

肝細胞癌の予後予測因子としての
血液中を循環するメチル化 CCND2 遺伝子

申請者氏名 筒井理仁
所属 山口大学大学院医学系研究科
応用分子生命科学系専攻
消化器・腫瘍外科学

平成 23 年 1 月

目次

第1章 緒言	1
第2章 材料および方法	1
2.1 組織サンプル	1
2.2 血清サンプル	2
2.3 qRT-PCR	2
2.4. <i>DNA</i> 抽出と QMSP	3
第3章 統計分析	3
第4章 結果	4
第5章 考察	5
謝辞	7
参考文献	8
図	12
表	14

第1章 緒言

肝細胞癌 (HCC) は主にB型肝炎ウイルス (HBV) やC型肝炎ウイルス (HCV) 感染による慢性肝疾患から発生し、多くの国で発生率が上昇しており、世界的な問題となっている [1-3]。HCCを根治するには手術が第一選択であるが、International Cooperative Group for HCCによると、人種に関わらず5年生存率はわずか31-41%とされている [4]。高率の再発が予後不良の原因となっており、とくに多中心性発癌によるものではなく、癌細胞の肝内散布による肝内再発が鍵をにぎっている [1, 5-7]。現在では、多くの新規分子標的薬剤がHCCの補助療法として使用可能となってきた [8]。それゆえに、肝細胞癌の予後予測マーカーを同定する事が重要である。

われわれが行ってきた genome-wide study で、HCC における *cyclin D2 (CCND2)* mRNA 発現レベルの低下が根治手術後 1 年以内早期肝内再発と関係している事が明らかとなった [9-11]。われわれや他の研究者が *CCND2* のプロモーター領域が HCC では高率にメチル化されているが、非 HCC ではメチル化されていないことを報告しており [12, 13]、HCC における *CCND2* mRNA の発現の低下は、プロモーター領域の高度メチル化によるものであることが示唆される。さらに最近では、HCC 患者の血液中を循環するメチル化遺伝子の計測による診断効果に関していくつか報告されている [14, 15]。HCC 患者の血液中の cell-free DNA 濃度は、癌特異的遺伝子のメチル化状態を解析するのに十分である事も報告されている [16, 17]。本研究の目的は、根治的肝切除術をうけた患者の予後予測因子となる事を期待して、術前に HCC 患者から採取した血清を用いて、メチル化 *CCND2* レベルを計測することである。

第2章 材料および方法

2.1 組織サンプル

2001 年 4 月から 2005 年 10 月までにわれわれの施設で根治的肝切除術を施行された 38 人の HCC 症例から得られた、癌部 38 サンプルと非癌部 6 サンプル (Table 1) を使用した。以前に報告した判断基準に基づいた術後定期検査で、38

人中 6 人 (15.8%) に術後 1 年以内の早期肝内再発を認めた [9]。切除標本は即座に数片のブロックに切り分けられ、使用まで -80°C で凍結保存された。癌部 38 サンプルと非癌部 6 サンプルは quantitative real-time PCR (qRT-PCR) と quantitative methylation-specific PCR (QMSP) で解析した。この研究のプロトコールは事前に山口大学治験審査委員会で承認されており、入院前に全ての患者からインフォームドコンセントを得ている。

2.2 血清サンプル

われわれは、1998 年 5 月から 2006 年 4 月までに、以前に報告した方法 [17] で病理学的に HCC と診断された後に、われわれの施設で肝切除を受けた HCV 抗体陽性患者 70 名より血清サンプルを収集した。70 例中 12 例 (17.1%) で術後 1 年以内の早期肝内再発を認めた。術後定期検査中に [9]、平均フォローアップ期間 58 ヶ月で 70 例中 59 例 (84.3%) に HCC の再発を認めた。日本肝癌研究会による Tumor-Node-Metastasis (TNM) 分類を本研究では使用した。HCC を罹患していない HCV 感染患者 36 名 (平均年齢 64.3 歳、男 : 女 = 22 : 14) から得られた血清サンプルをカットオフ値決定のためのコントロール DNA として用いた。

2.3 qRT-PCR

CCND2 mRNA の *glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)* に対する相対量を以前に報告した方法 [19] を用いて測定した。TRIzol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を用いて、Total DNA を凍結組織から抽出した。cDNA (初期 RNA10ng から得られたもの) の PCR 増幅を Roche Universal Probe Library (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>) を使った LightCycler II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて行った。使用した PCR プライマーは、*CCND2* 遺伝子用 (NM_001759) に sense (5' -tcaccaacacagacgtgga-3') と antisense (5' -tgtaggggtgctggcttg-3')、*GAPDH* 遺伝子 (NM_002046) 用に sense (5' -agccacatcgctcagacac-3') と antisense (5' -gcccatacgaccaaattcc-3') を使用した。*CCND2* と *GAPDH* の PCR 産物はそれぞれ 143base pairs (bp) と 66bp であった。*CCND2* と *GAPDH* の量を測定するために、それぞれ Universal Probe Library probes #88 (Roche

Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) と #60 を使用した。

2.4. DNA 抽出と QMSP

説明書の手順に従って、切除標本から DNA Isolation Kit for Cells and Tissues (Roche Diagnostics GmbH) を用いて、また、血清 1ml から DNA Extractor SP Kit for Serum and Plasma (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は bisulfate (BIS) 処理し、以前に報告した方法で定量した [13, 16, 20]。以前に報告したように [13, 20]、QMSP で組織と血清から抽出された *CCND2* DNA のメチル化レベルを測定した。BIS 処理後の QMSP は pyero-sequencing 法と一致することを、われわれは以前に確認している [13]。

組織中の *CCND2* のメチル化レベルを同定するために、人工的にメチル化した DNA (CpGenome™ Universal Methylated DNA, Chemicon International Inc., CA, Temecula CA) を段階希釈 (1000, 200, 40, 4pg/ μ l) したものをを用いて同時にスタンダードを計測し、標準曲線を描き、BIS 処理された DNA 溶液 5 μ l (1ng) 中のメチル化 DNA を定量した。組織中のメチル化レベルは、BIS 処理された DNA 溶液の 1 μ l あたりの pg として計算された。*CCND2* の血中メチル化レベルは血清 1ml あたりの相対的なメチル化 DNA 量 (pg) として計算された。

第 3 章 統計分析

組織中のメチル化と *CCND2* の相関関係を検定するのに、Pearson の相関係数を用いた。2 群またはそれ以上の変数間の差を検定するのに、Student's *t* test、Mann-Whitney *U* test、ANOVA tests を用いた。不連続変数をもつ因子間を検定するのに、Fisher の正確検定または χ^2 検定を用いた。Cox の比例ハザードモデルを用いて、DFS の独立因子を多変量解析した。生存曲線は Kaplan-Meier 法で描き、統計的な有意差は log-rank test を使用した。全ての解析は SPSS 11.0J (SPSS, Inc., Chicago, IL) を使用した。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

第4章 結果

DNA microarray 技術を用いて行った以前の研究の結果[9]の再現性を検討するために、新たに HCC 38 症例の *CCND2* mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて測定した。早期肝内再発をおこした HCC 群 (n=6) では、早期肝内再発を起こさなかった HCC 群より有意に *CCND2* mRNA の発現量が少なかった ($P=0.044$ by Student's *t* test; n=32. Table 1)。癌部の *CCND2* mRNA 発現量と他の臨床病理学的因子とは相関関係はなかった (Table 1)。

癌部 6 例と非癌部 6 例について qRT-PCR と QMSP を施行した結果、*CCND2* のメチル化レベルと mRNA の発現量の間には負の相関がある事が分かった ($r=-0.585$, $P=0.046$) (Fig. 1)。原発巣に *CCND2* のメチル化を認めた HCC 4 例のうち 3 例の血清で、メチル化が認められた (data not shown)。HCV 感染 HCC 70 例と HCV 感染非 HCC 36 例の血中メチル化 *CCND2* 遺伝子レベルはそれぞれ、 435 ± 890 pg/血清 1ml と 29 ± 40 pg/血清 1ml (mean \pm SD) であった。すなわち、HCC 患者では HCV 感染非 HCC 患者より有意にメチル化レベルが高いことが分かった ($P=0.0001$ by Mann-Whitney *U* test) (Fig. 2)。これらの結果をふまえて、われわれは、高い転移能力をもった *CCND2* の断片化された DNA が HCC から放出されて血流にのっているのではないかという仮説をたてた。早期肝内再発をおこした HCC 患者はおこさなかった患者に対して血中メチル化 *CCND2* 遺伝子レベルが有意に高かった ($P = 0.0011$ by Mann-Whitney *U* test)。血中メチル化レベルは他の臨床病理学的因子とは相関関係はなかった (Table 2)。

健常者 4 名の血中メチル化 *CCND2* 遺伝子レベルは 27 ± 27 pg/血清 1ml であった (data not shown)。健常者と HCV 感染非 HCC 患者との間で、血中メチル化 *CCND2* 遺伝子レベルの差は認めなかった。HCC 患者と非 HCC 患者を区別するためのカットオフ値を 70pg/血清 1ml (HCV 感染非 HCC 患者の値の mean+1SD) とした。HCC 患者 70 例中 39 例 (55.7%) で血中メチル化 *CCND2* 遺伝子陽性であり、残りの 31 例 (44.3%) が陰性であった (Table 3)。血中メチル化 *CCND2* 遺伝子陽性であった患者は、陰性であった患者に比べ、早期肝内再発が有意に多かった ($P=0.001$; Table 3)。血中メチル化 *CCND2* 遺伝子陰性であった患者には、早期肝内再発を認めなかった。言い換えれば、この血液テストの偽陰性は 0 であった。HCC 患者 70 例のコホート研究では、原発癌の個数 ($P=0.026$) と癌の進行期 ($P=0.051$) もまた早期肝内再発と関係していた (Table 3)。

血中メチル化 *CCND2* 遺伝子陽性患者は、陰性患者より DFS が有意に短かった ($P=0.02$ by log-rank test; Fig. 3A) が、overall survival (OS) には関与しなかった ($P=0.103$; Fig. 3B)。

DFS の独立した危険因子を同定するため、原発巣の個数、腫瘍径、腫瘍分化度、門脈侵襲の有無、進行度、血中メチル化 *CCND2* 遺伝子レベルについて、stepwise collection 法を用いた Cox の比例ハザードモデルで解析した。Cox の比例ハザードモデルの結果、DFS の独立した危険因子は、血中メチル化 *CCND2* 遺伝子レベル (hazard ratio 1.866, 95% CI: 1.106-3.149) と門脈侵襲 (hazard ratio 1.981, 95% CI: 1.049-3.740) の 2 因子が同定された (Table 4)。

第5章 考察

今回の研究で特筆すべきは、血清の epigenetic なマーカー遺伝子である *CCND2* は根治的肝切除後の早期肝内再発と DFS に密接に関係しているということである。腫瘍由来の cell-free DNA (cfDNA) を同定し、測定することができるようになったことは、predictive oncology に新しい手法をもたらした [21-23]。ゲノム全域にわたる情報に基づき、われわれは *CCND2* 遺伝子という一つの遺伝子に着目した。以前の研究で、*CCND2* mRNA の発現は早期肝内再発のリスクが高い症例の HCC 原発巣で低下しており [9, 11]、*CCND2* 遺伝子は高度にメチル化されていた [12, 13]。実際、HCC 部と非 HCC 部で *CCND2* mRNA レベルはメチル化と負の相関があり、プロモーター領域のメチル化のため発現量が低下した可能性を示唆した。われわれは、HCC 患者の血清から *CCND2* 遺伝子のメチル化を定量することができた。

本研究では、HCC の治療と診断において注目すべき前進を報告した [8]。HCC 患者は、根治的肝切除をされた後でさえも、肝内に広がった癌細胞が高率に早期肝内再発として増殖するため、一般的に予後不良である [1, 4-7, 9]。肝内早期再発の予測システムを構築するのに、多くの努力がなされてきた。ハイテクなアレイシステムを利用したゲノム全域にわたる多くの研究 [9, 10, 24, 25] は、HCC 患者における早期肝内再発を正確に予測できる可能性を引き出した。しかしながら、この手法の欠点は DNA アレイシステムが高価であり、得られる情報が不安定で、分子プロファイリングを行うのに組織サンプルが必要であり、術前や日常で早期肝内再発の危険性を予測するうえでの問題となっている。この点

について、われわれが今回報告した血清の epigenetic なマーカー遺伝子である *CCND2* は、早期肝内再発と再発のリスク評価を術前に日常診療の中で行う事ができる。

CCND2 は *cyclin D2* を記号化したもので、細胞周期の調節に関わっている。しかしながら、*CCND2* が癌細胞の細胞周期でどのような機能をもっているのかは、いまだ不明である。*CCND2* のプロモーター領域のメチル化は多くの悪性疾患で見られることが報告されてきており [26-29]、この分子は悪性に形質転化するのに重要な役割を果たしていることを示唆している。*CCND2* の機能を解明し、治療の標的分子とするには更なる研究が必要である。

HCC の再発は、複雑なプロセスを経る。少なくとも、3 種類の術後再発形式があり [5]、残肝での早期または晩期肝内再発と、肺や骨などの遠隔転移としての肝外再発がある。3 種類のうちで最も臨床的に重要なのは早期肝内再発であり、患者の予後に重大な影響を与えている [1, 6, 7]。本研究では、1 年以内の肝内再発を早期肝内再発と定義し、その定義は以前の報告でも使用している [9, 10]。Sakon らの提唱のように [6]、予後を正確に分類するには術後 2 年以内の肝内再発を早期肝内再発とするのが妥当と考えられる。しかしながら、より短い期間での肝内再発があるかないかを予測することは、サンプル間のバイアスをより少なくし、より正確な診断に繋がるのではないかと考えられる。以上の理由により、2 年以内よりも 1 年以内の早期肝内再発を予測することが望ましいのではないかと考えられる。

本研究では、*CCND2* 遺伝子のメチル化レベルを測定するための血清は全て HCV 感染患者から採取したものである。過去の分子プロファイリング研究 [30] で、HBV と HCV では違った発癌経路で HCC が発生することが明らかにされている。また、HBV 関連 HCC と HCV 関連 HCC では術後の臨床経過（例えば予後）が有意に異なることが報告されている [31]。新規予後予測因子を評価するにあたり、肝炎ウイルスのような異なる因子によるバイアスを最小限にすることは重要である。従って、われわれは血清から採取された *CCND2* の過剰なメチル化が HCC の早期肝内再発や転移能力に関係しているかどうかを、HCV のみに感染している患者群にしぼって研究を行った。

血中メチル化 *CCND2* 遺伝子が HCV 関連 HCC の再発や早期肝内再発の確固たる予測因子となりうることを考えると、HCV に関連しない HCC の血清からも調べる研究がさらに必要となる。日常臨床での利用を考慮すると、予測システムを発

展させることで早期肝内再発のリスクを正確に同定することができるようにならない。本研究のように一つの因子だけでは限界がある。われわれは、過去に HCC 組織での 12 のマーカー遺伝子の発現データの組み合わせで早期肝内再発を正確に予測するシステムを作り上げた[9]。それゆえ、今後、HCC の早期肝内再発を高い精度の予測因子の組み合わせを開発するために、多くの血中の epigenetic なマーカー遺伝子を同定することが必要とされる。

謝辞

資金援助：文部科学省（No. 21591749、知的クラスター創成事業）；山口大学ベンチャービジネスラボラトリー；新エネルギー・産業技術総合開発機構（Grant number: 03A02018a）。

参考文献

- [1] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003;362:1907-1917.
- [2] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view. *J. Clin. Gastroenterol* 2002;35:S72-78.
- [3] Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the united states from 1975 to 2005. *J. Clin. Oncol* 2009;27:1485-1491.
- [4] Esnaola NF, Mirza N, Lauwers GY, Ikai I, Regimbeau J, Belghiti J, Yamaoka Y, Curley SA, Ellis LM, Nagorney DM, Vauthey J. Comparison of clinicopathologic characteristics and outcomes after resection in patients with hepatocellular carcinoma treated in the United States, France, and Japan. *Ann Surg.* 2003;238:711–719.
- [5] Iizuka N, Hamamoto Y, Tsunedomi R, Oka M. Translational microarray systems for outcome prediction of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008;99:659-665.
- [6] Sakon M, Umeshita K, Nagano H, Eguchi H, Kishimoto S, Miyamoto A, Ohshima S, Dono K, Nakamori S, Gotoh M, Monden M. Clinical significance of hepatic resection in hepatocellular carcinoma: analysis by disease-free survival curves. *Arch Surg* 2000;135:1456-1459.
- [7] Shimada M, Takenaka K, Gion T, Fujiwara Y, Kajiyama K, Maeda T, Shirabe K, Nishizaki T, Yanaga K, Sugimachi K. Prognosis of recurrent hepatocellular carcinoma: a 10-year surgical experience in Japan. *Gastroenterology* 1996;111:720-726.
- [8] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005;42:1208-1236.
- [9] Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Nishida M, Maeda Y, Mori N, Takao T, Tamesa T, Tangoku A, Tabuchi H, Hamada K, Nakayama H, Ishitsuka H, Miyamoto T, Hirabayashi A, Uchimura S, Hamamoto Y. Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet* 2003;361:923-929.
- [10] Iizuka N, Hamamoto Y, Oka M. Predicting individual outcomes in hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2004;364:1837-1839.
- [11] Matoba K, Iizuka N, Gondo T, Ishihara T, Yamada-Okabe H, Tamesa T, Takemoto

- N, Hashimoto K, Sakamoto K, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y, Oka M. Tumor HLA-DR expression linked to early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 2005;115:231-240.
- [12] Lehmann U, Berg-Ribbe I, Wingen LU, Brakensiek K, Becker T, Klempnauer J, Schlegelberger B, Kreipe H, Flemming P. Distinct methylation patterns of benign and malignant liver tumors revealed by quantitative methylation profiling. *Clin. Cancer Res* 2005;11:3654-3660.
- [13] Moribe T, Iizuka N, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Hamamoto Y, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 2009;125:388-397.
- [14] Wong IHN, Zhang J, Lai PBS, Lau WY, Lo YMD. Quantitative analysis of tumor-derived methylated p16ink4a sequences in plasma, serum, and blood cells of hepatocellular carcinoma patients. *Clin. Cancer Res* 2003;9:1047-1052.
- [15] Zhang Y, Wu H, Shen J, Ahsan H, Tsai WY, Yang H, Wang L, Chen S, Chen C, Santella RM. Predicting hepatocellular carcinoma by detection of aberrant promoter methylation in serum DNA. *Clin. Cancer Res* 2007;13:2378-2384.
- [16] Iizuka N, Sakaida I, Moribe T, Fujita N, Miura T, Stark M, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Elevated levels of circulating cell-free DNA in the blood of patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2006;26:4713-4719.
- [17] Tokuhisa Y, Iizuka N, Sakaida I, Moribe T, Fujita N, Miura T, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Circulating cell-free DNA as a predictive marker for distant metastasis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 2007;97:1399-1403.
- [18] Ikai I, Takayasu K, Omata M, Okita K, Nakanuma Y, Matsuyama Y, Makuuchi M, Kojiro M, Ichida T, Arii S, Yamaoka Y. A modified japan integrated stage score for prognostic assessment in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol* 2006;41:884-892.
- [19] Tsunedomi R, Iizuka N, Tamesa T, Sakamoto K, Hamaguchi T, Somura H, Yamada M, Oka M. Decreased *ID2* promotes metastatic potentials of hepatocellular carcinoma by altering secretion of vascular endothelial growth factor. *Clin. Cancer Res* 2008;14:1025-1031.

- [20] Moribe T, Iizuka N, Miura T, Stark M, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Hamamoto Y, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Identification of novel aberrant methylation of *BASP1* and *SRD5A2* for early diagnosis of hepatocellular carcinoma by genome-wide search. *Int. J. Oncol* 2008;33:949-958.
- [21] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646-650.
- [22] Anker P, Mulcahy H, Qi Chen X, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer and Metastasis Reviews* 1999;18:65-73.
- [23] Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating dna: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat. Rev* 2002;28:255-271.
- [24] Kurokawa Y, Matoba R, Takemasa I, Nagano H, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Sakon M, Ueno N, Oba S, Ishii S, Kato K, Monden M. Molecular-based prediction of early recurrence in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol* 2004;41:284-291.
- [25] Yoshioka S, Takemasa I, Nagano H, Kittaka N, Noda T, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Takeda Y, Umeshita K, Dono K, Matsubara K, Monden M. Molecular prediction of early recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Cancer* 2009;45:881-889.
- [26] Evron E, Umbricht CB, Korz D, Raman V, Loeb DM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Marks J, Sukumar S. Loss of *cyclin D2* expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2001;61:2782-2787.
- [27] Matsubayashi H, Sato N, Fukushima N, Yeo CJ, Walter KM, Brune K, Sahin F, Hruban RH, Goggins M. Methylation of *cyclin D2* is observed frequently in pancreatic cancer but is also an age-related phenomenon in gastrointestinal tissues. *Clin. Cancer Res* 2003;9:1446-1452.
- [28] Virmani A, Rathi A, Heda S, Sugio K, Lewis C, Tonk V, Takahashi T, Roth JA, Minna JD, Euhus DM, Gazdar AF. Aberrant methylation of the *cyclin D2* promoter in primary small cell, non-small cell lung and breast cancers. *Int. J. Cancer* 2003;107:341-345.
- [29] Yu J, Leung WK, Ebert MPA, Leong RWL, Tse PCH, Chan MWY, Bai AHC, To KF, Malfertheiner P, Sung JJY. Absence of *cyclin D2* expression is associated with

- promoter hypermethylation in gastric cancer. *Br. J. Cancer* 2003;88:1560-1565.
- [30] Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Okada T, Takemoto N, Tangoku A, Hamada K, Nakayama H, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y. Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method. *Cancer Res* 2002;62:3939-3944.
- [31] Roayaie S, Haim MB, Emre S, Fishbein TM, Sheiner PA, Miller CM, Schwartz ME. Comparison of surgical outcomes for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B versus hepatitis C: a western experience. *Ann Surg Oncol* 2000; 7:764-770.



Fig 1

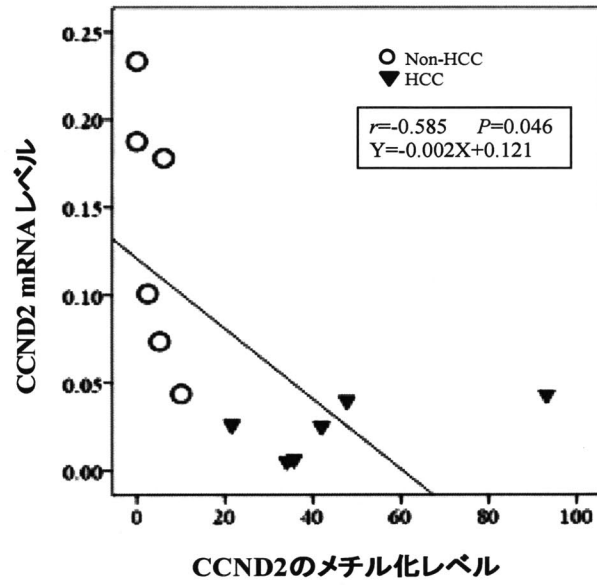


Fig 2

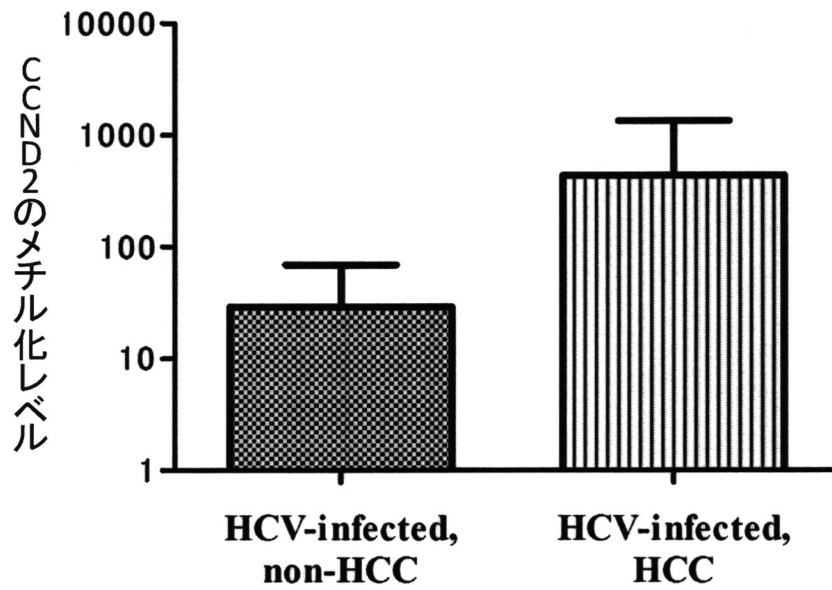
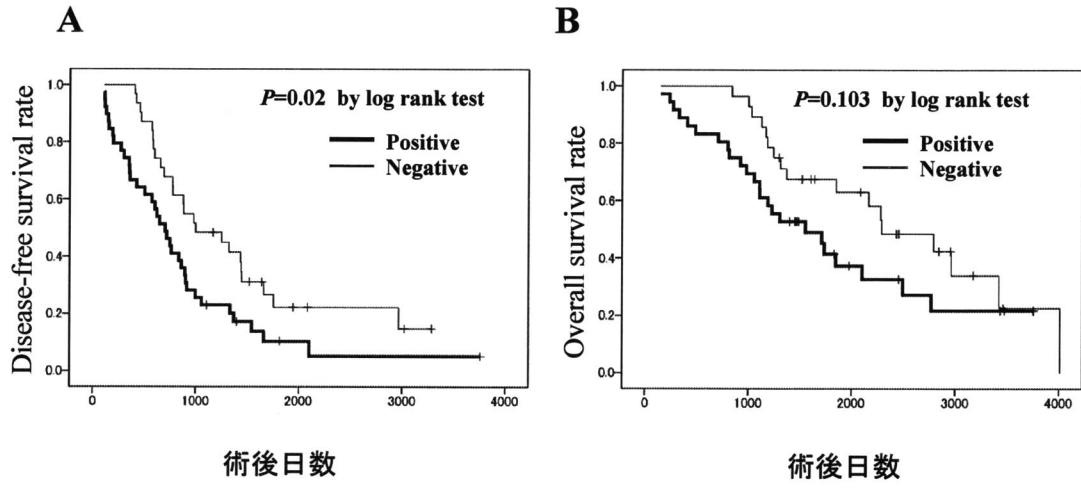


Fig 3



表

Table 1 組織中の *CCND2* mRNAレベルと臨床病理的特徴

	mRNAレベル ^a (mean±SE)	P値
性別		<i>P</i> =0.962 ^b
男 (n=26)	0.028±0.049	
女 (n=12)	0.027±0.049	
年齢 (年)		<i>P</i> =0.383 ^b
≤ 60 (n=9)	0.022±0.003	
> 60 (n=29)	0.029±0.005	
C型肝炎ウイルス抗体		<i>P</i> =0.265 ^b
陰性 (n=13)	0.022±0.003	
陽性 (n=25)	0.030±0.005	
腫瘍径		<i>P</i> =0.379 ^b
≤ 3.0 cm (n=16)	0.031±0.006	
> 3.0 cm (n=22)	0.025±0.004	
分化度		<i>P</i> =0.640 ^c
高分化 (n=13)	0.024±0.004	
中分化 (n=22)	0.028±0.006	
低分化 (n=3)	0.036±0.016	
門脈侵襲		<i>P</i> =0.235 ^b
なし (n=25)	0.031±0.005	
あり (n=13)	0.022±0.004	
進行期		<i>P</i> =0.573 ^c
I (n=14)	0.031±0.005	
II (n=18)	0.023±0.004	
III (n=6)	0.031±0.016	
早期肝内再発		<i>P</i> =0.044 ^b
なし (n=32)	0.031±0.004	
あり (n=6)	0.011±0.003	

^a*GAPDH*に対する *CCND2* mRNAの相対値 ; ^bStudent's t test; ^cANOVA test

Table 2 血中メチル化 CCND2遺伝子レベルと臨床病理的所見

	メチル化 DNAレベル ^a (mean±SE)	平均値 (range)	P値
年齢			<i>P</i> =0.4649 ^b
男 (n=49)	455.5±138.0	102.0 (0.2-5155.0)	
女 (n=21)	388.4±152.8	26.0 (0.2-2561.0)	
年齢 (年)			<i>P</i> =0.2771 ^b
≤ 60 (n=12)	514.9±423.4	13.1 (0.2-5155.0)	
> 60 (n=58)	418.9±96.71	106.5 (0.2-3635.0)	
腫瘍径			<i>P</i> =0.5177 ^b
≤ 3.0 cm (n=33)	206.8±50.41	80.0 (0.2-1064.0)	
> 3.0 cm (n=37)	639.3±191.3	146.0 (0.2-5155.0)	
分化度			<i>P</i> =0.7310 ^c
高分化 (n=13)	323.0±194.0	93.0 (0.2-2595.0)	
中分化 (n=50)	488.5±137.3	145.5 (0.2-5155.0)	
低分化 (n=7)	264.8±224.1	42.0 (0.2-1607.0)	
門脈侵襲			<i>P</i> =0.8576 ^b
なし (n=56)	320.9±75.8	97.5 (0.2-2595.0)	
あり (n=14)	893.4±427.8	102.0 (0.2-5155.0)	
進行期			<i>P</i> =0.496 ^b
I/II (n=39)	320.1±88.86	73.0(0.2-2561)	
III/IV (n=31)	580.4±212.0	146.0 (0.2-5155)	
早期肝内再発			<i>P</i> =0.0011 ^b
なし (n=58)	261.6±64.81	52.0 (0.2-2595.0)	
あり (n=12)	1276.0±481.2	499.0 (73.0-5155.0)	

^a血清1mlあたりのメチル化DNA量 (pg) ; ^bMann-Whitney U test; ^cANOVA test

Table 3 早期肝内再発に関連する因子

	早期肝内再発		P値
	なし (n=58)	あり (n=12)	
性別			<i>P</i> =1.000 ^a
男	40	9	
女	18	3	
肝硬変			<i>P</i> =0.215 ^a
なし	22	7	
あり	36	5	
原発巣個数			<i>P</i> =0.026 ^a
1個	36	3	
複数個	22	9	
腫瘍径			<i>P</i> =0.676 ^b
≤ 3.0 cm	28	5	
> 3.0 cm	30	7	
分化度			<i>P</i> =0.175 ^a
高分化	12	0	
中分化	41	10	
低分化	5	2	
門脈侵襲			<i>P</i> =0.240 ^a
なし	48	8	
あり	10	4	
進行期			<i>P</i> =0.051 ^a
I	10	0	
II	24	5	
III	20	3	
IV	4	4	
CCND2メチル化レベル			<i>P</i> =0.001 ^b
陰性 (≤ 70 pg per 1-ml serum)	31	0	
陽性 (>70 pg per 1-ml serum)	27	12	

^aFisher exact test; ^bChi-square test

Table 4 disease-free survivalの独立因子

	Regression coefficient	Standard error	Risk ratio (95%CI)	P値
<i>CCND2</i>	0.624	0.267	1.866 (1.106-3.149)	0.019
門脈侵襲	0.683	0.324	1.981 (1.049-3.740)	0.035