

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19846

研究課題名(和文) 胃癌におけるMAGE-D2遺伝子の包括的機能解析と、新規血清マーカーへの応用

研究課題名(英文) Roles of melanoma-associated antigen D2 in gastric cancer

研究代表者

橋本 良二 (HASHIMOTO, Ryoji)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60747830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 進行胃癌は予後不良な疾患であり、治療の個別化につながる新規分子標的治療薬と鋭敏でかつ病態を反映し得る腫瘍マーカーの開発が望まれている。我々は、MAGE-D2 mRNAが胃癌組織中で高発現している症例は、有意に予後不良であることを見いだした。さらに、遠隔転移を有する胃癌症例において胃癌組織中(免疫組織化学染色法)および血清中(ELISA法)でのMAGE-D2蛋白発現増加を認めることを発見した。高発現胃癌細胞株でsiRNA法を用いたMAGE-D2ノックダウンを行うと、細胞悪性度の低下が見られた。MAGE-D2は胃癌における新たな分子標的および腫瘍マーカーとして有望であると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Sensitive biomarkers are necessary for risk classification of patients with gastric cancer, especially ones at risk of distant metastases. Melanoma-associated antigen (MAGE)-D2 mRNA expression levels were independent of gastric cancer differentiation or subtype. Knockdown of MAGE-D2 resulted in decreased activities of gastric cancer cells. The expression level of MAGE-D2 mRNA was not significantly increased in gastric cancer tissues compared with the corresponding normal adjacent tissues. Increased expression of MAGE-D2 mRNA in gastric cancer tissues was associated with distant metastasis and early recurrence and was an independent prognostic factor. Patients with high preoperative serum MAGE-D2 levels had a more unfavorable prognosis than those with low. MAGE-D2 was associated with metastatic potential of gastric cancer and may represent a promising biomarker, both in gastric tissues and serum samples, for malignant behavior of gastric cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：MAGE-D2 胃癌 血清マーカー

1. 研究開始当初の背景

癌は現代医学が克服すべき大きなテーマであり、がん対策基本法（平成 18 年法律第 98 号）に基づくがん対策推進計画では、総合的ながん対策の実施が盛り込まれている。中でも胃癌は本邦において、2012 年の年間死亡者は 49000 人を越え、全癌死の 13.6% を占める重要な疾患である。この疾患の克服の鍵となるのは、新たな分子標的治療薬と正確な治療方針決定のための鋭敏な腫瘍マーカーの開発である。しかし、古くから胃癌の血清腫瘍マーカーとして汎用されている CEA、CA19-9 は、特異性に乏しく、血行性転移や腹膜播種などの潜在的転移を検出する感度も欠いている。また、現状では胃癌に有効な分子標的治療薬は数少ない。

Melanoma associated antigen (MAGE) 遺伝子は、生殖細胞と腫瘍細胞に特異的に発現し、多様な悪性腫瘍においてその発現、増殖に関与している。近年では MAGE-A1 が悪性黒色腫や肺癌における免疫療法のターゲットとして注目されている。MAGE family 遺伝子は現在までに 60 種以上同定されているが、そのひとつである MAGE-D2 は 1999 年に発見された分子で、その機能についてはいまだよく知られていない。申請者は、この MAGE-D2 遺伝子の消化器系悪性腫瘍における役割に注目し、その過剰発現が肝細胞癌の悪性度に相関していることを発見し、報告した (Hashimoto R, et al. *Oncology Letters*, 2014 in press)。この知見を胃癌に応用して、MAGE-D2 が臨床応用を視野に入れることのできる魅力的な新規胃癌関連分子となりうるかを明らかにすることを旨として本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、進行胃癌の予後向上の鍵となる新規分子標的および血清診断法を開発し、その臨床応用に向けての基盤を作るため、MAGE-D2 遺伝子の胃癌細胞株における発現と機能の解析と、臨床検体（組織、血清）を対象とした発現解析を行った。研究期間内に以下を明らかにすることを目的とした。

- (1) *in vitro* での MAGE-D2 遺伝子の機能解析を行った。MAGE-D2 高発現胃癌細胞株に対して siRNA による MAGE-D2 のノックダウンを行い、増殖、転移、浸潤能に関する MAGE-D2 の役割を明らかにする。
- (2) 胃癌組織中の MAGE-D2 発現の意義を明らかにするため、mRNA レベルの解析に加え、臨床的汎用性を考慮して免疫組織化学染色法による蛋白レベルの発現解析も行った。
- (3) 胃癌患者および非担癌者の血清検体を収集し、ELISA 法にて血清 MAGE-D2 値を測定し、その腫瘍マーカーとしての性能

を検証した。

- (4) 現行の胃癌マーカーとして普及している CEA、CA19-9 の血清値の予後予測能と血清 MAGE-D2 値の予後予測性能を比較した。

これらにより、全く新しい胃癌の分子標的治療薬を提案することを目指した。本研究でこれまで報告のない MAGE-D2 遺伝子の胃癌における機能を明らかにすることにより、現在の医療で重視される個別化治療の手段としての新規分子標的薬の開発につながる知見を得ることが期待された。また、新規の胃癌腫瘍マーカーの提案も目指した。MAGE-D2 は、現在汎用されている腫瘍マーカーである CEA、CA19-9 の欠点を克服する鋭敏な腫瘍マーカーとなる可能性を有することが期待された。

本研究で用いた血清検体は簡便かつ非侵襲的に採取可能であり、胃癌初期診断、再発診断および治療効果判定のためのスクリーニング法の対象として理想的である。検体採取に特殊な手技を必要とせず、広く一般に普及しうる手法であるため、社会への貢献度も大きいと考えられた。

3. 研究の方法

胃癌における新規分子標的および血清診断マーカーの提案を目的として、以下の実験を行った。

<胃癌細胞株を対象とした MAGE-D2 の発現、機能解析>

- (1) 高発現株の選定：
10 種の胃癌細胞株において、定量的 PCR 法で MAGE-D2 mRNA 発現量を調べ、高発現株を選定した。
- (2) siRNA 法による MAGE-D2 のノックダウン実験：
特異的 siRNA を合成し、リポフェクタミン法でトランスフェクションを行い、MAGE-D2 ノックダウンを行った。コントロールとノックダウン株の間で、増殖・浸潤能は Cell Proliferation Assay および Matrigel Invasion Assay、遊走能を Wound healing assay により比較評価した。

<臨床検体での MAGE-D2 発現解析>

- (3) 胃組織中 MAGE-D2 mRNA 発現解析：
倫理委員会の承認を経て、当教室において胃切除術を行った症例から得た胃癌原発巣組織および非癌部組織における MAGE-D2 mRNA 発現量を定量的 PCR 法で調べ、その臨床的意義を検証した。特に、遠隔転移の有無、治癒切除術後再発と MAGE-D2 mRNA 発現量の相関性に着目した。
- (4) 胃組織中 MAGE-D2 蛋白発現：
同様に、当教室において胃切除術を行っ

た症例から得た FFPE 切片を用いて免疫組織化学染色法による MAGE-D2 蛋白発現を調べた。同一症例における mRNA 発現パターンとの関連性について検討した。

(5) 血清中 MAGE-D2 値の測定：

非担癌者および胃癌症例から倫理委員会の指針に則った文書による同意を得た上で、治療前血清検体の採取を行った。血清検体は採取後速やかに処理し、-80 度で保存した。また、検体採取と同時に一般血液検査に加えて CEA および CA19-9 のデータも蓄積した。血清検体を用いて、ELISA 法によって血清中 MAGE-D2 値を定量的に測定し、血清中 MAGE-D2 レベルの臨床的意義、胃癌の腫瘍マーカーとしての有用性を検証した。同一症例の同一時期の血清 CEA、CA19-9 値も同様に解析し、血清 MAGE-D2 値との診断能比較を行った。進行胃癌は、腹膜播種、リンパ行性および血行性転移によって遠隔転移をきたし、不良な予後をたどることが多い。このような症例における血清中 MAGE-D2 レベルに着目した。

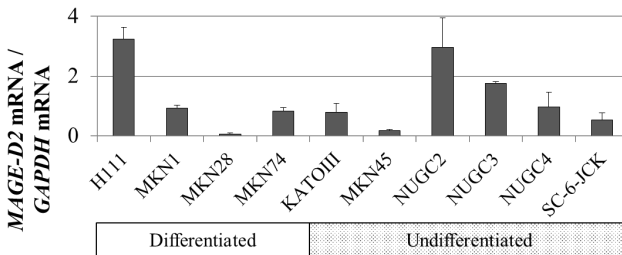
これらの実験により、MAGE-D2 が胃癌の新たな分子標的となりうることを示すと同時に、速やかに臨床応用が可能である血清胃癌診断マーカーとして提案することを本研究のゴールとした。

4. 研究成果

<胃癌細胞株を対象とした MAGE-D2 の発現、機能解析>

(1) 高発現株の選定：

10 種の胃癌細胞株において、MAGE-D2 mRNA 発現量を調べた。MAGE-D2 発現量は分化度に依存しなかった。MKN1 と NUGC2 を高発現株として後の解析に用いた。



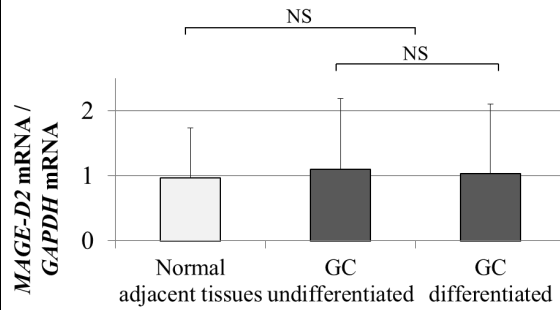
(2) siRNA 法による MAGE-D2 のノックダウン実験：

siRNA により、MAGE-D2 発現が抑制されることを定量的 PCR 法で確認した後、MKN1 および NUGC2 の増殖能、浸潤能、遊走能を評価した。MAGE-D2 のノックダウンにより、細胞の増殖能、遊走能が有意に抑制された。

<臨床検体での MAGE-D2 発現解析>

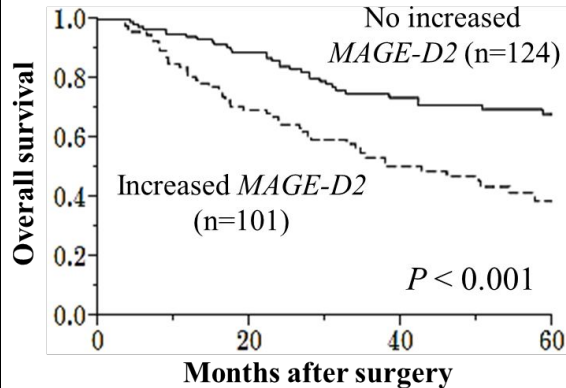
(3) 胃組織中 MAGE-D2 mRNA 発現解析：

225 例を対象とした。MAGE-D2 mRNA 発現量は、非癌部組織、低分化型胃癌組織、分化型胃癌組織の間に有意な差を認めなかった。

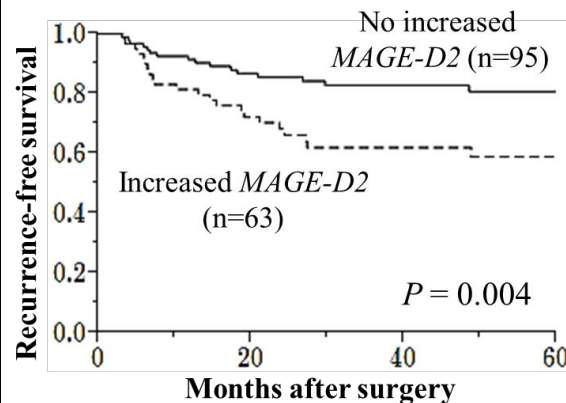


さらに、胃癌の占拠部位別の発現度も調べたが、近位型、遠位型、びまん性胃癌の間に有意な差を認めなかった。

MAGE-D2 発現増加群と非増加群で予後と比較すると、術後全生存期間、無再発生存期間のいずれも、MAGE-D2 発現増加群で不良であった。



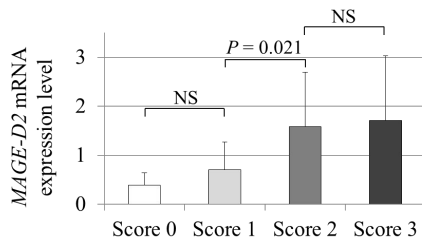
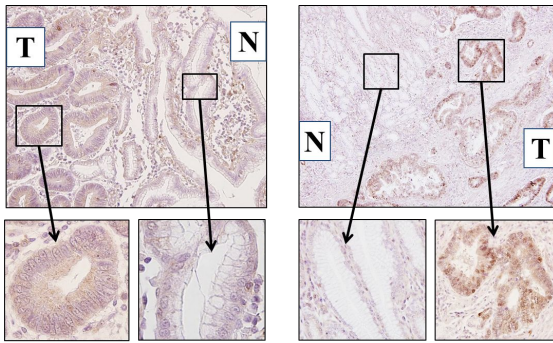
特に MAGE-D2 発現増加は、遠隔転移と有意に相関し、独立した予後不良因子であった。



(4) 胃組織中 MAGE-D2 蛋白発現：

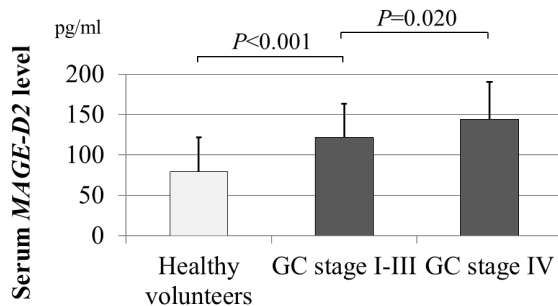
免疫組織化学染色法で MAGE-D2 蛋白発現を調べたところ、遠隔転移を伴う胃癌症例の胃癌組織で上図のごとく MAGE-D2 蛋白の高発現を認めた。また、MAGE-D2 蛋白の染色強度で Score 0-3 の 4 段階に分類すると、それらの胃癌組織中 MAGE-D2 mRNA 発現レベルと正の相関を認めた。このこ

とから、MAGE-D2 発現は免疫組織化学染色法でも判定可能であることが示された。

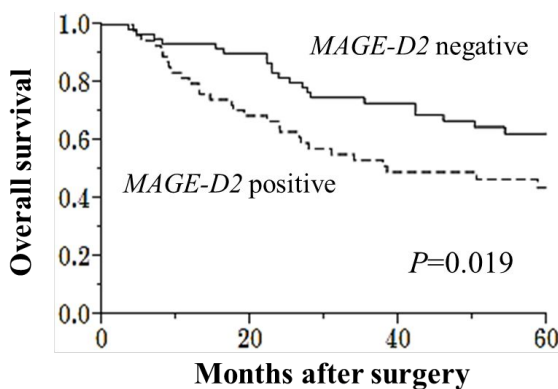


(5) 血清中 MAGE-D2 値の測定：

36 例の非担癌者と、119 例の胃癌患者で血清中 MAGE-D2 値を ELISA 法で測定した。



非担癌者、遠隔転移の無い胃癌患者、遠隔転移のある胃癌患者の順で、有意な血清 MAGE-D2 値の上昇を認めた。



血清 MAGE-D2 陽性患者の予後は、有意に不良であった。同一症例群での CEA、CA19-9 の異常高値の有無では、有意な予後の差を認めなかった。このことから、既存の胃癌血清腫瘍マーカーの予後予測能と比較して、MAGE-D2 は優れた腫瘍マ-

ーカーとなりうることが示唆された。

上記の研究成果により、MAGE-D2 は MAGE-D2 は胃癌における新たな分子標的および腫瘍マーカーとして有望であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Mitsuro Kanda, Shuji Nomoto, Hisaharu Oya, Hideki Takami, Dai Shimizu, Soki Hibino, Ryoji Hashimoto, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Goro Nakayama, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera. The Expression of Melanoma-Associated Antigen D2 Both in Surgically Resected and Serum Samples Serves as Clinically Relevant Biomarker of Gastric Cancer Progression. Annals of Surgical Oncology. 2016 Feb;23 Suppl 2:S214-21. doi: 10.1245/s10434-015-4457-8. 査読有り

[学会発表](計 2 件)

Shinichi Umeda, Mitsuro Kanda, Chie Tanaka, Daisuke Kobayashi, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera (研究協力者: Mitsuro Kanda). The expression of melanoma-associated antigen D2 both in surgically resected and serum samples serves as clinically-relevant biomarker of gastric cancer progression. KINGCA (Korea International Gastric Cancer) WEEK. 2017年3月24日. Busan (Korea)

橋本良二, 神田光郎, 高見秀樹, 清水大, 大屋久晴, 日比野壮貴, 山田豪, 藤井努, 中山吾郎, 杉本博行, 小池聖彦, 野本周嗣, 藤原道隆, 小寺泰弘. 肝細胞癌治療切除後の予後予測バイオマーカーとしての Melanoma-associated antigen-D2 遺伝子の有用性の検討. 第116回日本外科学会定期学術集会. 2016年4月16日. 大阪国際会議場(大阪府大阪市北区)

[図書](計 0 件)

[産業財産権] 出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

橋本 良二 (HASHIMOTO, Ryoji)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：6 0 7 4 7 8 3 0

(2)研究協力者

神田 光郎 (KANDA, Mitsuro)
名古屋大学・医学部附属病院・助教