

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861066

研究課題名(和文)肝細胞癌におけるMAGE-D4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)Evaluation of MAGE-D4 expression and functions in hepatocellular carcinoma

研究代表者

高見 秀樹 (TAKAMI, Hideki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40723028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌(HCC)の診断・治療標的分子検索のためMAGE-D4の発現・機能解析を行った。HCC細胞株の56%でMAGE-D4発現亢進を認め、ノックダウンにより遊走能・浸潤能抑制がみられた。背景肝群間で発現レベル差を認めなかった。免疫染色法により蛋白発現変化も良好に確認しえた。MAGE-D4のHCC組織中高発現群は予後不良であった。腫瘍部VEGF発現とMAGE-D4発現に相関性が示唆されたが、CD34・HIF-1aとは相関性を認めなかった。HCC群で血清MAGE-D4値の上昇症例を認めたが、AFP・PIVKA-IIと相関関係はなかった。MAGE-D4はHCCの有望な標的分子と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Expression and functions of melanoma-associated antigen family D4 (MAGE-D4) was evaluated to identify novel molecular target of hepatocellular carcinoma (HCC). Five out of nine HCC cell lines, MAGE-D4 was remarkably overexpressed compared to control normal liver tissues. Knockdown of MAGE-D4 mediated by siRNA led to reduced migration and invasion abilities of HCC cells. No difference in the level of MAGE-D4 mRNA was found between three types of background liver (normal liver, chronic hepatitis and cirrhosis). MAGE-D4 protein was detected by immunohistochemical staining. Patients with high MAGE-D4 in HCC tissues had a significantly shorter survival. Expression of intra-tumoral MAGE-D4 had a correlation with VEGF, but not CD34 and HIF-1a. Some patients showed elevated serum MAGE-D4, however there were no correlations with AFP and PIVKA-II levels. MAGE-D4 may be a promising biomarker and therapeutic target of HCC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝細胞癌 MAGE-D4 血清マーカー

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 30000 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、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、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。

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癌、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-D4 は 2001 年に発見された新しい Family で、その機能についてはいまだよく知られていない。我々は、この MAGE-D4 遺伝子の消化器系悪性腫瘍における役割に注目し、本研究を提案した。

我々の教室では、以前より豊富な HCC 切除症例数を活用し、HCC に関する臨床研究および基礎研究を多く行ってきた。マイクロアレイ技術を応用した HCC 関連遺伝子の網羅的な検索や、得られた新規遺伝子の機能解析を多数行い、論文発表している。MAGE-D4 もこうした中で着目した遺伝子であり、豊富な臨床検体と臨床データ、臨床検体を対象とした分子生物学的手法の習熟を土台として遂行された。

2. 研究の目的

MAGE-D4 遺伝子を有望な標的分子候補として、HCC 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ことを目的として本研究を遂行した。

- (1) MAGE-D4 遺伝子の組織中発現とその値臨床的意義を調べた。
- (2) *in vitro* での MAGE-D4 遺伝子の機能解析を行う。MAGE-D4 高発現 HCC 細胞株に対して siRNA による MAGE-D4 のノックダウンを行い、増殖、転移、浸潤能に関する MAGE-D4 の役割を調べた。
- (3) HCC は血流豊富な腫瘍であるため、HCC 切除標本を用いて血管新生マーカーである VEGF, CD34 および HIF-1 の免疫

染色を行い、MAGE-D4 発現パターンとの関連性を調べた。

- (4) ELISA 法によって血清中から検出された MAGE-D4 レベルと、画像所見、臨床経過、病理組織学的所見との対比や病変組織での MAGE-D4 遺伝子変異パターンとの相関を調べることで、その臨床的有用性を検討した。
- (5) 現行の HCC マーカーとして普及している AFP、PIVKA-II の血清レベルと比較した。

本研究の独創的な部分は、やはり全く新しい HCC の分子標的の提案を目指した部分にある。これまで報告のない MAGE-D4 遺伝子の HCC 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分子標的の開発につながる知見を得ることを目的とした。また、新規の HCC 腫瘍マーカーの提案を目指して組織中のみならず血清中の発現量を調べた点もある。血清検体は簡便かつ非侵襲的に採取可能であり、HCC 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。

3. 研究の方法

< MAGE-D4 遺伝子の組織中発現解析 >

HCC 組織中の MAGE-D4 発現を mRNA レベル、蛋白レベルで調べ、臨床病理学的因子との関連性を検討した。

< MAGE-D4 遺伝子の機能解析 >

in vitro 実験; 予備実験より得られた結果から、Hep3B、HepG2 および PLC/PRF/5 の 3 種類の HCC 細胞株を MAGE-D4 高発現細胞株として対象とした。これらに対し、siRNA 法による MAGE-D4 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。

血管新生と MAGE-D4 発現との相関性検討; HCC は血流豊富な腫瘍であるため、HCC 切除標本を用いて血管新生マーカーである VEGF, CD34 および HIF-1 の免疫染色を行い、MAGE-D4 発現パターンとの相関性を解析し、MAGE-D4 の血管新生への関与の可能性を調べた。

< MAGE-D4 の HCC 血清診断マーカーとしての有用性の検証 >

MAGE-D4 が HCC の新規血清腫瘍マーカーとなりうるかを検証すべく、HCC 患者およ

び健常者血清検体における MAGE-D4 の検出を行った。

血清検体の採取；名古屋大学医学部附属病院にて、HCC 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、各治療段階における血清検体を採取した。コントロールとして、健常者ボランティアの血清も 10 例採取した。血清検体は採取後速やかに -80 °C 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 AFP および PIVKA-II のデータも収集した。

ELISA 法による血清中 MAGE-D4 レベルの測定；収集された血清検体を用いて、ELISA 法によって血清中 MAGE-D4 レベルを定量的に測定した。

血清中 MAGE-D4 の診断能の検証および既存の腫瘍マーカーとの比較；血清中 MAGE-D4 レベルの臨床的意義、HCC の腫瘍マーカーとしての有用性を検証した。肝切除症例の術前血清 MAGE-D4 レベルを調べた。同一症例の同一時期の血清 AFP、PIVKA-II 値も同様に解析した。HCC は、初回治療後も多中心性発癌や肝内転移によってしばしば再発し、複数回の治療が行われることが多い。このような症例においては、長期経過における経時的な血清中 MAGE-D4 レベルの変化と HCC の経過を解析し、特に MAGE-D4 が再発を診断するマーカーとなりうるかを調べた。

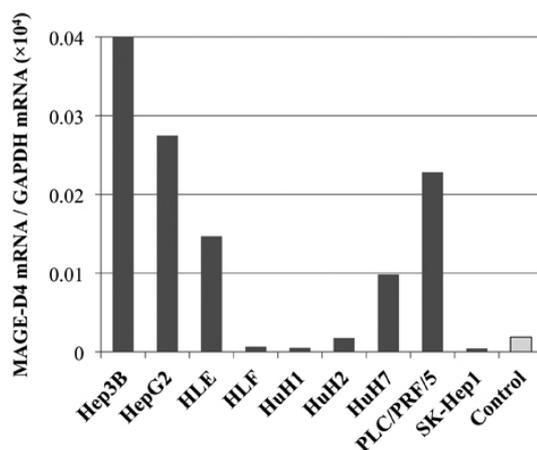
4. 研究成果

HCC の治療の個別化につながる新規分子標的治療薬と、正確な診断および臨床病期決定のための鋭敏でかつ病態を反映し得る腫瘍マーカー開発の基盤となるデータを得ることを目的として本研究を遂行してきた。その発現が固形癌において進展・再発と相関し、優れた予後因子となりうる MAGE-D4 遺伝子に着目し、HCC における統合的発現・機能解析を行った。

HCC 細胞株の定量 PCR では、9 種中 5 種でコントロールの正常肝組織に比して顕著な MAGE-D4 発現亢進認めた。その発現格差が明瞭であることが重要な点である。と同時に機能解析に用いるべき細胞株の選別を行った (図 1)。

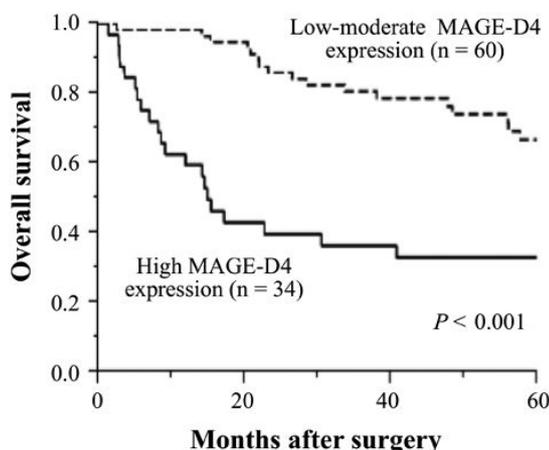
次に、94 例の肝切除症例から得た非癌部組織での、背景肝別に MAGE-D4 発現を調べると、正常肝、慢性肝炎、肝硬変の群間で発現レベルに差を認めなかった。これは、MAGE-D4 の発現増加は非癌組織では起こらず、HCC 発癌段階およびそれ以降の腫瘍進展に特異的な変化であることを示している。

図 1



MAGE-D4 の HCC 組織中高発現群とそれ以外の症例で比較すると、高発現群は有意に予後不良であり、多変量解析でも MAGE-D4 の過剰発現は独立した予後不良因子であった (図 2)。

図 2



さらに、無再発生存期間も有意に短縮していた。これらは、MAGE-D4 発現レベルが、HCC の予後マーカーおよび治療後再発マーカーとなりうることを示している。MAGE-D4 の過剰発現は、病理病学的脈管侵襲に有意に相関していた。

免疫組織化学染色法により、蛋白レベルでも、良好に MAGE-D4 発現変化が確認された。

図 3、図 4 のように、MAGE-D4 発現は、mRNA レベルでも、蛋白レベルでも検出可能であり、いずれもが HCC の新規バイオマーカーとなることが示唆された。

手術検体を用いた評価はもちろんのこと、経皮的肝生検を行うことで、治療前の段階で MAGE-D4 発現を評価することも可能であると考えられ、これを治療法選択の一助とするという発展が期待できる。

図3 癌部 MAGE-D4 蛋白過剰発現症例

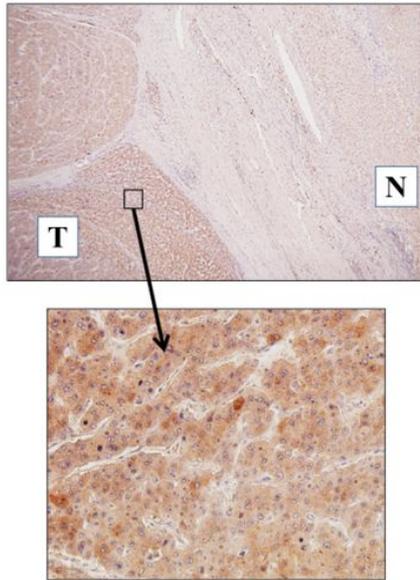
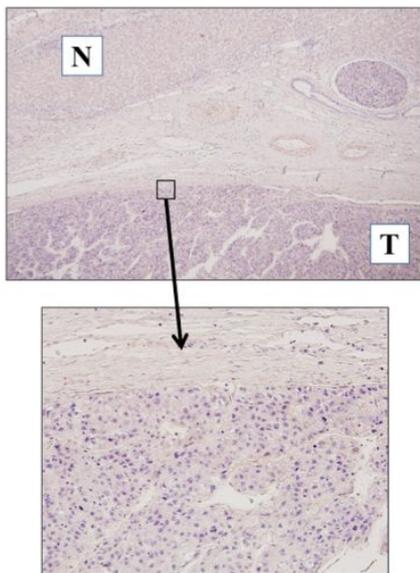


図4 MAGE-D4 蛋白非発現症例



in vitro での MAGE-D4 遺伝子の機能解析では、発現解析で発見した MAGE-D4 高発現肝細胞癌細胞株である Hep3B、HepG2 および PLC/PRF/5 の 3 種類に対し、siRNA 法による MAGE-D4 のノックダウンを行った。コントロール細胞株と比較して、HCC 細胞株の遊走能および浸潤能の抑制がみられた。

一般に、HCC は血流豊富な腫瘍であるため、HCC 切除標本を用いて血管新生マーカーである vascular endothelial growth factor (VEGF)、CD34 および hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (HIF-1) の免疫染色を行い、MAGE-D4 発現パターンとの関連性を調べた。腫瘍部での VEGF 高発現症例で、MAGE-D4 蛋白の高発現の頻度が高い傾向にあったが、CD34 および HIF-1a の染色レベル

とは相関性を認めなかった。8 例の非担癌患者と、HCC 患者から得られた血清中の MAGE-D4 値を ELISA 法によって測定したところ、HCC 患者群にのみ、血清 MAGE-D4 値の上昇している症例を認めた。このことから、MAGE-D4 は、本来は循環血中にはほとんど存在せず、HCC 特異的に上昇するものであることが示唆された。血清中 MAGE-D4 上昇の臨床的意義を明らかとするためには、上昇例の再発形式等についての情報が必要であるが、それにはさらなる予後追跡調査を要する。また、術前血清 AFP 値および PIVKA-II 値との間には、有意な相関関係を認めず、MAGE-D4 は独自の变化を示す、新たな血清腫瘍マーカーとなりうることを示唆された。

これらの結果から、MAGE-D4 は診断・治療の両面から HCC における有望な標的分子である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Kanda M, Nomoto S, Oya H, Takami H, Shimizu D, Hibino S, Hashimoto R, Kobayashi D, Tanaka C, Yamada S, Fujii T, Nakayama G, Sugimoto H, Koike M, Fujiwara M, Kodera Y. 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*. 査読有. 23(Suppl 2):214-221, 2016. doi: 10.1245/s10434-015-4457-8.

Oya H, Kanda M, Koike M, Iwata N, Niwa Y, Shimizu D, Takami H, Sueoka S, Hashimoto R, Ezaka K, Nomoto S, Yamada S, Fujii T, Nakayama G, Sugimoto H, Fujiwara M, Kodera Y. Detection of serum melanoma-associated antigen D4 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Disease of Esophagus*. 査読有. 2015 May 8. [Epub ahead of print] doi: 10.1111/dote.12373.

Oya H, Kanda M, Takami H, Hibino S, Shimizu D, Niwa Y, Koike M, Nomoto S, Yamada S, Nishikawa Y, Asai M, Fujii T, Nakayama G, Sugimoto H, Fujiwara M, Kodera Y. Overexpression of melanoma-associated antigen D4 is an independent prognostic factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Disease of Esophagus*. 査読有. 28(2):188-195, 2015. doi: 10.1111/dote.12156.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高見 秀樹 (TAKAMI, Hideki)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：4 0 7 2 3 0 2 8

(2)研究分担者

なし