正確に2分間、新たに調製した0.02%チオ硫酸ナトリウムで敏感にし、続いて、各々30秒間、Milli-Q水で3回洗浄した。その後、該2-DEゲルを、25分間、0.2%硝酸銀で処理し、そして各々1分間、Milli-Q水で3回リンスした。該2-DEゲルを次いで、3%炭酸ナトリウム、0.018%ホルムアルデヒドおよび0.02%チオ硫酸ナトリウムを含む発色溶液 (developer solution) に浸漬した。染色の所望の強度は、3~4分間発色溶液中に2-DEゲルを浸漬後に達成された。発色 (development) を、10分間の1.4%EDTAナトリウムの添加によって停止し、そして次いで該2-DEゲルを、各々2分間、Milli-Q水で2回リンスした。

10

## 【0080】

## 7. SYPRO-Ruby 染色:

2-DE電気泳動を、上記のものと同じの条件下、別の12.5%ポリアクリルアミドゲル上において実行した。その後、該ゲルを、30分間、水中10%メタノール/7%酢酸において固定し、続いて5分間水で各々3回洗浄した。最大感度を得るために、該ゲルを、少なくとも3時間、製造業者の使用説明書に従って、SYPRO-Ruby溶液 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) と共にインキュベートした。バックグラウンド蛍光を減少させそして感度を増加させるために、該染色されたゲルを、30分間、水中10%メタノール/7%酢酸で洗浄した。

## 【0081】

## 8. 画像記録および分析:

銀染色後、2-DEゲルを、各々5分間水で2回リンスし、その後、Typhoon 9200 ImageMaster (Amersham Biosciences) においてスキャンした。画像分析および2-DEゲルプロテオームデータベースマネージメントを、ImageMaster 2D Platinum Software, version 5.0 (Amersham Biosciences) を使用して行った。2-DEマーカの理論的MrおよびpI値を使用して、2-DEゲルにおける蛋白質スポットのMrおよびpI値を校正した。強度レベルを、全ゲルについて検出された総蛋白質強度の割合として、ゲル間で標準化し、そして各スポットの蛋白質量を、スポット領域上の密度を積分するによって算出した (C.L. Lee et al. (2003), Proteomics, 3: 2472-2486; M.J. Hubbard and N.J. McHugh (2000), Electrophoresis, 21: 3785-3796)。

20

30

## 【0082】

## 9. 質量分析:

SYPRO-Ruby染色された2-DEゲルを、イン-ゲルトリプシン消化 (in-gel trypsin digestion) に供した。その後、トリプシン消化ペプチド (Tryptic peptides) を、該染色された2-DEゲル上の選択された蛋白質スポットから得、次いで、以前に記載されたリフレクトロンポジティブイオンモード (reflectron positive ion mode) (C.L. Lee et al. (2003), Proteomics, 3:2472-2486; J. Kim et al. (2002), Electrophoresis, 23:4142-4156) において操作される、マトリクス支援レーザー脱離/イオン化 四重極-飛行時間型 (MALDI-Q-TOF) (matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole-time of flight) 質量分析計 (M@LDI<sup>TM</sup>; Micromass, Manchester, UK) を使用して、MALDIペプチドマスフィンガープリンティング (MALDI peptide mass fingerprinting) (PMF) に供した。簡単に言えば、サンプルを、60%ACN/1%TFA中 - シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) の飽和マトリクス溶液を使用して、96ウエルフォーマットMALDIターゲットプレート上へスポットした。器機を、標準ペプチド混合物で外部から校正し、そして更に、近点校正物質 (near-point calibrant) として副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を使用してロックマスフィーチャー (lock mass feature) で調節した。質量スペクトルを、900~3000Daの質量範囲について獲得し、そしてMASCOTプログラムを使用してSWISS-PROTデータベースに対するPMFサーチのためにProteinLynx<sup>TM</sup>ソフトウェアによって

40

50

自動で処理した (A.I. Nesvizhskii and R. Aebersold (2004), Drug Disc. Today, 9:173-181)。サーチパラメータは、1つの失われた切断 (one missed cleavage)、メチオニンの酸化、N末端アセチル化、およびシステインのカルボキサミド-メチル化を考慮に入れた。蛋白質のポジティブ同定は、50 ppmまたはそれより良好な質量精度での少なくとも5つのマッチングペプチド質量を必要とした。

#### 【0083】

10. Wnt-1蛋白質の1-DEおよび2-DEウェスタンブロット分析:

分析1-DEおよび2-DEゲルを、標準手順に従って、Wnt-1蛋白質のウェスタンブロット分析のためにPVDF膜 (Hybond P, Amersham Biosciences) 上に電気移動させ (electrotransferred)、ここで、使用した一次抗体は、ビオチン結合ウサギ抗-Hit Wnt-1抗体 (ZYMED Lab. Inc., CA) であり、そして使用した二次抗体は、HRP結合マウス抗-ウサギIgG (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) であった。その後、PVDF膜を、増強された化学発光検出システム (ECLplus, Amersham Biosciences) で処理し、続いて3~15分間オートラジオグラフィフィルムへ暴露した。Wnt-1蛋白質の発現レベルを、ImageMaster TotalLab, Version 2.01 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) を使用して、該フィルム上で半定量的に評価した。

10

#### 【0084】

結果:

1. HBV-およびHCV-関連HCC腫瘍および非腫瘍組織におけるNF- $\kappa$ Bの構成的活性化:

20

HVBおよびHCV関連HCC肝臓検体の腫瘍および非腫瘍部分におけるNF- $\kappa$ Bの活性化を、EMSAによって、単独でまたはスーパーシフトアッセイと組み合わせて、分析した。詳細には、表1に列挙されるHCC患者番号1~9の検体の腫瘍および非腫瘍部分からの核蛋白質サンプルを、NF- $\kappa$ Bについてのプローブとして抗-p50を使用して、EMSAへ、単独でまたはスーパーシフトアッセイと組み合わせて供した。図2は、抗-p50でプローブした場合の、HCC患者番号1~7の検体の腫瘍および非腫瘍部分からの核蛋白質サンプルのEMSAおよびスーパーシフトアッセイ結果を示しており、一方、図3は、HCC患者番号8および9の検体の腫瘍および非腫瘍部分からの核蛋白質サンプルのEMSA結果を示している。別のEMSA実験を、本発明の研究の更なる検証のために、1つの対のHCC腫瘍および非腫瘍組織、胆石の胆嚢切除の間の肝生検からの1つの正常な肝臓コントロール、ならびに患者番号10~17の8個の更なる検体のうち5つからの腫瘍組織を使用して行った (データは示さず)。

30

#### 【0085】

シフトしたバンドの特異性を、D.I. Tai et al. (2000), Hepatology, 31:656-664に記載される手順に従って行われたEMSA実験において使用した変異プローブ (mutant probe) および50倍過剰量の野生型コールドプローブ (wild-type cold probe) との競合研究によって確かめた。スーパーシフト研究は、HBVおよびHCV感染した肝臓における活性化NF- $\kappa$ Bバンドは、抗-p50でのスーパーシフトを受けることを示した (図2を参照のこと)。抗-p65でのスーパーシフト実験は、同様の結果を示した (データは示さず)。HBVおよびHCVの両方に感染した肝臓のシフトバンドは、過剰量野生型コールドプローブによってほとんど完全に無効にされたが (データは示さず)、変異プローブとの競合時に変化されなかった (データは示さず)。

40

#### 【0086】

文献において、多数の因子または蛋白質がNF- $\kappa$ B活性化に関連していると報告されている (W.C. Sha (1998), J. Exp. Med., 187:143-146; Q. Li and I.M. Verma (2002), Nature Rev. Immunol., 2:725-734; D. Hanahan and R.A. Weinberg (2000), Cell, 100:57-70; M. Karin et al. (2002), Nature Rev. Cancer, 2:301-310; E. Pikarsky et al. (2004), Nature, 431: 461-466; A. Lin and M. Karin (2003), Semin. Cancer Biol., 13: 107-114)。従って、腫瘍部分におけるNF- $\kappa$ B活性化は、同一患者の非腫瘍部分におけるそれよりも必ずしも顕著であるとは限らない。図2および3において示されるE

50

M S A およびスーパーシフトアッセイ結果は、N F - B の構成的活性化が、表 1 に列挙される H B V および / または H C V に感染した患者番号 1 ~ 9 の対の検体の腫瘍および非腫瘍部分中に存在することを明らかにしている。

【 0 0 8 7 】

2 . 免疫沈降 ( I P ) 無しまたは有りでの N F - B 結合蛋白質複合体の 2 - D E :

表 1 に列挙される 9 人の H C C 患者の検体の腫瘍部分から抽出された蛋白質を、それぞれ、抗 - p 5 0 または抗 - p 6 5 のいずれかを使用する免疫沈降 ( I P ) へ供し、そして該 9 人の H C C 患者の蛋白質サンプル中の得られた N F - B 結合蛋白質複合体を、回収しそして共にプールし、2 - D E 分析を実行し、続いて銀染色を行った。図 4 は、抗 - p 5 0 によってプローブされた N F - B 結合蛋白質複合体のプロテオームプロファイルを示しており、一方、図 5 は、抗 - p 6 5 によってプローブされた N F - B 結合蛋白質複合体のプロテオームプロファイルを示している。

10

【 0 0 8 8 】

別の実験を、表 1 に列挙される 9 人の H C C 患者の検体の腫瘍部分からのプールされた総蛋白質を I P 無しで直接 2 - D E 分析に供し、続いて銀染色を行うことによって、並行して行った。結果を図 6 に示す。

【 0 0 8 9 】

図 6 を参照して、抗 - p 5 0 および / または抗 - p 6 5 を使用する I P で処理された 2 - D E ゲル上においてポジティブに銀染色されたものに等しい 2 0 個のスポットを、任意に選択しそして共にマッピングした。これら 2 0 個のスポットを、引き続いての実験における分析のために選択した。

20

【 0 0 9 0 】

3 . 蛋白質スポットの質量分析 :

別の 2 - D E ゲルを、銀染色した 2 - D E ゲルのために使用したものと同一の条件下で実行した。S Y P R O - R u b y 染色後、図 6 に記載のスポットに対応する 2 0 個の蛋白質スポットを、イン - ゲルトリプシン消化に供し、続いて、M A L D I - T O F 質量分析計を使用して質量分析を行った。

【 0 0 9 1 】

図 7 は、これら 2 0 個の選択されたスポットの質量分析結果を示している。更には、これら 2 0 個の蛋白質スポットの質量分析後に得られたデータベースサーチ結果は、I P 蛋白質の 2 - D E プロファイルにおけるいくつかのスポットが、抗 - N F - B 抗体の重鎖または軽鎖の誘導体であり得るという可能性を排除した ( ruled out ) ( データは示さず ) 。

30

【 0 0 9 2 】

4 . H B V および / または H C V 関連 H C C 患者からの肝臓検体の腫瘍および非腫瘍部分におけるスポット M I 2 0 5 4 3 4 の量比較およびイムノプロット分析 :

図 6 の銀染色された 2 - D E ゲルから選択された 2 0 個の蛋白質スポットを、半質量的に測定した。該 9 個の対の H C C 検体の腫瘍部分と非腫瘍部分との間に、該蛋白質スポットの発現レベルの点で、差異があるということは、驚くべきことであった。特に、スポット M I 2 0 5 4 3 4 について、その測定された値は、該 9 個の対の H C C 検体のうち 7 個で、少なくとも 2 倍、非腫瘍部分においてよりも腫瘍部分において有意に高かった。図 8 ~ 1 0 はそれぞれ、前述の表 1 に列挙した H C C 患者番号 1 , 5 および 9 の検体の腫瘍部分および非腫瘍部分間のスポット M I 2 0 5 4 3 4 の量比較結果を示している。

40

【 0 0 9 3 】

表 2 は、該 9 個の対の H C C 検体の各々の非腫瘍部分におけるそれに対する腫瘍部分におけるスポット M I 2 0 5 4 3 4 の測定量の比率を示している。非腫瘍部分におけるそれに対する腫瘍部分におけるスポット M I 2 0 5 4 3 4 ( 即ち、W n t - 1 蛋白質 ) の発現の最大増加 ( 1 1 . 4 倍 ) は、B 型肝炎および C 型肝炎に罹患した H C C 患者番号 9 において観察された。

【 0 0 9 4 】

50

## 【表 2】

表 2. 9 個の対の HCC 検体の各々の非腫瘍部分におけるそれに対する腫瘍部分におけるスポット MI205434 の測定ボリュームの比率

HCC 患者番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
腫瘍：非腫瘍	3.5*	0.9	3.0	2.6	1.4*	2.7	2.1	2.2	11.4**

\*: 該比率は、図 8 および 9 にそれぞれ示されるように、HCC 患者番号 1 および 5 の対の検体の非腫瘍部分におけるそれに対する腫瘍部分におけるスポット MI205434 の測定ボリュームに基づいて、算出した。

\*\*： 該比率は、図 10 に示されるように、HCC 患者番号 9 の対の検体の非腫瘍部分におけるそれに対する腫瘍部分におけるスポット MI205434 の測定ボリュームに基づいて、算出した。

10

## 【 0 0 9 5 】

MALDI ペプチドマスフィンガープリント (MALDI peptide mass fingerprint) (PMF) 分析によるスポット MI 2 0 5 4 3 4 のデータベースサーチ結果は、スポット MI 2 0 5 4 3 4 についていくつかの蛋白質候補が存在することを示した (データは示さず) 。しかし、MALDI PMF 分析によるデータベース結果 (図 3 を参照のこと)、抗 - ヒト Wnt - 1 を使用する HCC 患者番号 1 および 5 の対の検体の 2 - DE ウェスタンブロット分析からの実験結果 (図 1 1 を参照のこと)、ならびに 8 個の更なる HCC 患者 (患者番号 10 ~ 17) からの検体の 1 - DE ウェスタンブロットについてのデンシトメトリ分析からの実験結果 (図 1 2 を参照のこと) の統合は、スポット MI 2 0 5 4 3 4 の最も可能性ある候補蛋白質が Wnt - 1 蛋白質であることを示唆した。

20

## 【 0 0 9 6 】

## 【表 3】

表 3. スポット MI205434 についてのペプチドマスフィンガープリントのデータベースサーチ結果\*

1	MGLWALLPGW	VSATLLLLALA	ALPAALAANS	SGRWWGIVNV	ASSTNLLTDS					
51	KSLQLVLEPS	LQLLSRKQRR	LIRQNPGILH	SVSGGLQSAV	RECKWQFRNR					
101	RWNCPTAPGP	HLFGKIVNRG	CRETAFIFAI	TSAGVTHSVA	RSCSEGSIES					10
151	CTCDYRRRGP	GGPDWHWGGC	SDNIDFGRLF	GREFVDSGEK	GRDLRFLMNL					
201	HNNEAGRITV	FSEMRQECKC	HGMSGCTVR	TCWMRLPTLR	AVGDVLRDRF					
251	DGASRVLYGN	RGSNRASRAE	LLRLEPEDPA	HKPPSPHDLV	YFEKSPNFCT					
301	YSGRLGTAGT	AGRACNSSSP	ALDGCELLCC	GRGHRTRTQR	VTERCNCTFH					
351	WCCHVSCRNC	THTRVLHECL								
開始 - 末端	実測値	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	配列				
74 - 94	2180.05	2179.04	2179.12	-0.08	1	QNPGLHSVSGGLQSAVRECK				20
102 - 115	1581.73	1580.72	1580.76	-0.03	0	WNCPTAPGPHLFGK カハ <sup>*</sup> ミト <sup>*</sup> メル (C)				
159 - 178	2129.99	2128.98	2128.88	0.10	0	GPGPDWHWGGCSDNIDFGR				
196 - 215	2399.17	2398.16	2398.12	0.05	1	FLMNLHNNEAGRITTVFSEMR 2 酸化 (M)				
295 - 313	1915.92	1914.91	1914.90	0.01	1	SPNFCTYSGRLGTAGTAGR				
359 - 370	1425.62	1424.61	1424.67	-0.06	1	NCTHTRVLHECL				

注: \*適合: NCBI/SWISS PROT Accession No. P04628.

スコア: 45

予想(Expect): 1.4

Wnt-1 プロト-癌遺伝子蛋白質前駆体

配列範囲(Sequence Coverage): 29%

30

## 【0097】

更に、図 12 から、Wnt-1 の発現レベルが、該更なる 8 個の対の HCC 検体 (患者番号 10 ~ 17) のうち 6 個で、非腫瘍部分におけるそれよりも腫瘍部分において少なくとも 2 倍増強されたことが理解され得る。

## 【0098】

得られた結果、特に、表 2 および図 12 に示されるものに基づいて、Wnt-1 蛋白質は、被験体における HCC の素因を検出するため、または HCC を有する被験体の予後を予測するための、バイオマーカーとして使用され得る。

40

## 【0099】

詳細には、今までのところ研究された患者から回収された結果によれば、肝細胞癌を有するかまたは有すると思われる被験体の予後が、該被験体から採取した対の肝臓検体の非腫瘍部分におけるそれと腫瘍部分における Wnt-1 発現のレベルとを比較することから得られる比率値に基づいて評価され得、ここで、該被験体は、以下を有すると評価される:

- (i) 得られた該比率値が 2 より大きい場合、6 ヶ月以下の予後 (prognosis);
- (ii) 得られた該比率値が 1 ~ 2 である場合、6 ~ 18 ヶ月の予後; および
- (iii) 得られた該比率値が 1 未満である場合、少なくとも 18 ヶ月の予後。

## 【0100】

50

議論：

本発明の研究は、機能的プロテオームアプローチによって、HCC腫瘍および非腫瘍組織におけるNF- $\kappa$ B結合シグナリング蛋白質複合体(NF- $\kappa$ B-associated signaling protein complexes)を分析した。Wnt-1蛋白質の発現レベルは、HBVおよびHCVの少なくとも1つに感染した患者から採取した対の肝臓検体の非腫瘍部分におけるよりも腫瘍部分においてより高いことが偶然に見出された。

【0101】

初めて、本発明者は、Wnt-1発現のレベルが、HBVおよびHCVの少なくとも1つに感染した患者から採取した対の肝臓検体の非腫瘍部分においてよりも腫瘍部分において増強されることを実証した。この増強は、HCCの肝細胞癌発生に臨床的に関連している。最も重要なことに、Wnt-1蛋白質の過剰発現は、NF- $\kappa$ Bシグナリングに関連している。これは、NF- $\kappa$ Bが、炎症関連癌(inflammation-associated cancer)における腫瘍プロモータとして機能するというPikarskyらによって報告されるデータと一致している(E. Pikarsky et al. (2004), Nature, 431:461-466)。

10

【0102】

HBVおよびHCV感染の共通の症状発現は、肝臓における共通の組織病理学的変化、慢性肝炎から、肝硬変および最終的にはHCCへの共通の臨床的進展を包含する(Brecht, C. 2001. In: Arias, I.M. editor-in-chief. The Liver: Biology and Pathobiology. 4th ed. Philadelphia (PA): Lippincott: P.801-830)。臨床的には、マルチモダリティ処置プロトコル(multimodality treatment protocols)がHCC患者を処置するために適用されているが、この癌の予後は依然として非常に悪い(A. Sangiovanni et al. (2004), Gastroenterology, 126:1005-1014; S. Ueno et al. (2001), Hepatology, 34:529-534; T.W.T. Leung et al. (2002), Cancer, 94:1760-1769; J. Bruix and J.M. Llovet (2002), Hepatology, 35:519-524)。

20

【0103】

プロト発癌性(proto-oncogenic)蛋白質Wnt-1とNF- $\kappa$ B活性との関連は、BournatらによってJ. Neurosci. Res., 61:21-32, 2000において初めて報告された。彼らの研究は、PC12細胞、神経堤直系のラット褐色細胞腫細胞(rat pheochromocytoma cell line of neural crest lineage)のWnt-1介在生存は、NF- $\kappa$ B活性化に依存すること、ならびにWnt-1の安定発現はNF- $\kappa$ B活性を増加させることを示した。WntシグナリングとNF- $\kappa$ B経路との関連は、以前、プロテアソームによるユビキチン依存性蛋白質分解を研究する際に気付かれた。その経路のキーマディエーターは、 $\beta$ -カテニンである(K. Willer and R. Nusse (1998), Curr. Opin. Genet. Dev., 8: 95-102)。その上、HBVのX-蛋白質(HBx)が $\beta$ -カテニンの安定化を増強させ得、そして活性化Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナリングのために必須であるという、HBVとWntシグナリングとの関連が、肝癌細胞において最近報告された(M.Y. Cha et al. (2004), Hepatology, 39:1683-1693)。

30

【0104】

HCV感染とWnt/ $\beta$ -カテニンシグナリングとの関連は未だ報告されていない。しかし、熱ショック蛋白質27(heat-shock protein 27)(HSP27)が、HCVの非構造蛋白質5A(nonstructural protein 5A)(NS5A)と相互作用すると、プロテオームアプローチによって確認された(Y.W. Choi et al. (2004), Biochem. Biophys. Res. Commun., 318: 514-519)。同様に、HSP70は、HCV関連HCC腫瘍組織において過剰発現への傾向を示した(M. Takashima et al. (2003), Proteomics, 3: 2487-2493)。誘導される熱ショック蛋白質は、変性細胞蛋白質を安定化および部分的に修復することを助けるものを含み、そしてユビキチン依存性蛋白質分解経路に密接に関連しており(H. Shimura et al. (2004), J. Biol. Chem., 279: 4869-4876)、そしてまた、NF- $\kappa$ Bシグナリングおよび細胞生存に関連している(R. Ran et al. (2004), Genes Dev., 18:1466-1481)。従って、HCV感染とWnt/ $\beta$ -カテニンシグナリングとの間接的な関連のみが、今回、共に連結され得る。この考察は、更なる研究を必要とする。

40

50

## 【 0 1 0 5 】

累積的証拠が、NF- $\kappa$ Bの活性化がアポトーシスを阻害すること、およびNF- $\kappa$ Bの阻害が増加されたアポトーシスにより抗腫瘍治療を増強することを示している (A.A. Berg, and D. Baltimore (1996), *Science*, 274:782-784; D.J. Van Antwerp et al. (1996), *Science*, 274:787-789; C.Y. Wang et al. (1999), *Nat. Med.*, 5:421-427)。I $\kappa$ B-1遺伝子、アポトーシスインヒビターの活性化およびアポトーシス蛋白質 (c-IAP1およびc-IAP2)のインヒビターの誘導が、NF- $\kappa$ B介在細胞生存に関与し得ることも報告された (M.X. Wu et al. (1998), *Science*, 281: 998-1001; C.Y. Wang et al. (1998), *Science*, 281:680-1683)。HBVおよびHCVが感染したHCC腫瘍および非腫瘍組織におけるNF- $\kappa$ B関連Wnt-1蛋白質発現がこれら抗-アポトーシス因子に関連しているか否かは、依然として不明のままである。 10

## 【 0 1 0 6 】

累積的証拠は、進化的に保存された (evolutionarily conserved) Wnt-シグナリング経路は、多くの器官の発生の中に重要な役割を有し得 (K.M. Cardigan and R. Nusse (1997), *Genes Dev.*, 11:3286-3305; A. Ruiz i Altaba et al. (2002), *Nature Rev. Cancer*, 2:361-370; F.J.T. Staal et al. (2005), *Nature Rev. Immunol.*, 5: 21-30)、そして調節異常の (dysregulated) Wnt-シグナリングは、種々の腫瘍の開始および疾患の発生において重要な因子であることを示唆している (P. Polakis, (2000), *Genes Dev.*, 14:1837-1641; J. Taipale and P.A. Beachy (2001), *Nature*, 411: 349-354; D. Kaldron (2002), *Trends Cell. Biol.*, 12: 523-531; A. Ruiz i Altaba et al. (2002), *Nature Rev. Cancer*, 2:361-370; J.R. Miller (1999), *Oncogene*, 18:7860-7872; W.J. Nelson and R. Nusse (2004), *Science*, 303: 1483-1487)。 20

## 【 0 1 0 7 】

Wnt-1蛋白質の発現が、非腫瘍組織においてよりもHBVおよび/またはHCVの両方に関連するHCC腫瘍組織において増強されるという本発明者の知見は、癌形成に関連している。NF- $\kappa$ B結合Wnt-1蛋白質は、HBVおよびHCV関連肝細胞発生の共通事項 (common denominator) として役立ち得ることが提案される。NF- $\kappa$ B結合Wnt-1蛋白質の増強された発現に関してのこの提案のシナリオを、図13に示す。この提案についての可能な科学的基礎は、Wnt蛋白質 (Wnt) が、典型的なG蛋白結合レセプター (G protein-coupled receptors) に似ている、Frizzled (Fz) レセプターについてのリガンドであるということである (K.M. Cardigan and R. Nusse (1997), *Genes Dev.*, 11:3286-3305; J.R. Miller et al. (1999), *Oncogene*, 18:7860-7872)。従って、Wnt蛋白質は膜Fzレセプターに対して細胞外的に作用するが、Wnt-シグナリングは、レセプター介在エンドサイトーシスの機構によって細胞内的に、NF- $\kappa$ Bを含むマルチプロテインコンプレックス (multiprotein complex) の調節に関与し得る。HBVおよびHCV感染によって活性化されたNF- $\kappa$ Bは、更に、Wntおよび細胞成長を制御する他の調節因子と相互作用し得ると考えられる。NF- $\kappa$ BシグナリングがWnt-1蛋白質発現をどのように増強するか、およびこれらの複合体 (complexes) が、HBVおよびHCV関連肝細胞癌発生においてWnt-1蛋白質とどのように関連するかについての問題は、依然として明確にされる必要がある。より複雑な病態生理学的コンテキストでの、HBVおよび/またはHCV、NF- $\kappa$ B、Wnt-1、 $\beta$ -カテニン経路およびHCC間のコネクションを探究するために、更なる研究が必要とされる。 30 40

## 【 0 1 0 8 】

Wntシグナリング経路が、髄芽腫を有する子供における (R.J. Gilbertson (2004), *Lancet Oncol.*, 5:209-218)、そして頭および首扁平上皮細胞癌 (head and neck squamous cell carcinomas) を有する人における (C.S. Rhee (2002), *Oncogene*, 21:6598-6605)、新規の処置レジメを設計するための治療標的として使用され得ることが提案されている。理論的に、それは、HCCの処置における非常に有効な治療剤を設計するためおよび肝細胞癌発生の化学的予防のために (W.K. Hong and M.B. Sporn (1997), *Science*, 278: 1073-1077; W.J. Nelson and R. Nusse (2004), *Science*, 303:1483-1487)、NF- $\kappa$ B 50

シグナリング (A. Lin and M. Karin (2003), *Semin. Cancer Biol.*, 13:107-114; C.Y. Wang et al. (1999), *Nat. Med.*, 5:421-427) と共に、Wntシグナリング経路 (J. Taipale and P. A. Beachy (2001), *Nature*, 411:349-354; Kalderon, D. (2002), *Trends Cell Biol.*, 12:523-531; A. Ruiz i Altaba et al. (2002), *Nature Rev. Cancer*, 2:361-370; R.J. Gilbertson (2004), *Lancet Oncol.*, 5:209-218; C.S. Rhee et al. (2002), *Oncogene*, 21:6598-6605) を標的化することによって、実現可能である。

【0109】

最後に、本発明者の研究は、NF- $\kappa$ B結合Wnt-1蛋白質の増強された発現が、HBVおよびHCV関連肝細胞癌発生の共通の機構を構成し得ることを示唆している。

【0110】

本明細書において引用された全ての特許および文献は、参照により、それらの全体が本明細書中に組み込まれる。コンフリクトの場合、規定を含む本明細書が優勢である。

【0111】

本発明は、上記特定の実施形態を参照して説明されたが、多数の修飾および改変が、本発明の範囲および精神を逸脱することなく成され得ることが明らかである。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲によって示されるようにのみ限定されることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0112】

【図1】図1は、本発明の研究プロトコルを図示しており、ここで、腫瘍および非腫瘍部分に分離された各々の対のHCC検体の肝臓組織から抽出された蛋白質が、種々の実験に供されている；略語：EMSA、電気泳動移動度シフトアッセイ；IP、免疫沈降；2-DE、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動；およびMALDI-Q-TOF、マトリクス支援レーザー脱離/イオン化-四重極-飛行時間(matrix-assisted laser desorption/ionization-quadrupole-time-of-flight)。

【図2】図2は、抗-NF- $\kappa$ B p50抗体(抗-p50)でプローブされる場合の、抽出された核蛋白質のEMSAおよびスーパーシフトアッセイ結果を示しており、該抽出された核蛋白質は、前述の表1に列挙されるHCC患者番号1~7の検体の腫瘍および非腫瘍部分からそれぞれ得られ、ここで、略語：T、HCC検体の腫瘍部分から抽出された核蛋白質、そしてNT、HCC検体の非腫瘍部分から抽出された核蛋白質。

【図3】図3は、前述の表1に列挙されるHCC患者番号8~9の検体の腫瘍および非腫瘍部分からそれぞれ得られた、抽出された核蛋白質のEMSA結果を示しており、ここで、略語：T、HCC検体の腫瘍部分から抽出された核蛋白質、そしてNT、HCC検体の非腫瘍部分から抽出された核蛋白質。

【図4】図4は、2-DEゲルの銀染色結果を示しており、ここで、前述の表1に列挙される9人のHCC患者の検体の腫瘍部分から抽出された蛋白質(500 $\mu$ g)が、それぞれ、抗-p50を使用する免疫沈降(IP)へ供され、そして該9人のHCC患者の蛋白質サンプルにおいて得られる免疫複合体が、回収されそして共にプールされ、12.5%ポリアクリルアミドゲルを使用する二次元電気泳動(2-DE)分析を実行し、続いてこのように得られた2-DEゲルが銀染色され、この上においてスポットMI205434の位置がマークされた。

【図5】図5は、2-DEゲルの銀染色結果を示しており、ここで、前述の表1に列挙される9人のHCC患者の検体の腫瘍部分から抽出された蛋白質(500 $\mu$ g)が、それぞれ、抗-NF- $\kappa$ B p65抗体(抗-p65)を使用する免疫沈降(IP)へ供され、そして該9人のHCC患者の蛋白質サンプルにおいて得られる免疫複合体が、回収されそして共にプールされ、12.5%ポリアクリルアミドゲルを使用する2-DE分析を実行し、続いてこのように得られた2-DEゲルが銀染色され、この上においてスポットMI205434の位置がマークされた。

【図6】図6は、2-DEゲルの銀染色結果を示しており、ここで、前述の表1に列挙される9人のHCC患者の検体の腫瘍部分からのプールされた総蛋白質が、12.5%ポリアクリルアミドゲルを使用する2-DE分析に供され、続いて、このように得られた2-

10

20

30

40

50

D E ゲルが銀染色され、この上において、抗 - p 5 0 および / または抗 - p 6 5 を使用する I P で処理された 2 - D E ゲルにおいてポジティブに染色されたものに等しい 2 0 個のスポットの位置が、ImageMaster 2D Platinum Software, version 5.0 (Amersham Biosciences) と組み合わせて、Typhoon 9200 ImageMaster (Amersham Biosciences) を使用して、任意に選択されそして共にマッピングされた (Hubbard, M.J., and McHugh, N.J. (2000), Electrophoresis, 21:3785-3796)。

【図 7】図 7 は、図 6 の銀染色された 2 - D E ゲルについて使用したものと同一の条件下で実行された、S Y P R O - R u b y 染色された 2 - D E ゲルから得られた 2 0 個のスポットの質量分析結果を示しており、そして図 6 に記載のスポットに対応している。

【図 8】図 8 ~ 1 0 は、それぞれ、前述の表 1 に列挙される H C C 患者番号 1、5 および 9 の検体の腫瘍部分および非腫瘍部分との間での、図 6 において同定されたスポット M I 2 0 5 4 3 4 の量比較結果を示しており、ここで、腫瘍肝臓組織と非腫瘍肝臓組織との間でのスポット M I 2 0 5 4 3 4 の量比較は、ImageMaster (Amersham Biosciences) によってなされており、そして参照値は、非腫瘍肝臓組織における対応のスポットから得られた量であり、これは、比較のためのベースライン値として機能する。

【図 9】図 8 ~ 1 0 は、それぞれ、前述の表 1 に列挙される H C C 患者番号 1、5 および 9 の検体の腫瘍部分および非腫瘍部分との間での、図 6 において同定されたスポット M I 2 0 5 4 3 4 の量比較結果を示しており、ここで、腫瘍肝臓組織と非腫瘍肝臓組織との間でのスポット M I 2 0 5 4 3 4 の量比較は、ImageMaster (Amersham Biosciences) によってなされており、そして参照値は、非腫瘍肝臓組織における対応のスポットから得られた量であり、これは、比較のためのベースライン値として機能する。

【図 1 0】図 8 ~ 1 0 は、それぞれ、前述の表 1 に列挙される H C C 患者番号 1、5 および 9 の検体の腫瘍部分および非腫瘍部分との間での、図 6 において同定されたスポット M I 2 0 5 4 3 4 の量比較結果を示しており、ここで、腫瘍肝臓組織と非腫瘍肝臓組織との間でのスポット M I 2 0 5 4 3 4 の量比較は、ImageMaster (Amersham Biosciences) によってなされており、そして参照値は、非腫瘍肝臓組織における対応のスポットから得られた量であり、これは、比較のためのベースライン値として機能する。

【図 1 1】図 1 1 は、前述の表 1 に列挙される H C C 患者番号 1 および 5 の検体の腫瘍部分および非腫瘍部分の 2 - D E ウェスタンブロット結果を示しており、ここで、表 1 に列挙される H C C 患者番号 1 および 5 の検体の腫瘍および非腫瘍部分から抽出された蛋白質は、それぞれ、2 - D E へ供され、続いて、抗 - ヒト W n t - 1 抗体でプローブされるウェスタンブロットティングが行われた；略語：T、H C C 腫瘍部分；および N、H C C 非腫瘍部分。

【図 1 2】図 1 2 は、the Tumor and Serum Bank of Chi-Mei Medical Center から得られた更なる 8 個の対の H C C 検体 (患者番号 1 0 ~ 1 7) の腫瘍および非腫瘍部分の一次元電気泳動 (1 - D E) - ウェスタンブロットについてのデンシトメトリー分析結果を示しており、ここで、該更なる 8 個の対の H C C 検体の腫瘍および非腫瘍部分から抽出された蛋白質は、1 2 . 5 % ポリアクリルアミドゲルを使用する 1 - D E 分析に供され、続いて、抗 - ヒト W n t - 1 抗体でプローブされたウェスタンブロットティングが行われ、そして該更なる 8 個の対の H C C 検体の腫瘍および非腫瘍部分の各々における W n t - 1 蛋白質の発現レベルが、the ImageMaster (Amersham Biosciences) を使用する半定量的分析によって測定され；参照値 1 0 0 は、患者番号 1 7 の腫瘍組織の W n t - 1 蛋白質バンドから得られた総カウントであり、これは比較のためのベースライン値として機能し；患者番号 1 0 ~ 1 3 は、H C V 感染した被験体であり、一方、患者番号 1 4 ~ 1 7 は H B V 感染した被験体であり；略語：T、腫瘍組織；N T、非腫瘍組織；および矢印は、W n t - 1 の位置を示している。

【図 1 3】図 1 3 は、H C C の発生の仮定される経路を示しており、ここで、N F - B シグナリング経路による W n t - 1 蛋白質の活性化は、B 型肝炎および C 型肝炎関連肝細胞癌発生に対して因果関係を有している。

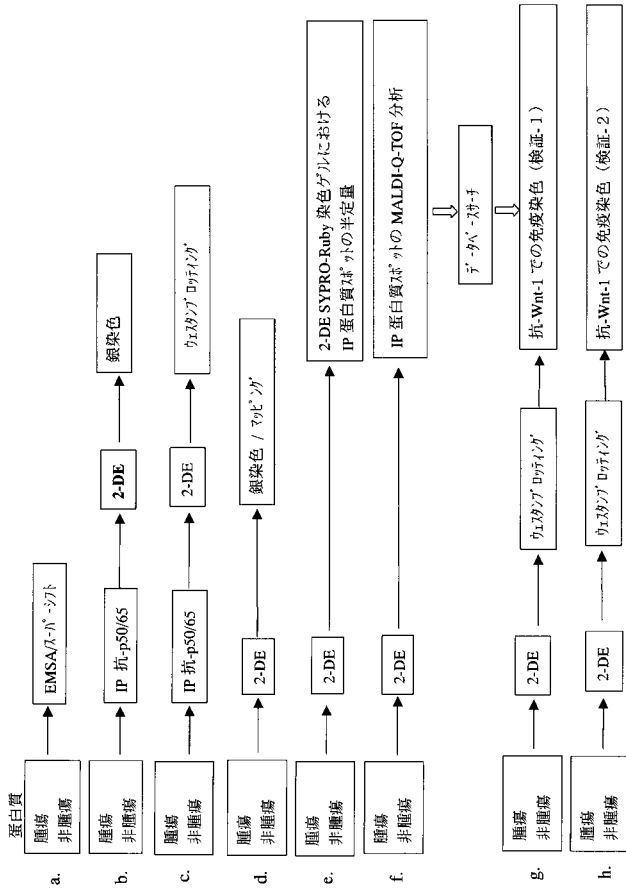
10

20

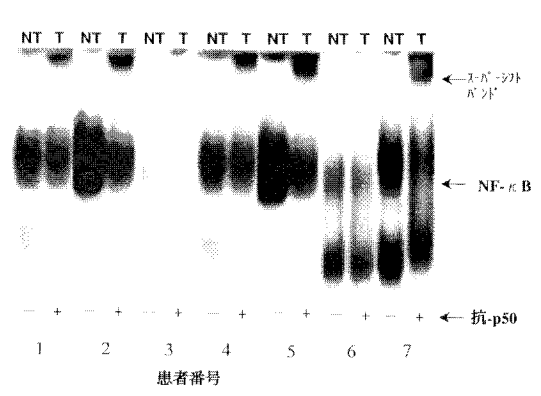
30

40

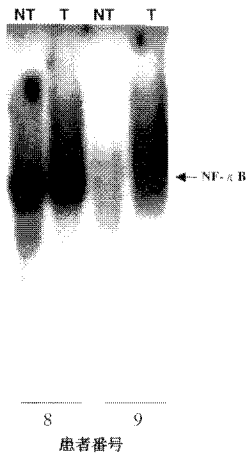
【 図 1 】



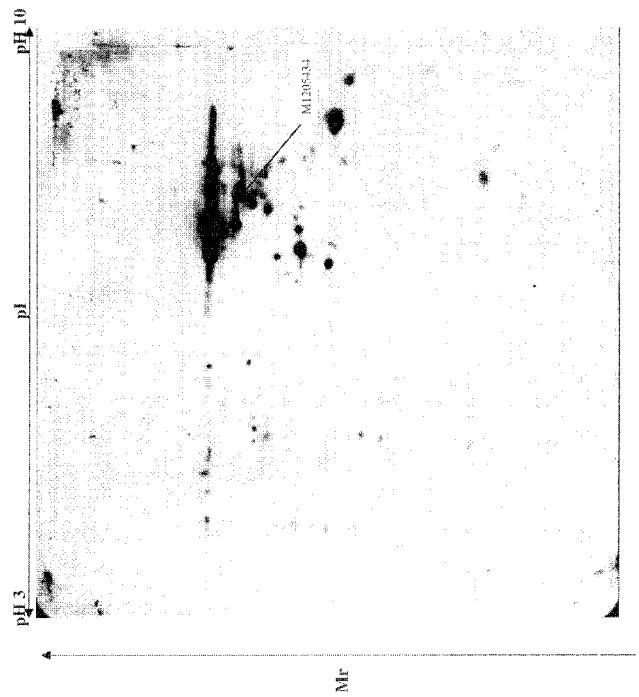
【 図 2 】



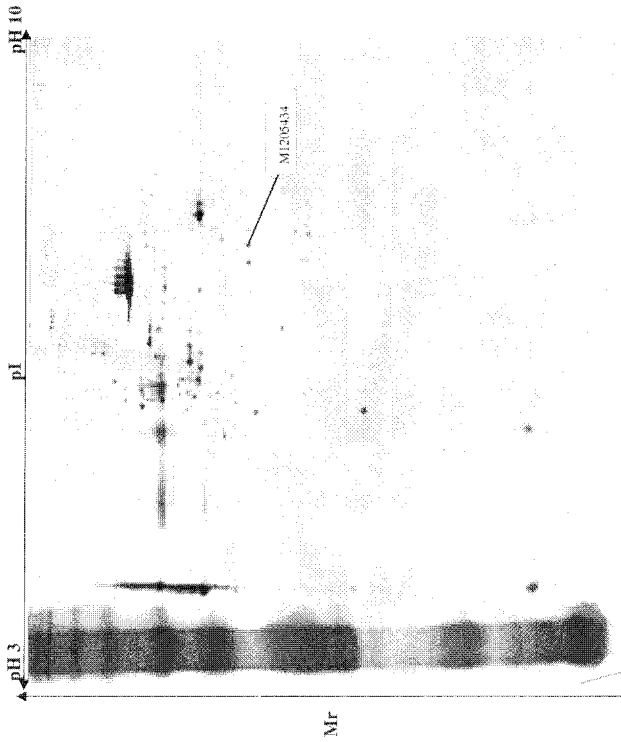
【 図 3 】



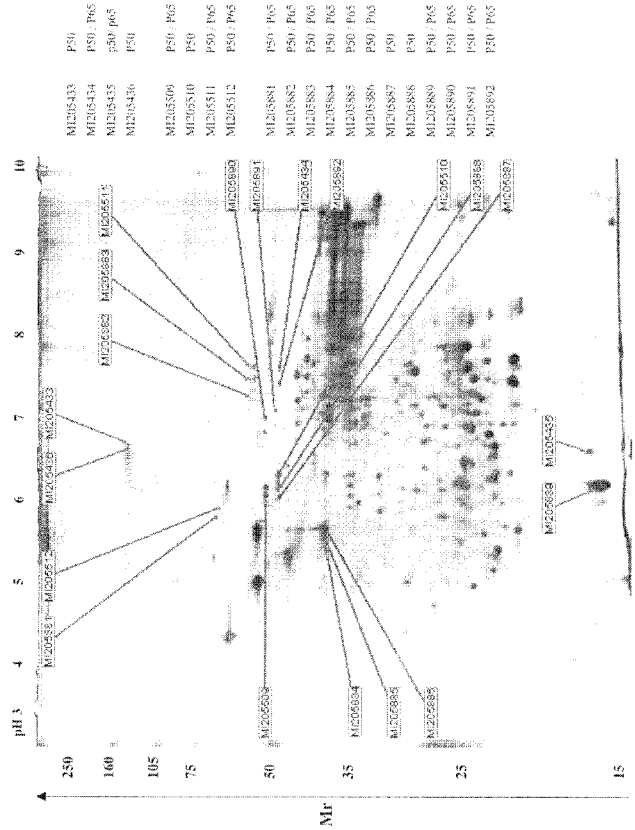
【 図 4 】



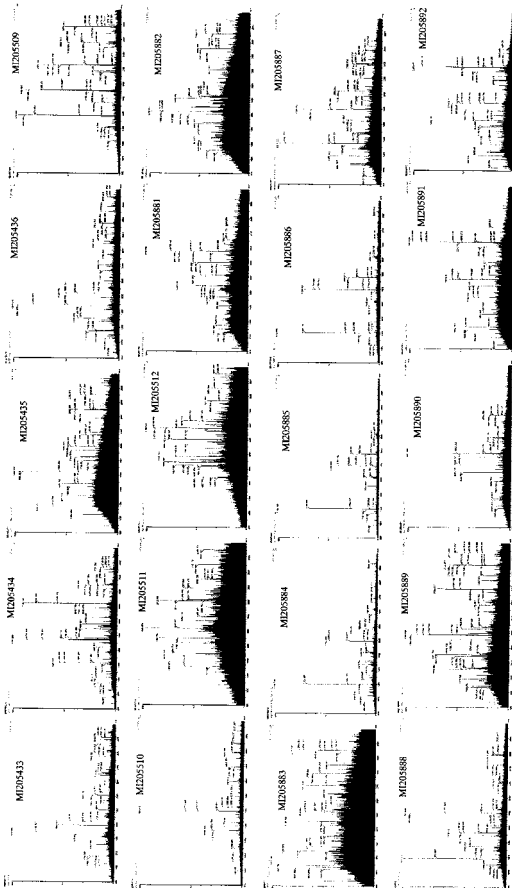
【 図 5 】



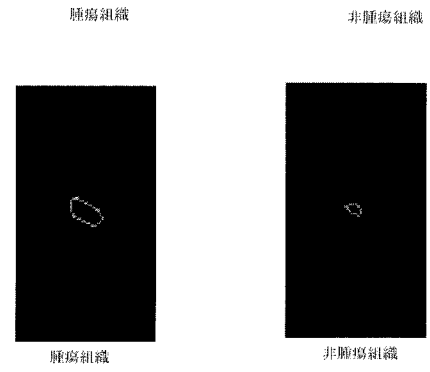
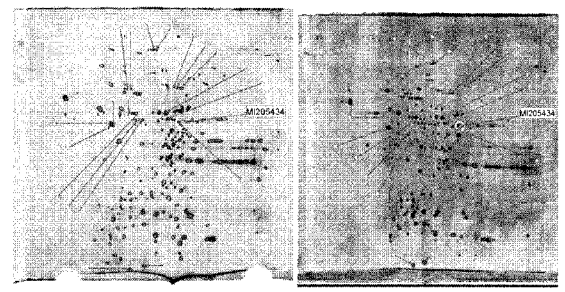
【 図 6 】



【 図 7 】

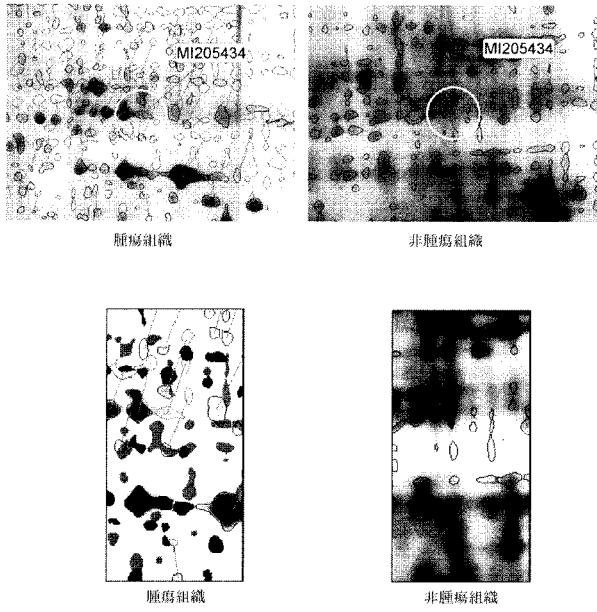


【 図 8 】

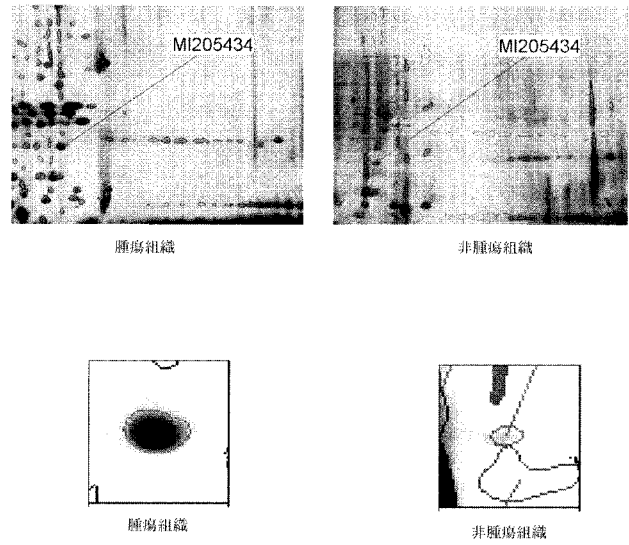


ゲル	ソースゲル	スポット	量: IOD (CV)	倍	均: 対照 (CV)	倍
腫瘍		75	4,171,000	3.5	121	4.03
非腫瘍		82	1,189,000		30	

【 図 9 】



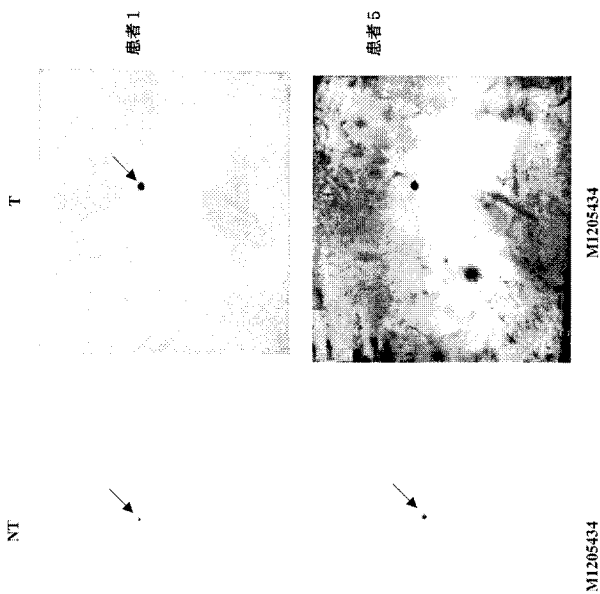
【 図 10 】



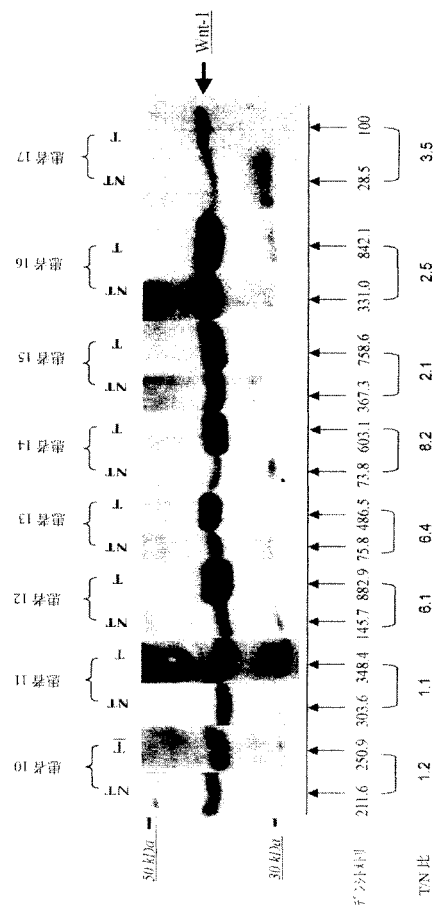
ゲル	ソースゲル	スポット	量: IOD (CV)	倍	対: ビックル (CV)	倍
腫瘍		1264	128.505	1.44	306	1.78
非腫瘍		2330	89.423		172	

ゲル	ソースゲル	スポット	量: IOD (CV)	倍	対: ビックル (CV)	倍
92-12-10-03-02_Ref	92-12-04-03	500	128.375 (119%)		233 (86%)	
92-12-04-03		500	236.057	11.408	376	4.13
92-12-10-03		346	20.692		91	

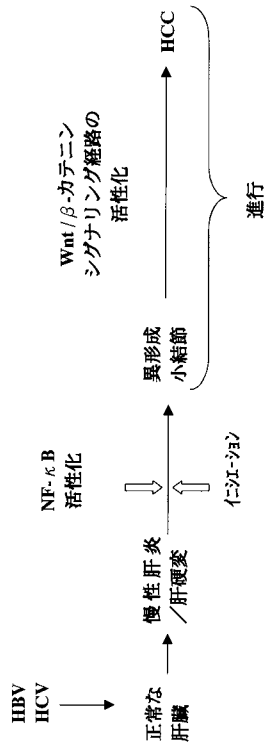
【 図 11 】



【 図 12 】



【 図 1 3 】



【 配列表 】

[2007139742000001.app](#)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/576 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/536	C
C 0 7 K 14/82 (2006.01)	G 0 1 N 33/536	D
	G 0 1 N 21/78	C
	G 0 1 N 33/576	B
	G 0 1 N 33/576	Z
	C 0 7 K 14/82	

特許法第30条第1項適用申請有り 2005年10月14日 Springer Netherlands 発行の「Journal of Biomedical Science(2006), Vol.13, No.1, p27-39, “Enhanced nuclear factor-kappa B-associated Wnt-1 expression in hepatitis B-and C-related hepatocarcinogenesis: identification by functional proteomics”」に発表

Fターム(参考) 4H045 AA30 BA10 CA41 EA51

【外国語明細書】

2007139742000001.pdf

2007139742000002.pdf

2007139742000003.pdf

2007139742000004.pdf

专利名称(译)	用于确定肝细胞癌的易感性和/或预后的生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007139742A</a>	公开(公告)日	2007-06-07
申请号	JP2006112806	申请日	2006-04-14
[标]申请(专利权)人(译)	财团法人奇美医院		
申请(专利权)人(译)	财团法人奇美医院		
[标]发明人	蔡順隆		
发明人	蔡 順 隆		
IPC分类号	G01N33/574 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/536 G01N21/78 G01N33/576 C07K14/82		
CPC分类号	G01N33/57438 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/118 G01N2333/4704		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/536.B G01N33/536.C G01N33/536.D G01N21/78.C G01N33/576.B G01N33/576.Z C07K14/82 C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z G01N33/574.AZN.A		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/CA22 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/EA51		
代理人(译)	斋藤健治		
优先权	11/282888 2005-11-18 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供肝细胞癌 ( HCC ) 的生物标志物。在患有或怀疑患有肝内结节的受试者中，特别是感染了乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒中至少一种的受试者中，确定肝细胞癌 ( HCC ) 的易感性。在HCC中，以及在对患有或怀疑患有HCC的受试者进行预后的方法中，Wnt-1被用作HCC的生物标志物。 [选择图]无

患者 番号	年齢 (歳)	性別	腫瘍		臨床的段階 (Child-Pugh)	ウイルス	肝臓 病変	手術
			段階	組織病理学 (hispathology)				
1	50	F	I	poor-HCC	A	HCV	CH	部分切除
2	60	M	I	well-HCC	A	HCV	AC	部分切除
3	53	M	I	poor-HCC	A	HCV	AC	部分切除
4	62	F	II	mod-HCC	A	HCV	LC	部分切除
5	75	M	II	well-HCC	A	HBV	CH	部分切除
6	49	M	II	poor-HCC	A	HBV	AC	部分切除
7	51	F	I	well-HCC	A	HBV	LC	部分切除
8	75	M	II	mod-HCC	A	HBV	LC	部分切除
9	55	M	II	poor-HCC	B	HBV+HCV	LC	肝葉切除

注: M, 男性; F, 女性; poor-HCC, あまり分化していない肝細胞癌; well-HCC, 十分に分化した HCC; mod-HCC, 中程度に分化した HCC; HBV, B型肝炎ウイルス; HCV, C型肝炎ウイルス; LC, 肝硬変; AC, 活性肝硬変 (active cirrhosis); CH, 慢性肝炎