

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24592693
研究課題名(和文)肝芽腫における isoform 別 CEACAM1 発現欠失の機序の解明及び臨床的意義

研究課題名(英文)Molecular Analysis of CEACAM Family in Hepatoblastoma

研究代表者
仲谷 健吾 (NAKAYA, KENGO)
新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20625173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要(和文)：肝芽腫は、小児期に発生する原因不明の悪性腫瘍である。本研究では、肝芽腫におけるがん胎児抗原関連細胞接着分子CEACAM (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule)ファミリーを解析した結果、CEACAM6が腫瘍進展に相関する傾向にあることを見いだした。CEACAM6高発現は、病期分類PRETEXT進行例が多かった。またCEACAM6高発現4例中3例が肺転移を合併していたことから、CEACAM6は、肝芽腫の転移能獲得に何らかのメカニズムを介して関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hepatoblastoma is an uncommon malignant liver cancer occurring in infants and children. Currently the survival rate of hepatoblastoma has been better improved, but the prognosis is still poor when the disease is unresectable. In this study, we addressed whether carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM), a type of adhesion molecule involved in cancer progression, has any impact on the prognosis of hepatoblastoma. The results of our immunohistochemical analysis showed that the cases with increased levels of CEACAM6 expression relatively exhibited advanced tumor stage with lung metastasis. Based on these obtained results, CEACAM6 might play a role on cancer metastasis in hepatoblastoma.

研究分野：小児外科学

キーワード：肝芽腫 CEACAM 接着因子

1. 研究開始当初の背景

肝芽腫は、小児期に発生する原因不明の肝悪性腫瘍である。本疾患は早期発見が困難であるため、診断時には既に他臓器転移しているケースが少なくない。最近では化学療法がある程度奏功することが明らかにされており、肝芽腫の患者に対しては、外科的切除前後に積極的に化学療法を行うことが推奨されている。しかしながら本疾患は発生数が稀なため、マス・スタディーを用いた疫学調査は困難であり、患者の予後を正確に予測できる画像・血液マーカーの点ではいまだ不十分であるのが現状である。例えば α -フェトプロテイン(AFP)は特異性の高い腫瘍マーカーであるが、病態反映の感度に関しては正確性に欠ける場合がある。実際、申請者らは、腫瘍を完全に切除した後の化学療法中、腫瘍再発とは異なる理由でAFPが再上昇するケースがあり得ることを報告している(Kubota *et al.*, *J Pediatr Surg* 39(12):1775-1778, 2004)。

ところで近年、様々なシグナル因子のなかでも接着因子は、悪性腫瘍の進展を精度よく予測できるバイオマーカーとして注目されている。がん胎児抗原関連細胞接着分子(CEACAM; carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule)は、細胞増殖・遊走・分化に深く関与している接着因子であり、現在では8つのファミリー因子が知られている。なかでもCEACAM1はがん細胞の増殖に大きく影響することで知られており、既に申請者らは、CEACAM1低発現例の予後が極めて不良であることを見いだしている(5年生存率; CEACAM1低発現群29% vs. 高発現群92%; $P=0.062$) (Tsukada *et al.*, *J Pediatr Surg* 44:8 1522-1528, 2009)。そこで本研究では、肝芽腫におけるCEACAMファミリーをさらに解析することによって、肝芽腫に対する、より精度の高い予後予測マーカーを確立できないか検討することにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝芽腫における接着因子CEACAMファミリーの臨床病理学的意義の可能性を探り、病態・予後を診断し得るバイオマーカーを構築することである。特に本研究では、がん患者の臨床因子との相関が最近注目されているCEACAM6に着目し、当該施設で経験した肝芽腫における発現パターンを解析し、その病態・予後などとの相関を検討することにした。

本研究の最終目標は、得られた研究成果を基にしてCEACAMファミリーの肝芽腫における発現様式を明らかにし、肝芽腫の病態・予後を精度よく診断し得るバイオマーカーを確立することである。

3. 研究の方法

(1) 肝芽腫におけるCEACAM6発現様式の免疫組織学的解析:

当該施設で経験した肝芽腫11例におけるCEACAM1およびCEACAM6発現を、免疫組織学的に解析した。両因子を比較する目的で、本研究では、腫瘍細胞数当たり50%未満の陽性染色の場合は「低発現」、50%以上を「高発現」に群別した。

(2) CEACAM6と臨床因子の相関解析: CEACAM発現レベルと、臨床因子(肝芽腫病期分類PRETEXT: Pre-Treatment Extent of Disease、肺転移)に関連がないか検討した。

(3) CEACAM1/6組み合わせと臨床因子の相関解析:

CEACAM1とCEACAM6の発現パターンを組み合わせた場合に、臨床因子と相関性が認められる傾向にあるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 分子生物学的解析:

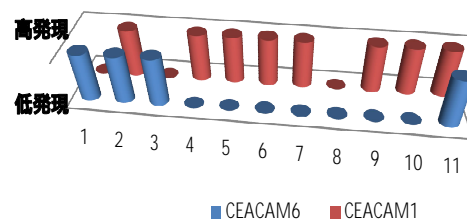
本研究では、腫瘍組織を用いて、CEACAM1やCEACAM6遺伝子のアイソフォーム解析を行ったが、有意な解析結果は得られなかった。しかしながら、免疫組織染色で、下記に述べる結果を得ることができた。

(2) CEACAM1, CEACAM6免疫染色:

肝芽腫11例を検討した結果、CEACAM1低発現は3例・高発現が8例であった。一方、CEACAM6は、低発現7例・高発現4例であった。

興味深い事に、両因子の発現パターンは逆相関の傾向を示し、両因子を共に高発現している症例は、11例中2例のみであり、CEACAM1あるいはCEACAM6どちらかを高発現している症例が9例(81%)と高率に認められた(図1)。

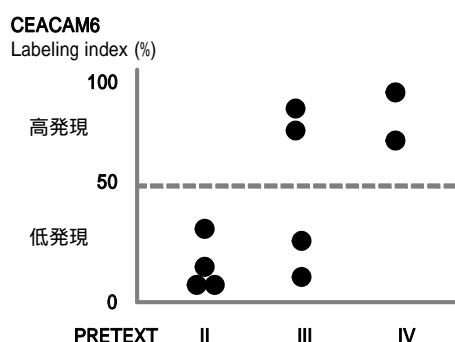
(図1) 肝芽腫例(No.1-11)におけるCEACAM1(赤グラフ)/CEACAM6(青)の相関関係



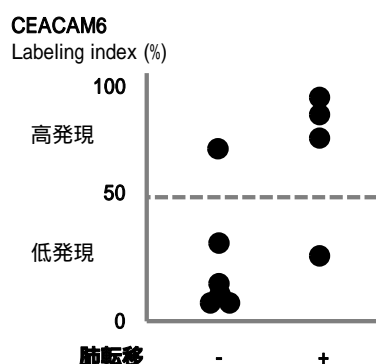
(3) CEACAM6と臨床因子の相関解析:

免疫染色の結果では、CEACAM6発現レベルは、腫瘍進展度と正の相関を示す傾向が認められた。例えば、腫瘍進展度を示すPRETEXT分類別に群分けした場合、PRETEXT II期の症例は全例CEACAM6低発現(4例中4例)であり、III期(4例)は高発現2例・低発現2例であり、さらにIV期(2例)は、前例CEACAM6高発現を示した(図2)。

(図 2) CEACAM6 と肝芽腫病期分類 PRETEXT の相関関係



さらに、CEACAM6 は肺転移と生の相関を示す傾向が認められた。すなわち、術前に肺転移を認めた 4 例中 3 例が、CEACAM6 高発現であった(図 3)。



(4) CEACAM1 と CEACAM6 組み合わせによる臨床因子との相関解析 :

CEACAM1 と CEACAM6 が、肝芽腫において逆相関の傾向にあることを踏まえ、“ CEACAM1 低発現かつ CEACAM6 高発現 ” を示す 2 症例の臨床因子を検討したところ、2 例とも術前肺転移しており、PRETEXT 分類に関しては、III 期 1 例、IV 期 1 例の内訳であった。以上より、両者を組み合わせると、病態進展と強く相関する傾向にあることが示唆された。

(5) 考察および今後の展望 :

肝芽腫は極めて稀な疾患であり、本研究では統計解析が困難だった。本研究の成果により、CEACAM1 と CEACAM6 が明らかに逆相関パターンの発現様式を示したことから、両者の発現メカニズムを追求することによって、本疾患の進展機構の解明に役立つ可能性が考えられる。また、CEACAM ファミリーは臨床マーカーとして有用である可能性も高く、今後は多くの症例で検討することが望まれる。

5 . 主な発表論文

(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 15 件)

1. 仲谷 健吾 (他 19 名; 1 5 番目) 小児の外科的悪性腫瘍、2012 年登録症例の全国集計結果の報告 . 日本小児外科学会雑誌 50(1): 114-150 (2014) 査読有
2. Kubota M, Nakaya K. (他 4 名; 1, 2 番目) The area and attachment abnormalities of the gubernaculum in patients with undescended testes in comparison with those with retractile testes. *Pediatr Surg Int* 30(11): 1149-1154 (2014) 査読有
3. Wakai T, Kubota M. (他 12 名; 3, 4 番目) Hepatitis B virus X stimulates redox signaling through activation of ataxia telangiectasia mutated kinase. *Int J Clin Exp Pathol* 7(5): 2032-2043 (2014) 査読有
4. Wakai T, Kubota M. (他 9 名; 2, 3 番目) Valproic acid overcomes transforming growth factor- β -mediated sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 7(4): 1299-1313 (2014) 査読有
5. Wakai T, Kubota M. (他 8 名; 3, 4 番目) P21-activated kinase-2 is a critical mediator of transforming growth factor- β -induced hepatoma cell migration. *J Gastroenterol Hepatol* 28(6): 1047-1055 (2013) 査読有
6. 仲谷 健吾 (他 18 名; 14 番目) 小児固形悪性腫瘍の予後追跡調査結果の報告 2001 ~ 2005 年登録症例について . 日本小児外科学会雑誌 49(6): 1131-1159 (2013) 査読有
7. 仲谷 健吾 (他 6 名; 1 番目) 乳児期に消化管穿孔で発症し牛乳アレルギーが疑われた 1 例 . 日本小児外科学会雑誌 49 (2): 231-235 (2013) 査読有
8. Kubota M, Wakai T, Nakaya K. (他 3 名; 1, 5, 6 番目) Effects of rapamycin on granulation formation in response to centrally doubled coiled stents as a tracheal substitute. *J Pediatr Surg* 48(12): 2416-2424 (2013) 査読有
9. Ohashi T, Wakai T, Kubota M, Matsuda Y, Arai Y, Ohyama T, Nakaya K, Okuyama N, Sakata J, Shirai Y, Ajioka Y. (他 8 名; 2, 3, 7 番目) Risk of subsequent biliary malignancy in patients undergoing cyst excision for congenital choledochal cysts. *J Gastroenterol Hepatol* 28(2): 243-247 (2013) 査読有
10. Wakai T, Kubota M. (他 4 名; 2, 6 番目) p27 Is a critical prognostic biomarker

- in non-alcoholic
steatohepatitis-related
hepatocellular carcinoma. *Int J Mol
Sci* 14(12): 23499-2515 (2013) 査読有
11. Wakai T, Kubota M. (他 4 名; 2, 3 番目)
Mycotoxins are conventional and novel
risk biomarkers for hepatocellular
carcinoma. *World J Gastroenterol*
19(17): 2587-2590 (2013) 査読有
 12. Wakai T, Kubota M. (他 9 名; 2, 3 番目)
Clinical significance of cell cycle
inhibitors in hepatocellular
carcinoma. *Med Mol Morphol*
46(4):185-192 (2013) 査読有
 13. Wakai T, Kubota M. (他 7 名; 2, 3 番目)
DNA damage sensor -H2AX is
increased in preneoplastic lesions of
hepatocellular carcinoma.
ScientificWorldJournal 2013:597095
(2013) doi: 10.1155/2013/597095. 査
読有
 14. Kubota M, Wakai T, Okuyama N,
Kobayashi K, Sato K, Nakaya K, Arai Y,
Ohyama T. (他 5 名; 1, 2, 6 番目)
Tracheoplasty using a metallic
fusiform centrally-doubled coiled
stent for a major tracheal defect in
rabbits. *J Pediatr Surg* 47(12):
2234-2238 (2012)
 15. Fujimaki S, Matsuda Y, Wakai T, Sanpei
A, Kubota M, Takamura M, Yamagiwa S,
Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y. (他 8 名;
3, 5 番目) Blockade of ataxia
telangiectasia mutated sensitizes
hepatoma cell lines to sorafenib by
interfering with Akt signaling.
Cancer Lett 319(1): 98-108 (2012)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

仲谷 健吾 (NAKAYA, KENGO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号 : 20625173

(2)研究分担者

若井 俊文 (WAKAI, TOSHI FUMI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号 : 50372470

窪田 正幸 (KUBOTA, MASAYUKI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号 : 50205150

(3)連携研究者

なし