

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462090

研究課題名(和文)肝細胞癌における新規バイオバイオマーカーMCM6の解析

研究課題名(英文)Overexpression of MCM 6 in hepatocellular carcinoma and its potential as a prognostic marker.

研究代表者

飯田 通久(IIDA, Michihisa)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50554797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌(HCC)においてバイオマーカーの探索は急務である。我々はマイクロアレイデータからMCM6を抽出し、HCCにおける発現、役割について検討した。

MCM6タンパクおよびmRNA高発現群は門脈浸潤陽性HCCが多く、予後が不良であった。また細胞株でMCM6発現を低下させると、細胞増殖が阻害され、細胞周期G2/M期で停止がみられた。MCM6発現はHCCのバイオマーカーおよび治療ターゲットとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Our pooled DNA microarray data revealed that minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6) was overexpressed in hepatocellular carcinoma (HCC) in association with portal vein invasion (PVI). We performed quantitative RT-PCR and immunohistochemical analyses of HCCs. Our data indicated that both mRNA and protein levels of MCM6 were significantly higher in HCC with PVI than in HCC without PVI. Additionally, HCCs with high MCM6 expression level was associated with shorter overall survival compared to HCCs with low MCM6 expression level ($P < 0.05$). Multivariate analysis revealed MCM6 protein levels were an independent risk factor for overall survival. In vitro study demonstrated that reduction of MCM6 protein expression resulted in G2/M cell cycle arrest and inhibition of proliferation ($P < 0.05$). These data indicate that MCM6 is closely related to the malignant potentials of HCC, raising the possibility of a fascinating candidate for therapeutic target of this disease.

研究分野：消化器外科

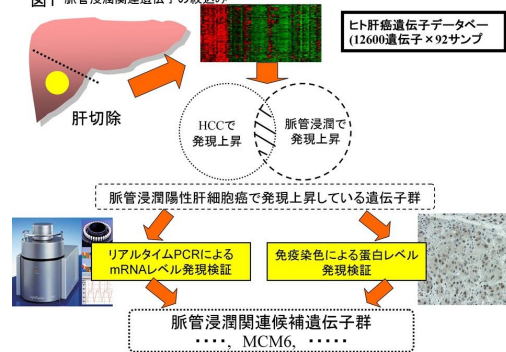
キーワード：肝細胞癌 門脈浸潤 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

HCCは増加中の疾病で、世界で1年間に75万例が新たにHCCを発症し、70万例がHCCで死亡している(Jemal A, CA Cancer J Clin 2011)。日本では毎年2万人がHCCに罹患し、その8割がC型肝炎ウイルス(HCV)感染に起因する発症という我が国特有のHCCの疫学的背景を考慮すると、HCV関連HCCをtargetとした新しい治療の開発が急務である。HCCは肝切除後の再発率の高い予後不良な悪性腫瘍のひとつである。山口大学消化器・腫瘍外科では、21世紀戦略として、ゲノム情報を駆使したトランスレーショナルリサーチを展開してきており、我々独自のアルゴリズムを駆使して、高精度な肝内再発予測システムを確立してきた(LANCET, 2003)。しかし現在までのところ、肝内再発を抑制する治療や肝切除後再発の治療は十分とは言えず、肝切除後の肝内再発に対する新たな治療戦略を確立する必要がある。肝切除後の肝内再発には脈管浸潤が深く関わっており、脈管浸潤は肝切除後の最も重要な予後因子とされている(肝癌診療ガイドライン2009)。すなわち脈管浸潤陽性HCCのターゲット治療は、肝内再発の抑制に大きく貢献できると推察され、HCCの予後を改善させると考えられるが、脈管浸潤の分子生物学的機構は十分には解明されておらず、脈管浸潤陽性HCCに特化した治療戦略に乏しいのが現状である。我々は、今までにゲノム情報を駆使したマイクロアレイ解析により、HCV関連HCCの進展と関連する多くの遺伝子を同定・解明し、世界でもトップレベルのHCC遺伝子データベース(92症例×12600遺伝子Cancer Res 2002, Oncogene, 2003, Cancer Sci 2008)を構築してきた。これらのデータベースから独自のアルゴリズムを用いて癌部で非癌部に対し高発現し、かつ脈管浸潤陽性例で有意に高発現している18遺伝子を抽出した。これらの18遺伝子のうち、過去にHCCとの関連が報告されている5遺伝子を除く13遺伝子について予備

実験として50例のHCC切除標本を用いたリアルタイムPCRによるmRNA発現解析と63例のHCC切除標本を用いた免疫染色による蛋白発現解析を行った。その結果、mRNA、蛋白レベルともに癌部で高発現し、脈管侵襲陽性例で高発現している3つのmoleculeを同定した。そのなかでも肝切除後の予後と関連のあったMinichromosome Maintenance 6 (以下MCM6)に注目した。

図1 脈管浸潤関連遺伝子の絞り込み



MCM複合体はMCM2-MCM7から構成され、DNA複製開始の際にヘリカーゼとして働く。MCM6はその構成蛋白の1つで、近年、脳腫瘍やリンパ腫において発現上昇や予後の関係が報告されたが(Gauchotte G, Am J Surg Pathol 2012)、肝細胞癌における発現は報告されていない。また最近、肺癌でPETにおける18F-FDG取り込みと予後に関連する遺伝子として報告され(Nair VS, Cancer Res 2012)注目されている。

2. 研究の目的

我々はHCV関連肝癌(HCC)における遺伝子の網羅的解析により、世界で初めて脈管浸潤および予後に関連する遺伝子Minichromosome Maintenance 6 (MCM6)を同定した。本研究では、HCCにおけるMCM6の発現解析を行い、脈管浸潤および予後とMCM6発現の関係の検討を行う。

またMCM6選択的なノックダウン等によるMCM6の機能解析を行い、MCM6が悪性度の高い脈管浸潤陽性HCCの新たな治療ターゲットとなりうるか基礎的に検証する。

3. 研究の方法

(1) HCC における蛋白レベルでの RDBP 発現解析

当科で過去に切除した HCV 陽性肝細胞癌のパラフィン包埋標本 114 例を用いて MCM6 蛋白抗体を用いて免疫染色を行う。同一患者の非癌肝組織との MCM6 蛋白発現を比較することで HCC における MCM6 蛋白の発現上昇があるかどうか検討する。また HCC 症例において MCM6 蛋白発現量と脈管侵襲や早期肝内再発、予後などの臨床病理学因子との関連性を検討する。

(2) 肝癌細胞株における MCM6 の機能解析
各種肝癌細胞株で MCM6 ノックダウン株を用いて MTS assay による細胞増殖能評価、マトリゲルによる浸潤能評価、フローサイトメトリーによる細胞周期解析を行い、肝癌細胞株における MCM6 の機能解析を行う。

4. 研究成果

当科で切除された HCC 55 例について RT-PCR 法を用いて癌部と非癌部における MCM6 mRNA の発現量を解析した。また HCC 118 例に対し免疫染色を行い、癌部での MCM6 の発現率から高発現群と低発現群にわけ、2 群における門脈浸潤等の臨床病理学因子と予後について検討した。その結果 MCM6 の mRNA は非癌部に比して癌部で有意に発現上昇しており門脈浸潤陽性 HCC で発現が亢進している傾向であった。また免疫染色では HCC のうち、MCM6 タ

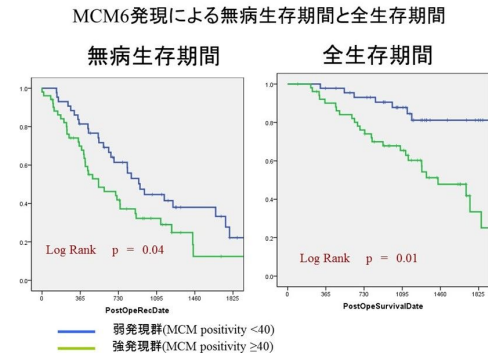
図2

Clinicopathologic factor	MCM6 expression		
	Strong(N= 62) 40%+	Weak(N= 52) 0-40%	
Age	66.8±6.7	69.2±8.1	N.S
Gender			
male	44	36	
female	18	16	
Tumor size			N.S
<3cm	30	25	
≥3cm	32	27	
Degree of differentiation			
Well	6	15	
Moderate	45	33	
Poor	11	4	
Portal vein invasion (PVI)			P<0.01
negative	39	46	
positive	23	6	
Tumor number			P<0.02
solitary	35	42	
multiple	27	10	
Early intrahepatic recurrence			P=0.06
negative	33	32	
positive	16	6	

ンパク高発現群は低発現群に比して門脈浸潤陽性が多く、全生存期間が不良であった。

また MCM6 高発現は多変量解析においても全生存期間における独立危険因子であつ

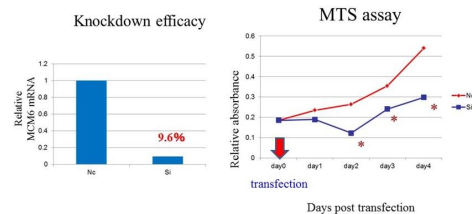
図3



た。HCC の細胞株を用いて機能解析を行った。MCM6 高発現株 HepG2 の siRNA によるノックダウンを行い、細胞増殖の低下を認めた。

図4

MCM6のノックダウンとMTSアッセイ



またノックダウン株の細胞周期解析では G2/M arrest を来していた。

MCM6 ノックダウン株における浸潤能を検討する目的で invasion assay を行ったが、数種類の細胞株ともにノックダウンで浸潤能の低下を証明することは出来なかった。また MCM family である MCM2 を免疫染色にて発現解析したが、HCC 114 例の検討では MCM2 タンパク発現と臨床病理学因子との間には有意差を認めなかった。

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

飯田通久、飯塚徳男、岡正朗、肝細胞がん予後マーカーとしての MCM6 の発現 日本癌学会 2014

飯田通久、飯塚徳男、岡正朗、肝細胞がんにおける MCM6 の発現は予後と関連する
日本癌学会 2013

6 . 研究組織

(1)研究代表者

飯田 通久 (IIDA , Michihisa)
山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 5 0 5 5 4 7 9 7