

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19890

研究課題名(和文) 肝細胞癌におけるSAMS1遺伝子の機能解析と、血清腫瘍マーカーへの応用

研究課題名(英文) Expression and DNA methylation of SAMS1 is associated with the malignant phenotype of hepatocellular carcinoma

研究代表者

江坂 和大 (EZAKA, Kazuhiro)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40772059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌(HCC)の病態を反映し得るバイオマーカー候補としてSAMS1遺伝子に着目した。高度発現抑制株はDNAメチル化を伴っており、発現は脱メチル化処理によって回復した。手術症例肝組織中発現は非癌部組織に比べてHCCで高度に抑制され、病期進行に伴って減少した。組織中発現抑制は独立予後不良因子であり、再発形式が重篤となるものほど強く抑制されていた。免疫染色法で蛋白レベルの発現変化が評価可能であった。これらから、SAMS1はHCCの有望なバイオマーカーとなる可能性が示された。血清SAMS1 DNAメチル化は検出困難であったため、血清診断より肝組織中での解析が重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Identification of sensitive biomarkers for hepatocellular carcinoma (HCC) is required to achieve efficacious personalized therapy. We investigated its expression and methylation status of SAMS1 in HCC. Analysis of HCC cell lines revealed that hypermethylation of the SAMS1 promoter correlated with decreased expression of SAMS1 mRNA and DNA demethylation increased SAMS1 transcription. SAMS1 was expressed at significantly lower levels in tumor tissue compared with the corresponding noncancerous tissues. Patients with extrahepatic recurrence exhibited the lowest levels of SAMS1 expression in resected HCC tissues. The multivariate analysis identified SAMS1 as an independent prognostic factor of HCC progression. The expression pattern of tissue SAMS1 protein correlated with that of SAMS1 mRNA. Circulating DNA methylation of SAMS1 was difficult to be detected in serum samples. Our findings indicate that tissue SAMS1 status represent a novel biomarker of the phenotype of HCC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝細胞癌 DNAメチル化 バイオマーカー SAMS1

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma; HCC) は本邦において、死亡者は年間 30,000 人を越え、全癌死の 10.6% 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、正確な治療方針決定のための鋭敏な腫瘍マーカーと新たな分子標的治療薬の開発である。しかし、現在 HCC の血清腫瘍マーカーとして汎用されている AFP、PIVKA-II は、背景肝の炎症や線維化の度合い、薬物投与などの影響を受けやすい。また、現状では治療薬の幅広い選択肢は得られていない。

SAM domain, SH3 domain, and nuclear localization signals 1 (SAMS1) 遺伝子は、主に造血細胞で発現し B 細胞の活性化や分化に増殖に関与すると報告されている。近年、SAMS1 が肺癌および骨髄腫において癌抑制遺伝子としての役割を有することが報告されたが、HCC を含む消化器系癌での発現および機能については不明であった。研究代表者らは予備実験において、この SAMS1 遺伝子の発現が HCC を含む消化器系悪性腫瘍において、DNA メチル化を介して高頻度に抑制されていることを発見した。研究代表者らはこの SAMS1 の発現および DNA メチル化は臨床応用を視野に入れることのできる非常に魅力的な新規 HCC 関連分子と考えるに至った。

2. 研究の目的

HCC の病勢を鋭敏に反映する新規バイオマーカーを提案するために、以下を本研究の目的とした。

- (1) HCC 細胞株を用いて、SAMS1 発現状態と DNA メチル化の関連性を明らかにする。
- (2) 外科的に切除した肝組織検体を対象に SAMS1 発現を調べ、その臨床的意義を明らかにする。
- (3) 免疫染色法での組織中 SAMS1 蛋白の検出を可能とする。
- (4) HCC における SAMS1 遺伝子の機能解析を行う。
- (5) 予備データから、SAMS1 は HCC において癌抑制遺伝子として働くことが想定される。したがって SAMS1 を血清診断マーカーに応用するアプローチとしては、微量で差の検出しにくい SAMS1 発現量を測定するよりも、SAMS1 DNA メチル化の検出が適している。血清中 SAMS1 の DNA メチル化を検出する。

これにより、全く新しい HCC のバイオマーカー候補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 SAMS1 遺伝子の HCC における役割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バイオマーカー開発につながる

と考えた。SAMS1 は、現在汎用されている腫瘍マーカーである AFP、PIVKA-II の欠点を克服する鋭敏な腫瘍マーカーと期待した。

3. 研究の方法

HCC における SAMS1 の機能およびバイオマーカーとしての有用性を調べるため、以下の実験を行った。

- (1) 細胞株における SAMS1 の発現および調節機序解析

9 種の HCC 細胞株を用いて、定量的 RT-PCR 法により SAMS1 mRNA 発現量を測定した。SAMS1 遺伝子は promoter 領域を狙ってデザインしたメチル化解析用プライマーを用いて各細胞株の SAMS1 DNA メチル化状態を調べた。

- (2) 臨床検体での SAMS1 発現の意義

名古屋大学医学部附属病院で手術を施行した 144 例の HCC 患者から文書による同意を得た後に、切除肝組織を研究用に解析した。定量的 RT-PCR 法により、癌部および非癌部肝組織中の SAMS1 mRNA 発現量を測定し、患者像、背景肝状態、病理所見、再発経過、予後などとの相関性を解析した。

- (3) 組織中 SAMS1 蛋白の検出

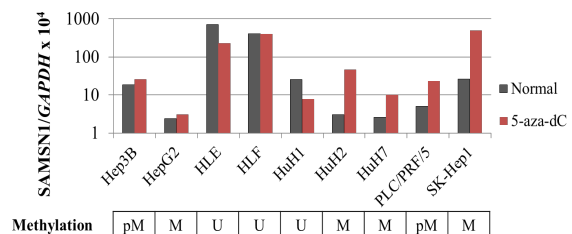
免疫組織化学染色法を用いて、肝組織中の SAMS1 蛋白の検出を試みた。さらに、同一症例における mRNA 発現パターンとの相関性を検討した。

- (4) SAMS1 の機能解析

SAMS1 高発現株である HepG2 および HuH7PLC/PRF/5 を対象として siRNA 法による SAMS1 のノックダウンを行い、それによる細胞株の増殖、遊走、浸潤能の変化を調べた。

- (5) SAMS1 の DNA メチル化をターゲットとした血清診断法の開発

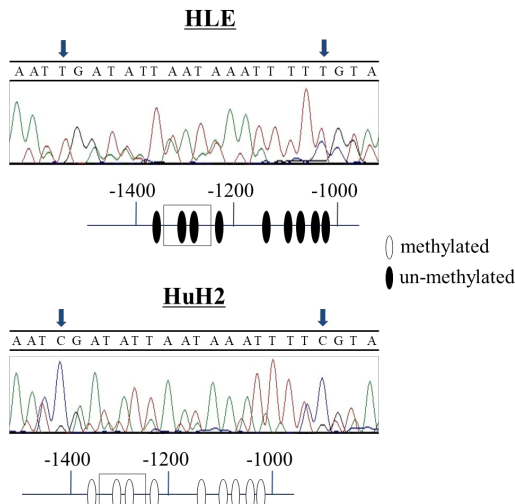
HCC の新規血清腫瘍マーカーを提案すべく、HCC 患者および健常者血清検体における SAMS1 DNA メチル化の検出を行った。



4. 研究成果

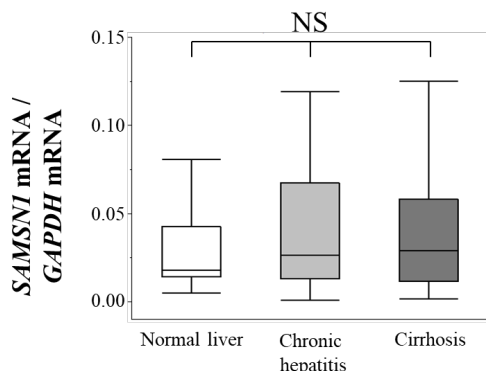
- (1) 細胞株における SAMS1 の発現および調節機序解析

9種のHCC細胞株は、多様なSAMSNI mRNA発現レベルを示した。発現の低い細胞株を中心に、6種の細胞株でSAMSNI DNAメチル化が検出された。HuH2、HuH7、PLC/PRF/5、SK-Hep1では、脱メチル化剤5-aza-dC投与によってSAMSNI発現レベルが上昇した。

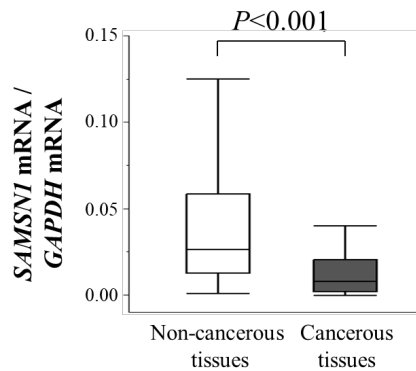


各細胞株におけるDNAメチル化の有無は、上図のごとくbisulfite sequencing法で明瞭に判定しえた。

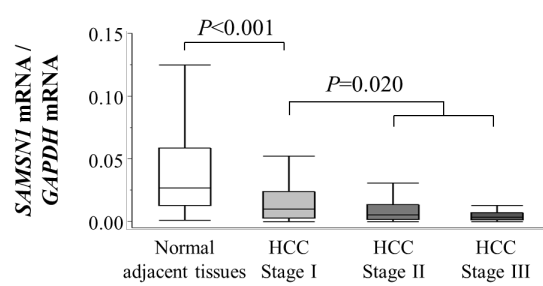
(2) 臨床検体でのSAMSNI発現の意義



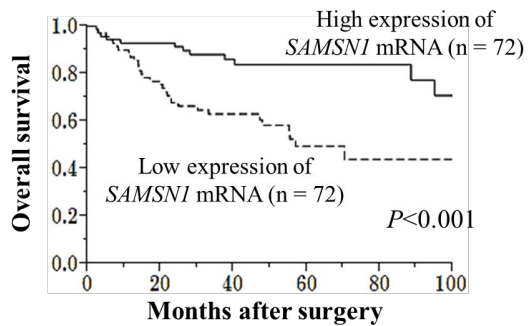
SAMSNI発現レベルは、背景肝の慢性炎症や線維化の度合いに影響を受けていなかった。



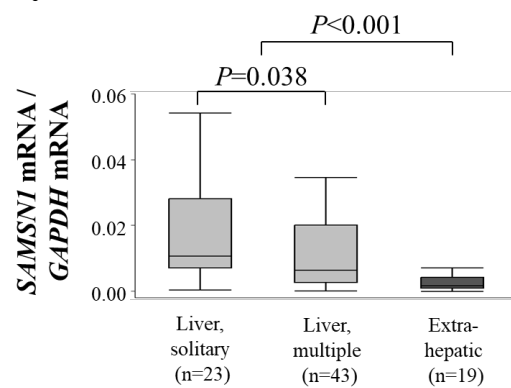
144例のHCC患者において、SAMSNI発現レベルは非癌部より癌部で有意に低下



していた。HCCのStage別にSAMSNI発現レベルを解析すると、病期の進行に伴ってよりSAMSNI発現は高度に抑制されていた。

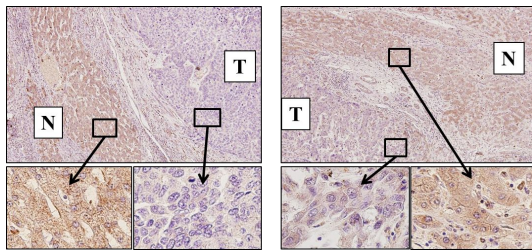


中央値2群に分けて予後解析を行うと、癌部でのSAMSNI発現低値群は、高値群と比較して有意に切除術後の予後不良であった。各種臨床病理学的因子を含めた多変量解析においても、SAMSNI発現低値は、独立した予後不良因子として検出された。その不良な予後の背景にある臨床像を深く検討するため、切除組織中のSAMSNI発現と、切除術後の再発形式について検討を追加した。

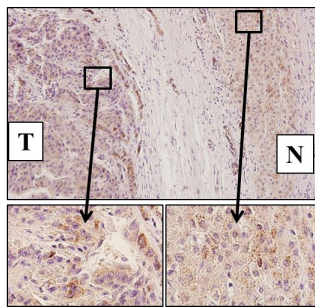


HCC組織中のSAMSNI発現レベルは、肝内単発、肝内多発、遠隔転移とより難治性で重篤な再発をきたした症例ほど有意に低下していた。これらの結果から、組織中のSAMSNI発現度を測定することで、HCCの進行度、切除後の再発形式、切除後の最終的な予後のいずれもが鋭敏に予測可能であることが示された。

(3) 組織中SAMSNI蛋白の検出
免疫組織化学染色法で肝組織中の



SAMS1 蛋白を検出した。
非癌部高発現かつ癌部で発現低下している症例は上図のごとく染色された。



非癌部肝組織、癌部組織ともに SAMS1 蛋白が発現している症例は上図のごとく染色された。この染色パターンと同一症例での SAMS1 mRNA 発現度とは、有意な相関性を示しており、組織中 SAMS1 発現は mRNA レベルでも蛋白レベルでも検出可能であることが示された。

(4) SAMS1 の機能解析

HepG2 および HuH7PLC/PRF/5 に対して SAMS1 特異的 siRNA を用いてノックダウンを行ったが、細胞株の増殖、遊走、浸潤能に有意な変化はみられなかった。このことから、SAMS1 は HCC 進展に直接的に関与しているよりは、進展を反映するバイオマーカーとしての意義を重視すべきであると考えた。

(5) SAMS1 の DNA メチル化をターゲットとした血清診断法の開発

前述のデータからも、SAMS1 発現レベルは HCC が進展するほど低下していることが明らかとなった。したがって、これを血液診断に応用する際には、血中 SAMS1 mRNA や蛋白を標的とした場合、悪性度の高い HCC ほど微量となって測定不能となることと、正常組織由来の SAMS1 mRNA や蛋白の影響を大きく受けて鋭敏な判定の支障となることが想定された。そこで、健康組織には存在せず、HCC で特異的に存在するイベントとして SAMS1 DNA メチル化を標的とすることとした。特異的なプライマーとプローブを設定し、SAMS1 の DNA メチル化状態を定量的メチル化特異的 PCR 法で測定した。細胞株でのメチル化検出は、bisulfite sequencing の結果と一致しており、Assay の正確性は示された。しかし、患者血清を対象として SAMS1 の

DNA メチル化状態を判定したところ、検出された症例はなかった。この結果から、血中への SAMS1 メチル化 DNA の遊離は非常に少量であり、SAMS1 を標的とした HCC 悪性度診断は、組織中の SAMS1 発現度で行うべきであるという結論に至った。

以上の研究成果により、以下のことが明らかとなった。

HCC 細胞株において、SAMS1 高度発現抑制株では SAMS1 の DNA メチル化を伴っていた。

SAMS1 発現は脱メチル化処理によって回復した。

肝組織中 SAMS1 発現は、非癌部組織に比べて HCC で高度に抑制され、病期進行に伴って有意な減少を認めた。

SAMS1 の HCC 組織中発現抑制群は予後不良であり、多変量解析でも独立予後不良因子であった。

HCC 組織中の SAMS1 発現は、のちの再発形式が重篤となるものほど強く抑制されていた。

免疫組織化学染色法によって、蛋白レベルでも、良好に SAMS1 発現変化が評価可能であった。

患者血清からの SAMS1 DNA メチル化は検出困難であった。

これらの結果から、SAMS1 は HCC の発癌および進展に重要な役割を有している可能性と、組織中 SAMS1 発現は、有望なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Mitsuro Kanda, Kenta Murotani, Hiroyuki Sugimoto, Takashi Miwa, Shinichi Umeda, Masaya Suenaga, Masamichi Hayashi, Norifumi Hattori, Chie Tanaka, Daisuke Kobayashi, Suguru Yamada, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera.
An integrated multigene expression panel to predict long-term survival after curative hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma.
Oncotarget 8(41):71070-71079, 2017
(査読有り)
DOI: 10.18632/oncotarget.20369
- (2) Mitsuro Kanda, Dai Shimizu, Satoshi Sueoka, Shuji Nomoto, Hisaharu Oya, Hideki Takami, Kazuhiro Ezaka, Ryoji Hashimoto, Yuri Tanaka, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Goro Nakayama, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera.

Prognostic relevance of SAMS1N1
expression in gastric cancer.
Oncology Letters 2(6):4708-4716, 2016
(査読有り)
DOI: 10.3892/ol.2016.5233

〔学会発表〕(計 1 件)

- (1) 田中晴祥, 神田光郎, 杉本博行, 林 真
路, 高見秀樹, 末永雅也, 岩田直樹, 丹羽
由紀子, 服部憲史, 小林大介, 田中千恵,
山田 豪, 中山吾郎, 小池聖彦, 藤原道隆,
小寺泰弘.
統合多重遺伝子発現パネルによる治癒的
肝切除後の肝細胞癌患者の予後予測.
第28回消化器癌発生学会総会 2017.11.17

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

江坂 和大 (EZAKA, Kazuhiro)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号 : 4 0 7 7 2 0 5 9

(4) 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
研究者番号 : 0 0 6 4 4 6 6 8