

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830076

研究課題名(和文) 腫瘍抗原PRAMEに着目した肝細胞癌進展機構の解明とその治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Gene expression analysis of tumor-antigen PRAME in hepatocellular carcinoma and its possible involvement in tumor progression

研究代表者

神吉 けい太 (Kanki, Keita)

岡山理科大学・工学部・准教授

研究者番号：10516876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：PRAMEの発現は癌の悪性度と関連することが知られている。100例の肝細胞癌臨床検体を用いた遺伝子発現解析の結果、癌部でのPRAME陽性例では臨床病期、腫瘍マーカー、再発などと関連し、癌悪性度が高くなっていた。また非癌部での陽性例では手術後の再発率が高く、生存期間が短いことが明らかとなった。PRAMEは高分化型HCCに比べ低分化型でより強く発現していた。以上の結果から、PRAMEの発現は肝細胞癌の悪性度の指標になるほか、再発を予測するマーカーとなりえる可能性が示された。またレチノイン酸シグナルによる肝細胞癌の抗癌剤感受性増強効果について研究を行い、学会発表および学術論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：PRAME (Preferentially expressed antigen in melanoma) is known to be involved in malignancy of various tissues. We performed a gene expression analysis with 100 HCC samples, finding that high PRAME expression in tumor tissue was associated with malignant characteristics such as clinical stage IV, high tumor marker levels, and early recurrence after surgical resection. In non-tumor tissue, PRAME-positive patients showed early recurrence and poor prognosis. Western blot analysis revealed that undifferentiated HCC cells, such as HLE and HLF, showed high level of PRAME expression compared to differentiated HCC cells, PLC/PRF5, HepG2, HuH1, HuH7. Thus, PRAME expression may be a useful marker for a progression and early recurrence of HCC.

We also investigated the molecular mechanism that retinoic acid signaling sensitizes HCC cells to apoptosis induced by sorafenib.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肝細胞癌 レチノイン酸シグナル 悪性化

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(以下 HCC)は、本邦における悪性新生物による死亡率第 4 位(年間約 3 万 5 千人)の癌である。現在、進行肝癌の治療にはソラフェニブによる化学療法が有効であるが、この治療に反応しない難治性肝癌に対しては有効な治療法がないのが現状である。したがって HCC 患者の生存率向上のためには、HCC の進展を制御し、より高い治療効果をもたらす新規標的分子の同定が重要課題である。

PRAME (Preferentially expressed antigen in melanoma) はメラノサイト、脳神経、筋肉、乳腺、肺、血液等の悪性癌において発現上昇が見られ、その機能はレチノイン酸(RA)シグナルの抑制性共役因子(co-repressor)であることが知られている。(Nature 415, 530-6, 2002; Cell 122, 835-47, 2005)。RA シグナルはビタミン A の代謝物であるレチノイン酸とその受容体を介した遺伝子発現機構であり、我々はこれまで RA シグナルが HCC の抑制に重要な役割を果たしていることを報告してきた(Hepatology 40, 366-75, 2004; Gastroenterology 136, 341-350, 2009; Hepatology 56, 1319-30, 2012; Journal of Hepatology 59, 1037-44, 2013)。PRAME の発現は癌の増殖、分化度、転移、生存率低下などの悪性度と関連することが知られ(Clin Cancer Res 10, 4307-13, 2004; Nature 415, 530-6, 2002)。従って PRAME 発現亢進による RA シグナル低下が遺伝子発現パターンを変化させ、癌の悪性化を引き起こしていることが予想される。申請者は PRAME 発現亢進が HCC 悪性化と関わる可能性に着目し PRAME 遺伝子発現をヒト HCC 臨床検体において予備検討したところ、PRAME の発現と生存率低下の有意な相関を見出した。このことは PRAME 発現亢進が HCC の発生・進展に関わるとともに、PRAME の標的遺伝子が新たな HCC 治療の標的分子となりうる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

HCC において PRAME の発現意義を明らかにするとともに、その標的遺伝子群を同定し、その中から HCC の進展制御を可能にする新規治療標的分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

HCC における PRAME の機能解析

HCC 細胞株を用いてアデノウイルスベクターによる PRAME 強制発現、および siRNA 導入によるノックダウンを行い、RARE レポーターベクターを用いたルシフェラーゼアッセイにより RA シグナルに与える影響について解析した。

PRAME 発現の臨床病理学的意義の検討

約 100 例の HCC 臨床検体を用い、PRAME の定量的 PCR による遺伝子発現解析を行った。PRAME 発現と臨床病理学的因子(生存期間、再発、腫瘍マーカー、腫瘍サイズ、浸潤、転移、分化度等)との関連性を統計学的に解析し、腫瘍進展との関わりを検討した。

高分化型および低分化型 HCC 株を用いた PRAME 発現解析

高分化型 HCC 株(PLC/PRF5, HepG2, HuH1, HuH7) 低分化型 HCC 株(HLE, HLF)を用い、ウェスタンブロットにより PRAME 発現レベルを比較した。

4. 研究成果

本研究は腫瘍抗原として知られる PRAME の発現意義と癌悪性化に関わるメカニズムについて研究を行った。これまでに PRAME はレチノイン酸シグナルの抑制性共役因子(co-repressor)であり、癌の悪性化、予後の低下と関連すると報告されている。(Nature 415, 530-536, 2002; Cell 122, 835-847, 2005)。そこで肝癌細胞株を用いて PRAME の機能解析を行った。複数の肝細胞癌株に対し PRAME を強制発現またはノックダウンを行い、レチノイン酸シグナルで転写が活性化する DR5 レポーターベクターで評価したところ、シグナル抑制効果が認められなかった。

肝細胞癌における PRAME の発現意義を詳しく知るために、100 例の肝細胞癌臨床検体(癌部および非癌部)を用いた遺伝子発現解析を行った。癌部での PRAME 陽性例では臨床病期 VI 期、AFP 高値、PIVKA-II 高値、腫瘍多発、TMN 分類の腫瘍因子 T4 症例、短期間での再発例を有意に多く含んでいたことから、陽性例では癌悪性度が高くなっていることが明らかになった。また非癌部での PRAME 陽性例では手術後の再発率が高く、生存期間が短いことが明らかとなった。

複数の肝癌細胞株を用いてウェスタンブロットを行ったところ、PRAME 発現は未分化型肝癌で高く、高分化型肝癌では低いことが分かった。したがって PRAME 発現と癌細胞の分化度との関係が示唆された。

以上の結果から、PRAME の発現は肝細胞癌の悪性度の指標になるほか、再発を予測するマーカーとなりえる可能性が示された。PRAME の具体的な機能についてはいまだ不明だが、肝癌細胞の分化度との関連が示される結果が得られている。これらの結果をまとめて論文を投稿中である。

またレチノイン酸シグナルによる肝細胞癌の抗癌剤感受性増強効果の分子機構について研究を行い、学会発表をおよび学術論文として発表した。

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)

Ishijima N, Kanki K, Shimizu H, Shiota G. Activation of AMP-activated protein kinase by retinoic acid sensitizes hepatocellular carcinoma cells to apoptosis induced by sorafenib. Cancer Sci. 106, 567-75, 2015
doi: 10.1111/cas.12633.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 大山賢治、神吉けい太、清水寛基、村脇義和、汐田剛史 肝細胞がんにおけるレチノイン酸シグナル抑制因子 PRAME 発現の検討 第 50 回日本肝臓学会総会、2014 年 5 月 29-30 日、ホテルニューオータニ (東京都)
2. 神吉けい太、清水寛基、汐田剛史 レチノイン酸応答性遺伝子 FZD4 の機能解析:肝細胞癌進展への影響 第 50 回日本肝臓学会総会、2014 年 5 月 29-30 日、ホテルニューオータニ (東京都)
3. 神吉けい太、石島直樹、汐田剛史 レチノイドによる肝細胞癌の抗癌剤感受性増強効果と AMPK 活性化の影響 第 21 回肝細胞研究会、2014 年 6 月 27-28 日、東京医科歯科大学 (東京都)
4. 神吉けい太、石島直樹、汐田剛史 肝細胞癌に対するレチノイドによる抗癌剤感受性増強効果と細胞内エネルギー代謝への影響 第 2 回がん代謝研究会、2014 年 7 月 10-11 日、東京理科大学葛飾キャンパス (東京都)
5. 神吉けい太、汐田剛史 肝細胞癌におけるレチノイドの抗癌剤感受性増強効果と細胞内エネルギー代謝への影響 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25-27 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
6. 神吉けい太、汐田剛史 肝細胞癌におけるレチノイド応答性遺伝子 Frizzled homologue 4 の機能解析 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25-27 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
7. 神吉けい太、石島直樹、汐田剛史 レチノイドによる肝細胞癌抗癌剤感受性増強効果と細胞内エネルギー代謝への影響 第 25 回日本消化器癌発生学会総会、2014 年 11 月 13-14 日、ホテル日航福岡 (博多市)
8. 神吉けい太 Biological and clinical implications of retinoic acid-responsive genes in human hepatocellular carcinoma cells. 第 27 回肝臓フォーラム (西部)2015 年 2 月 28 日、新大阪ワシントンホテルプラザ (大阪市)
9. 神吉けい太 レチノイドによる癌細胞エネルギー代謝制御による肝細胞癌の抗癌剤感受性増強効果 Liver Forum in Kyoto 第 17 回学術集会 2015 年 3 月 28

日、京都ホテルオークラ (京都市)

10. Shiota G, Shimizu H, Kanki K Suppression of glycolysis by retinoic acid sensitizes hepatocellular carcinoma cells to apoptosis induced by sorafenib via AMPK activation. The AACR Annual Meeting 2015, 2015 年 4 月 18-22 日、Philadelphia, USA
11. 神吉けい太、石島直樹、清水寛基、安積遵哉、坂部友彦、汐田剛史 レチノイン酸による細胞内エネルギー代謝制御によるソラフェニブの肝細胞癌への作用増強機序 第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 21-22 日、ホテル日航熊本 (熊本市)
12. 神吉けい太、汐田剛史 正常細胞に比較して肝細胞癌に選択性の高いレチノイド誘導体のスクリーニング 第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 21-22 日、ホテル日航熊本 (熊本市)
13. 神吉けい太、汐田剛史 肝細胞癌におけるレチノイドの AMPK 活性化を介した抗癌剤感受性増強効果 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8-10 日 名古屋国際会議場 (名古屋市)
14. 神吉けい太、清水寛基、汐田剛史 レチノイン酸による肝細胞癌の AMPK 活性化と抗癌剤感受性増強効果の作用機序の解明 第 26 回日本消化器癌発生学会総会、2015 年 11 月 19-20 日、米子全日空ホテル (米子市)
15. 大山賢治、神吉けい太、清水寛基、汐田剛史 レチノイン酸シグナル抑制因子 PRAME の肝細胞癌での発現意義 第 26 回日本消化器癌発生学会総会、2015 年 11 月 19-20 日、米子全日空ホテル (米子市)

〔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：
出願年月日：
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

https://edb.pub.ous.ac.jp/OUSEducatorDB/ED0002_PersonalPage?code=15006&year=2016

6．研究組織

(1)研究代表者

神吉 けい太 (Kanki Keita)

岡山理科大学 工学部 生命医療工学科
准教授

研究者番号：10516876

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：