

# 肝細胞癌の発生・進展に関連する 8 番染色体短腕領域の マイクロサテライト解析

鹿 智 恵 羽 野 寛

東京慈恵会医科大学病理学講座

(受付 平成 21 年 2 月 12 日)

## FREQUENT ALLELIC LOSS AT 8P22-23 RELATED TO CARCINOGENESIS AND SUBSEQUENT PROGRESSION OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Tomoe LU and Hiroshi HANO

*Department of Pathology, The Jikei University School of Medicine*

**Background/Aims:** Loss of 8p is a frequent chromosomal alteration in hepatocellular carcinoma (HCC). We aimed to identify the precise location of putative tumor suppressor genes on 8p21-23 that might be involved in carcinogenesis and the subsequent progression of HCC.

**Methods:** We used 18 microsatellite markers at 8p21-23.2 to compare the frequency of loss of heterozygosity in 60 cases of earlier-stage HCC, 26 cases of advanced HCC, and 86 corresponding non-tumor lesions including 48 lesions of liver cirrhosis, which is usually considered as a precursor form of HCC in a polymerase chain reaction-based analysis.

**Results:** The frequency of loss of heterozygosity at 8p21-23.2 with at least 1 marker was 68% (40 of 59 cases) in earlier-stage HCC and was 69% (16 of 23 cases) in advanced HCC. However, no allelic loss was found in any marker at 8p in any liver cirrhosis lesions. Allelic loss in the 8p22 and 8p23.1 regions was significantly more frequent than the mean frequency in both earlier-stage HCC and advanced HCC ( $P < 0.05$ ). Moreover, allelic loss at markers *D8S262*, *D8S1819*, *D8S1109*, and *D8S261*, located in the same region as 8p22-23.2, also tended to be higher in advanced HCC than in earlier-stage HCC.

**Conclusions:** The deletion of 8p22-23 is not only an important event in the initiation and/or promotion of HCC, but is also closely associated with subsequent progression.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2009; 124: 99-106)

**Key words:** hepatocellular carcinoma, loss of heterozygosity, 8p

### I. 緒 言

近年、原発性肝細胞癌の発症率・死亡率が著増してきた。最近の報告によれば、2000年の年間新規患者数は全世界で56万人を超え、10年前の43万人より30%ほど大幅に増加している<sup>1)2)</sup>。そして、今後も増加傾向が続くことが予測される。種々の疫学調査では、肝細胞癌の80%以上は、日本を

含むアジア、アフリカ地域に集中している。また、B型およびC型肝炎ウイルスによる慢性肝障害は肝細胞癌の発生に関連していることが明らかにされている。東南アジア・アフリカにおいては圧倒的にB型肝炎ウイルス(HBV)起因肝細胞癌が多く、またアフラトキシンなど化学発癌の関与が示唆されている<sup>3)-5)</sup>。日本においては、C型肝炎ウイルス(HCV)の発見以来、ほとんどの肝細胞癌

はC型肝炎ウイルスに起因することが推測されている。また、肝細胞癌は多中心性発癌や肝内転移などによる再発率がきわめて高く、肝細胞癌の大部分は、肝炎ウイルスの感染などによる肝硬変が背景である症例が多く、5年生存率が低い癌の1つとして注目されている<sup>6)7)</sup>。肝細胞癌の5年生存率は、依然として悪性腫瘍の平均よりも低く、40%までに過ぎないのが現状である。

従来は主にウイルス学的アプローチからのウイルス遺伝子の関与による肝細胞癌発癌機構の研究および慢性炎症や線維化のアプローチからの肝細胞癌の発生と進展の分子機構の研究が行われてきた。しかし、いまだ肝細胞癌発生のメカニズムは解明されていない。ヒトゲノムの塩基配列が決定されて以来、肝細胞癌を含む多くの悪性腫瘍について分子レベルで解析が進められてきた。肝細胞癌の発生・進展過程は、他の臓器の癌と同じように癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化など多種類の遺伝子変化が多段階的に関与する複雑な進行過程であると推測されている<sup>8)9)</sup>。その中でも、特に染色体領域の欠失と関連する癌抑制遺伝子の不活化が最も重要な役割を果していると考えられている。

近年、CGH (comparative genomic hybridization) 法やFISH (Fluorescence in situ hybridization) 法など最新の解析法の進歩により全染色体領域を網羅的に検索することが可能になった。そして8p, 13qなど幾つかの染色体領域が高頻度に変化していることが多くの悪性腫瘍において証明された<sup>10)11)</sup>。とくに8番染色体短腕領域は、肝細胞癌を含む多くの悪性腫瘍において最も多く見られる欠損領域として注目され、そこに悪性腫瘍の発生あるいは進展に関連する重要な責任癌抑制遺伝子の存在が想定されている。同時に新規遺伝子の研究の進展の中から、*DLC-1* (deleted in liver cancer-1, 8p22), *DLC-2* (deleted in liver cancer-2, 13q12) を含む幾つかの癌抑制遺伝子が候補遺伝子として発見された<sup>12)13)</sup>。しかし、その後の解析では、肝細胞癌との関連性が明らかにされず、これら既知の遺伝子の他に未知の責任遺伝子がこれらの候補領域に存在していることが示唆されている。一方、腫瘍の発生過程において、何らかの原因で癌抑制遺伝子が欠損した時、その近傍に数

倍の割合で存在するDNA多型マーカーが巻き込まれて同時に失われ、ヘテロ接合性の消失(loss of heterozygosity, LOH) が検出できることが知られている。腫瘍において正常より高頻度にLOHを示すDNA多型マーカーを特定することにより、その近傍に腫瘍の発生に関連する重要な癌抑制遺伝子の存在を突き止めることができ、マイクロサテライト解析法は、未知の癌抑制遺伝子のスクリーニングの方法としてよく使われている。

かつて我々は本学において収集された前立腺癌を検索対象とし、ほぼ全染色体領域について網羅的にマイクロサテライト解析した結果から、癌の発生・進展に最も関連性が高い染色体領域として、8番染色体の短腕, 13番染色体の長腕, 6番染色体の長腕と10番染色体の長腕領域を見出した<sup>14)~16)</sup>。我々は8pを焦点に絞って少数症例の肝細胞癌について詳細にLOH解析を行った結果から、8p21-23にあるマイクロサテライトマーカーの中のわずか30%のDNA多型マーカーが日本人肝癌患者においてヘテロ接合型であることを報告した<sup>17)</sup>。今回は、これら選出されたマーカーを用い、早期段階、進行型原発性肝細胞癌および前癌病変と考えられる肝硬変組織を対象とし、詳細に解析した結果を比較検討することでより正確に肝細胞癌の発生およびその後の進展に関連する責任癌抑制遺伝子の局在を突き止めることを目的とした。

## II. 対象と方法

### 1. 標本の収集, 組織学的分類およびDNA抽出

本学における外科手術により得られた10%緩衝ホルマリン固定・パラフィン包埋した肝細胞癌60症例および病理解剖により得られた遠隔転移を伴う進行型肝細胞癌26症例を検索対象とした。各症例において、未染色パラフィン切片から癌部、肝硬変48病変を含む非癌部病変組織および対応する86症例の正常組織をマイクロダイセクション法により採取した。採取された組織から通常の方法でDNA抽出を行い、マイクロサテライト解析に用いた<sup>17)18)</sup>。本研究を開始するにあたって、本学倫理委員会の承認を得ている。

研究対象となる各症例の組織病理学的・臨床病

理組織学的分類は、WHO の肝臓・肝内胆管腫瘍の組織学分類 (2000 年) および日本肝癌研究会の原発性肝癌取扱い規約に従って行われた。外科手術により得られた 60 症例は、すべて転移巣を伴わない早期段階の肝細胞癌であるのに対して、病理解剖により得られた 26 症例は、すべて遠隔転移を伴う進行型肝細胞癌であった。詳細は Table 1 に示す。

2. マイクロサテライト解析

各症例の癌部、非癌部および対応する正常組織から抽出された DNA 100 ng をテンプレットとし、日本人に有意である 18 の informative marker を用い通常の PCR 法により DNA 増幅を行った<sup>17)</sup>(Table 2)。10 μl の PCR 反応液には、1.5 mM の MgCl<sub>2</sub>; 1 μM プライマー; 200 μM dNTP; 10 μCi [α-<sup>32</sup>P] dCTP (6000 Ci/mmol, Amersham, Biosciences Corp., Piscataway, NJ); 1 U Taq DNA ポリメラーゼ (Wako Pure

Chemical Industries, Ltd., Osaka) と PCR 緩衝液が含まれている。95°C, 30 秒の熱変性, 65 ~50°C, 30 秒のアニーリング; 72°C, 60 秒の伸長反応するように 35 サイクルで DNA を増幅した (Gene Amp PCR System 9600; Takara, Tokyo)。10 μl の PCR 産物に 95% のホルムアミドを 60 μl 加え、95°C 3 分熱変性後、3 μl を取って、6% のホルムアミドポリアクリルアミドゲルにて 40 W の等電圧で 2-3 時間電気泳動を行った。ゲルを乾燥し、Hyperfilm MP (Amersham Biosciences Corp.) と遮光カセットの中にセットし、室温で 2-5 日間と 2-3 週間露光した。

3. 判定と統計学検定

現像したオートラジオグラフィーを観察し、各マーカーにおいて各症例をヘテロ接合型、ホモ接合型および判定不可能にそれぞれ分類した。ヘテロ接合型のサンプルに関して、正常と比較し、癌部あるいは非癌部サンプルにおいて、ImageJ の

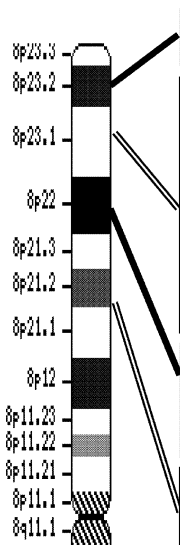
Table 1. Materials used for microsatellite analyses in this study.

Materials	Cases	Sex (M/F)	Age (y)	HBV or HCV (+)	Liver cirrhosis	Sample source
eHCC	60	50/10	31-80	47/60 (78%)	25/60 (42%)	Liver resection
aHCC	26	22/4	35-84	19/26 (74%)	23/26 (88%)	Autopsy

eHCC, earlier-stage hepatocellular carcinoma; aHCC, advanced HCC.

Table 2. Informative microsatellite markers in Japanese were used in this study.

Markers	Genetic map (cM)	PCR product size (bp)	Forward	Reverse
<i>D8S264</i>	0.7	121-145	acatctgcgtcgtcttcata	ccaacacctgagtcagcata
<i>D8S262</i>	4.3	114-128	agctcaaaagcgaagtgat	ggcaacaagaatgagatcctg
<i>D8S1742</i>	not listed	130	ccccaccaagacaca	ctcaaggatgatgaaggcca
<i>D8S277</i>	8.2	121	gatttgcctcatgcagtgt	acatgttatgtttgagaggctcg
<i>D8S1819</i>	10	207	tactgaggactggc	cgtgctgagaatgagacc
<i>D8S503</i>	16.2	136	ggttacgagtttgcctttg	gaaacaaaccaatgtaggagtg
<i>D8S1130</i>	22.4	145	gaagattggctctgttggga	tgtctactgctatagctttcataa
<i>D8S552</i>	26.4	132	cctgtaccatacccctgtatc	aaggttgaatctcagtg
<i>D8S1109</i>	26.4	241	ttctcagaattgctcatagtc	tcagctcctctctgctgat
<i>D8S1754</i>	26.5	169	cagggaaagtctcggtttg	tcagggacacgattcagc
<i>D8S1827</i>	29.5	154	gacagaatcatgtggccttt	tttgtaaaatgtaaaatggcttt
<i>D8S254</i>	not listed	65-75	tgccggacatacattagtga	ttgtaaacaccacaagcagg
<i>D8S261</i>	35.8	128	tgccactgtcttgaaatcc	tatggcccagcaatgtgat
<i>D8S258</i>	40.3	144-154	ctgccaggaatcaactgag	ttgacagggacccacg
<i>D8S298</i>	42.7	155-167	aggcttacaccttgacc	acgcagcacacaacatcat
<i>D8S1752</i>	not listed	140	tcttggatcaggcagaaa	tcagagttgggtgagcga
<i>D8S1734</i>	44.9	114	gctatccactgtcccaga	agcccagaataaacctc
<i>D8S1445</i>	not listed	117-139	gcaacagagcagactccgtc	aagcttacattctgggtgac



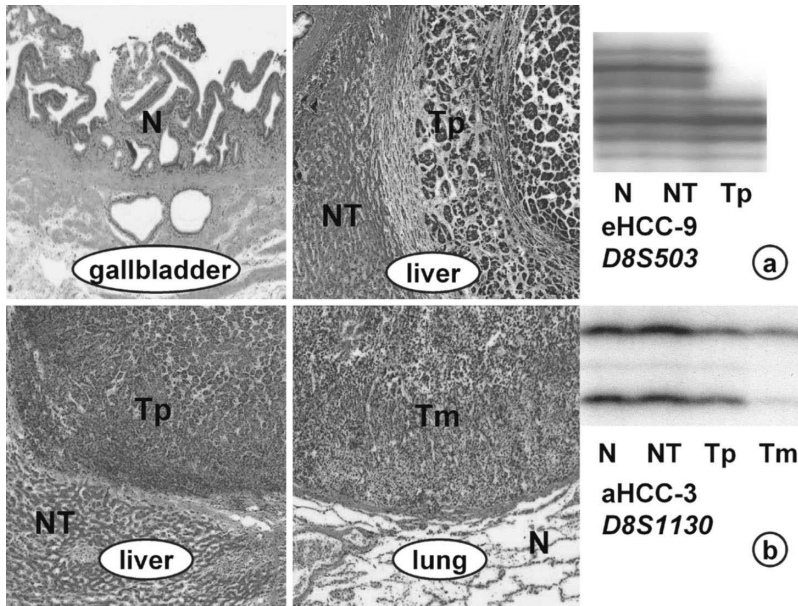


Fig. 1. Representative examples of LOH in two cases of hepatocellular carcinoma (N, normal; NT, non-tumor; Tp, tumor or primary lesion; Tm, tumor of metastatic lesion): a), case 9 showing loss of upper alleles in primary tumor lesion but not in non-tumor lesion of earlier-stage HCC at *D8S503*; b), case 3 showing loss of lower alleles in metastatic tumor lesion but not in its primary tumor lesion and surrounding non-tumor liver tissues at *D8S1130*.

定量判定による1つのアレルでも60%以上のPCR産物が相対的に低下した場合、LOHと判定した。早期段階肝細胞癌症例9 (Fig. 1a)と進行型肝細胞癌症例3 (Fig. 1b)の結果を呈示する。LOH頻度と臨床病理学的因子の相関に関して、Fisher's exact testを用いて有意差の検定を行った。

### III. 結 果

Table 3とFig. 2に示すように、18の多型マーカーのうち少なくとも1つ以上にLOHを認めたのは、ヘテロ接合型早期段階の肝細胞癌59症例中40例で68%の高頻度であった。各々のマーカーにおけるLOH頻度は2~50%で、平均は25.5±16.8%であった。その中8p22領域にある多型マーカー*D8S254*、*D8S258*および8p23.1領域にある*D8S503*、*D8S1130*、*D8S552*、*D8S1754*、*D8S1827*のLOH頻度は42~58%であり、18のマーカーの平均頻度プラス標準偏差の42%よりも高い傾向を示した。その結果8p22と8p23.1領域のLOH頻度は、8pの平均頻度より明らかに高

く、統計学的には有意差が認められた(8p22,  $P=0.0013$ ; 8p23.1,  $P=0.0001$ )。しかし、前癌病変と考えられる肝硬変や慢性肝障害などの非癌部病変組織においては、いずれのマーカーにおいてもAllelic imbalanceが認められなかった。各領域間の比較に関して、8p23.1と8p22領域のLOH頻度は隣接する8p23.2と8p21領域より高い傾向が示唆された。その他、LOH頻度と腫瘍の大きさ、分化度、脈管浸潤の有無など組織病理学および臨床病理学的因子との相関に関して、いずれの項目においても統計学的には明らかな有意差が認められなかった。

一方、進行型肝細胞癌においては、18のマーカーのうち少なくとも1つ以上にLOHを認めたのはヘテロ接合型23症例中16例69%と高頻度であった。各々のマーカーにおけるLOH頻度は0~60%で、平均は28.2±21.1%であった。その中、DNA多型マーカー*D8S261* (8p22)、*D8S1819*、*D8S1109* (8p23.1)および*D8S262* (8p23.2)のLOH頻度は50~54%であり、8pの平均頻度プラス標準偏差の49%よりも高い傾向を示した。これらのマーカーに関する進行型肝細胞

Table 3. Distribution of LOH frequency at 8p21-23.2 in hepatocellular carcinoma cases

	eHCC (%)		aHCC (%)	
<i>D8S264</i>	2/29	7%	2/18	11%
<i>D8S262</i>	2/26	8%	7/13	54%
8p23.2	4/36	11%	8/18	44%
<i>D8S1742</i>	4/31	13%	0/3	0%
<i>D8S277</i>	7/28	25%	1/11	9%
<i>D8S1819</i>	5/24	21%	4/8	50%
<i>D8S503</i>	11/26	42%	3/12	25%
<i>D8S1130</i>	18/42	43%	9/21	43%
<i>D8S552</i>	10/23	43%	1/4	25%
<i>D8S1109</i>	10/31	32%	5/10	50%
<i>D8S1754</i>	14/28	50%	3/7	43%
<i>D8S1827</i>	12/25	48%	2/8	25%
8p23.1	36/58	62% <sup>a</sup>	13/22	59% <sup>c</sup>
<i>D8S254</i>	13/30	43%	2/7	29%
<i>D8S261</i>	3/23	13%	4/8	50%
<i>D8S258</i>	16/30	53%	1/10	10%
<i>D8S298</i>	4/27	15%	0/7	0%
8p22	24/50	48% <sup>b</sup>	7/12	58% <sup>d</sup>
<i>D8S1752</i>	5/37	14%	1/17	6%
<i>D8S1734</i>	4/37	11%	1/18	6%
<i>D8S1445</i>	1/50	2%	1/18	6%
8p21	7/35	13%	2/20	10%
8p21-23.2	40/59	68%	16/23	69%
mean±SD	25.5±16.8%		28.2±21.1%	

eHCC, earlier-stage hepatocellular carcinoma ;  
aHCC, advanced hepatocellular carcinoma  
Significant different from the corresponding  
average, 62% vs. 25%, <sup>a</sup>*P*=0.0001; 48% vs.  
25%, <sup>b</sup>*P*=0.0013; 59% vs. 28%, <sup>c</sup>*P*=0.0063;  
58% vs. 28%, <sup>d</sup>*P*=0.046.

癌と早期段階の肝細胞癌との比較において、進行型肝細胞癌の LOH 頻度は、早期段階の肝細胞癌より高い傾向にあることが示唆された。また、早期段階の肝細胞癌と同様に進行型肝細胞癌においても、とくに 8p22 と 8p23.1 領域の LOH 頻度は 8p の平均頻度より高く、統計学的に有意差が認められた (8p22, *P*=0.046; 8p23.1, *P*=0.0063)。

#### IV. 考 察

これまでに、8 番染色体短腕領域は肝細胞癌を含む多くの悪性腫瘍において最も多く見られる欠損領域であり、そこに腫瘍の発生・進展に関連す

る責任癌抑制遺伝子の存在が推測されている<sup>6)-10)</sup>。かつて、我々は少数の肝細胞癌症例を用い、8p21-23 にある 61 のマイクロサテライトマーカーからわずか 16 の多型マーカーのみが日本人において有意であることを報告した。今回はより正確かつ詳細な情報を得るため、症例数を増やした上で新規癌抑制遺伝子 *DLC-1* の近傍に存在する 2 つの DNA マーカー *D8S1754* と *D8S1827* を加え、新たに早期段階と進行型肝細胞癌の LOH 頻度について比較検討を行った。本研究では、原発性肝細胞癌を検索対象とし、8p21, 8p22, 8p23.1 および 8p23.2 に存在する日本人に有意である 18 のマイクロサテライトマーカーを選出し、60 症例の早期段階の肝細胞癌と 26 症例の進行型肝細胞癌から得られた癌病変、対応する非癌部病変と肝細胞以外の正常細胞について網羅的にマイクロサテライト解析を行い、原発性肝細胞癌の発生およびその後の進展過程に関連する責任癌抑制遺伝子の局在を明らかにすることを試みた。

外科手術により得られた早期段階の肝細胞癌および病理解剖により得られた進行型肝細胞癌症例において、それぞれ 68% と 69% の高頻度で LOH が認められたが、背景となる肝硬変や慢性肝障害を含む非癌部病変においては、いずれのマーカーにおいても染色体領域の欠失が認められなかった。この結果から、8 番染色体短腕領域の欠失が肝細胞癌の発生過程に関連し、そこに重要な責任癌抑制遺伝子の存在が考えられた。この結果は CGH など他の解析方法により得られた結果と一致している<sup>7)-10)(17)(18)</sup>。本研究により行われた詳細な解析により、当該候補遺伝子がより限られた領域 8p22-23.1 に存在している可能性を新たに見出した。Table 3 に示すように、8p22 と 8p23.1 領域の LOH 頻度が隣接する 8p23.2 と 8p21 のそれより高い傾向にある。そして、8p22 と 8p23.1 領域の LOH 頻度とそれぞれの 8p の平均頻度と比較して、どの段階の肝細胞癌においても統計学的には有意差が認められた。この結果から、肝細胞癌の発生に関連する責任癌抑制遺伝子が 8p22-23 領域にある、とくに高頻度に LOH を示した 7 つの DNA 多型マーカー *D8S503*, *D8S1130*, *D8S552*, *D8S1754*, *D8S1827*, *D8S254*, *D8S258* の近傍に存在している可能性が高いことが推測で

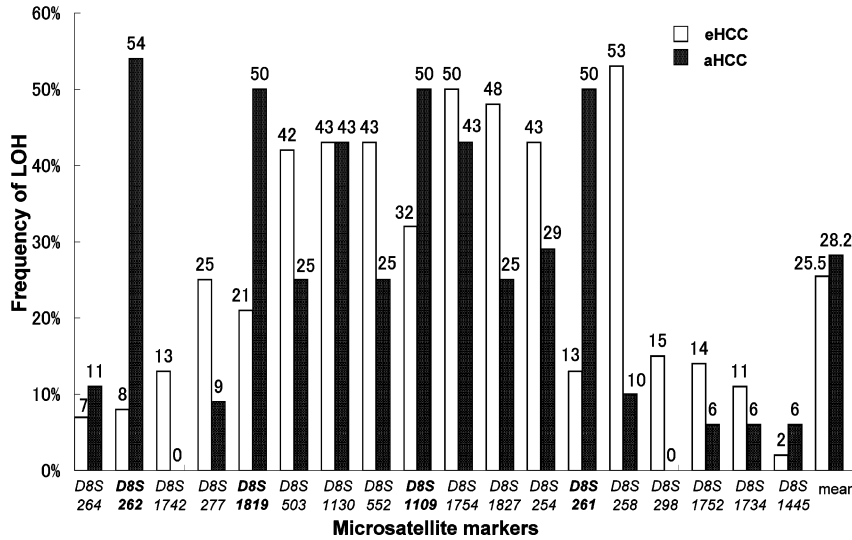


Fig. 2. Representing the frequency of loss of heterozygosity (LOH) at each individual marker on chromosome arm 8p in hepatocellular carcinoma (HCC). A total 60 cases of earlier-stage HCC (eHCC), and 26 cases of advanced HCC (aHCC) was analysed for LOH at 18 informative microsatellite markers in Japanese patients.

きる。

さらに、遠隔転移を伴う進行型肝細胞癌と早期段階の肝細胞癌と比較すると、進行した肝癌細胞において、より高頻度に LOH を認めたのは、8p22-23.2 領域にある別の 4 つの DNA 多型マーカー *D8S262*, *D8S1819*, *D8S1109*, *D8S261* であることが判明した。この結果から、8p22-23 染色体領域の欠失は、肝細胞癌の発生過程だけでなく、遠隔転移を含むその後の進展過程においても重要な役割を果たしていることが考えられる。ところで、早期段階の肝細胞癌では高頻度に LOH を示す 7 つのマーカーに関して、進行型肝細胞癌においてはどのように変化したか比較してみると、2 種類の変化現象が観察される。*D8S1130*, *D8S1754* のように進行型肝細胞癌においても高頻度に LOH が検出された 2 つの DNA マーカーもあれば、*D8S503*, *D8S552*, *D8S1827*, *D8S254* および *D8S258* のように逆に LOH 頻度が大きく低下したマーカーもある。前者は早期段階だけでなく、進行型肝細胞癌の発生においても関連していることが示唆される。後者は早期段階の肝細胞癌の発生において、より重要である可能性が示唆される。加えて進行型肝細胞癌の発生において、前述の 4 つのマーカー *D8S262*, *D8S1819*,

*D8S1109* および *D8S261* の近傍に存在する遺伝子変化は、より重要な役割を果たしていることが考えられる。早期段階から進行型肝細胞癌に進行する過程において、LOH が修復される可能性も考えられるが、このことについては現時点では不明である。我々の解析結果から、日本人原発性肝細胞癌の発生・進展に関連する責任癌抑制遺伝子が候補領域 8p22-23 に存在する DNA 多型マーカーの近傍に存在していることが推測できる。

以上のマイクロサテライト解析の結果に基づき、最も有力な候補癌抑制遺伝子 *DLC-1* (deleted in liver cancer-1, 8p22) を含むいくつかの既知の遺伝子を選出し、一部のサンプルを用い、遺伝子の変異の有無を SSCP (single strand conformation polymorphism) 法により解析を行った。具体的には、8p23.1 領域に存在する *ANGPT2*, *AGPAT5*, *LOC648814*, *DEFB137*, *DEFB136*, *LONRF1*, *FLJ36980* と 8p22 領域に存在する *LTZS1*, *MTUS1* について遺伝子解析を行った。しかし、いずれの遺伝子においても有意の遺伝子変異が認められなかった。以上の既知の遺伝子についての解析結果が、同染色体領域のマイクロサテライト解析の結果と一致していないことから、今回選出された既知の遺伝子は肝細胞癌の発生・

進展に関連する目標遺伝子である可能性が低く、他に未知の責任遺伝子が存在することが考えられる。ただし、遺伝子の構造異常が発生しなくても、何らかの原因ですでに前癌状態あるいは癌発生の早期段階から機能異常が発生している可能性は否定できないので、引き続きこれら候補遺伝子の機能解析を行う必要がある。

## V. 結 語

肝細胞癌の発生およびその後の進展過程に関連する責任癌抑制遺伝子が、8番染色体短腕のより限られた領域-8p22-23に局在することが明らかとなった。我々の解析結果は、最終的に真の責任癌抑制遺伝子を同定することに有力な情報を提供できると考える。

本研究は独立行政法人日本学術振興会平成20年度科学研究助成補助金基盤研究(C) (課題番号20590376)の助成を受けたものである。

## 文 献

- 1) Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127: S5-S16.
- 2) Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet JM. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2004; 5: 215-9.
- 3) El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-76.
- 4) Parikh S, Hyman D. Hepatocellular cancer: a guide for the internist. *Am J Med* 2007; 120: 194-202.
- 5) Seitz HK, Stickel F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biol Chem* 2006; 387: 349-60.
- 6) Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Ito T, Nishimura T, Minata M, et al. Prognostic impact of multiple allelic losses on metastatic recurrence in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Oncology* 2002; 62: 141-8.
- 7) Yeh SH, Chen PJ, Shau WY, Chen YW, Lee PH, Chen JT, et al. Chromosomal allelic imbalance evolving from liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2001; 121: 699-709.
- 8) Maggioni M, Coggi G, Cassani B, Bianchi P, Romagnoli S, Mandelli A, et al. Molecular changes in hepatocellular dysplastic nodules on microdissected liver biopsies. *Hepatology* 2000; 32: 942-6.
- 9) Ng IO, Guan XY, Poon RT, Fan ST, Lee JM. Determination of the molecular relationship between multiple tumour nodules in hepatocellular carcinoma differentiates multicentric origin from intrahepatic metastasis. *J Pathol* 2003; 199: 345-53.
- 10) Kahng YS, Lee YS, Kim BK, Park WS, Lee JY, Kang CS. Loss of heterozygosity of chromosome 8p and 11p in the dysplastic nodule and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 430-6.
- 11) Chen CF, Yeh SH, Chen DS, Chen PJ, Jou YS. Molecular genetic evidence supporting a novel human hepatocellular carcinoma tumor suppressor locus at 13q12.11. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44: 320-8.
- 12) Seng TJ, Low JS, Li H, Cui Y, Goh HK, Wong ML, et al. The major 8p22 tumor suppressor DLC1 is frequently silenced by methylation in both endemic and sporadic nasopharyngeal, esophageal, and cervical carcinomas, and inhibits tumor cell colony formation. *Oncogene* 2007; 26: 934-44.
- 13) Ching YP, Wong CM, Chan SF, Leung TH, Ng DC, Jin DY, et al. Deleted in liver cancer (DLC) 2 encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2003; 278: 10824-30.
- 14) Lu W, Takahashi H, Furusato B, Maekawa S, Ikegami M, Sudo A, et al. Allelotyping analysis at chromosome arm 8p of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, incidental, latent, and clinical prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 509-15.
- 15) Lu W, Takahashi H, Furusato M, Maekawa S, Nakano M, Meng CH, et al. Allelotyping analysis at chromosome 13q of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and clinically insignificant and significant prostate can-

- cers. *Prostate* 2006; 66: 405-12.
- 16) Lu T, Hano H. Deletion at chromosome arms 6q16-22 and 10q22.3-23.1 associated with initiation of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2008; 11: 357-61.
- 17) Lu T, Hano H, Meng CX, Nagatsuma K, Chiba S, Ikegami M. Frequent loss of heterozygosity in two distinct regions, 8p23.1 and 8p22, in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1090-7.
- 18) Lu T, Hano H. Identification of minimal regions of deletion at 8p23.1-22 associated with metastasis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2007; 27: 782-90.