

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861486

研究課題名(和文)CEACAM1誘導薬剤による肝芽腫の抗癌剤感受性増強に関する基礎的臨床的研究

研究課題名(英文)CEACAM1-induced drugs enhance chemosensitivity of Hepatoblastoma

研究代表者

三谷 泰之(Mitani, Yasuyuki)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：40612106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的検討においては、CEACAM1の発現は予後良好因子であることが示唆された。基礎的検討においては、肝芽腫細胞株では、CEACAM1の発現を抑制することで抗癌剤(CDDP)の感受性が低下することが判明した。また、肝芽腫細胞株において、all-trans retinoic acid(ATRA)を投与することでCEACAM1発現が誘導され、ATRAとCDDPとを併用することでその効果が増強することが判明した。また、CEACAM1にはlongとshort isoformが存在し、肝芽腫細胞株においてはShort isoformの発現がCDDPに対する感受性増強に関与していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In a clinical study, CEACAM1 expression suggest the benign prognostic factor in hepatoblastoma. Suppression of CEACAM1 expression in hepatoblastoma cell lines reduces the effect of cancer drugs (CDDP). All-trans retinoic acid (ATRA) induces the CEACAM1 expression in hepatoblastoma cell lines, and combination with ATRA and CDDP enhance the effect of CDDP. CEACAM1 short isoform expression in hepatoblastoma cell lines is associated with chemosensitivity.

研究分野：小児外科

キーワード：肝芽腫 CEACAM1 CDDP

### 1. 研究開始当初の背景

肝芽腫治療の原則は腫瘍の外科的完全切除であるが、切除不能例や遠隔転移を有する症例では手術と化学療法を併用して集学的に治療する必要がある。化学療法による局所に対する腫瘍縮小効果と遠隔転移の制御は肝芽腫治療において非常に重要な位置を占めている。

CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) はある。3個または4個の細胞外ドメインと long または short の細胞内ドメインを有する。CEACAM1 は、組織の形態変化、血管新生、細胞増殖、アポトーシス、腫瘍増殖、感染・炎症など様々な反応に関与する(図1)。

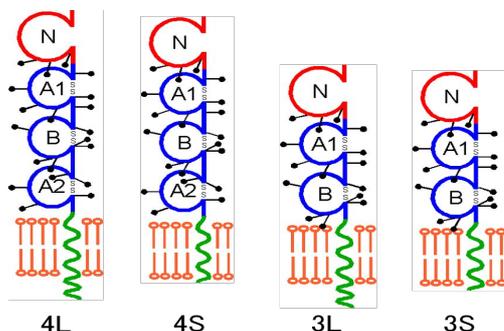


図1

CEACAM1 は、apoptosis の regulator で、腫瘍増殖抑制因子と考えられ、大腸癌、乳癌、前立腺癌、子宮体癌では発現が低下すると報告されてきた。しかしながら、その一方で、皮膚悪性黒色腫や肺腺癌では強発現しており、その発現が強い場合は生存率が下がると報告されている。このように癌の種類により CEACAM1 の発現強度が異なり、その原因や悪性度に関する影響については様々な報告がなされている。我々の教室では CEACAM1 発現のみではなく、その isoform balance の変化が癌の悪性度に関与すると考え、大腸癌の臨床検体を用いて検討を行い、その結果、大腸癌において、CEACAM1 は腫瘍表層部では発現が低下しており先進部にて強発現し、CEACAM1 の発現強度ではなく isoform balance が生存率と関連を認め、CEACAM1-L 優位の発現は、転移や生存に関する予後不良因子であることを証明した。また、肝細胞癌において細胞内ドメイン isoform balance が転移・生存と有意に関連していることを報告した。一方で、肝芽腫において CEACAM1 の発現低下が肺転移と予後に関与することが報告されている。また、CEACAM1 は retinoic acid や interferon により発現が誘導されることが報告されている。本研究によって、基礎的臨床的に肝芽腫の悪性度と CEACAM1 の発現および isoform balance との関連を明らかにし、肺転移などの遠隔転移のある Stage 症例、切

除不能および進行再発症例などの予後不良な肝芽腫治療における新たな治療戦略として retinoic acid や interferon などの CEACAM1 発現薬併用治療が開発できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、肝芽腫の臨床検体における CEACAM1 発現の isoform balance を確認し、CEACAM1 の発現による抗癌剤感受性増強や、CEACAM1 の発現誘導効果をもつ薬剤の併用による抗癌剤の上乗せ効果を検討し、肝芽腫の今後の治療に貢献することを目的としている。

肝芽腫の CEACAM1 の細胞内ドメイン発現について、CEACAM1 細胞内ドメインの発現様式、臨床病理学的特長と CEACAM1 細胞内ドメインの発現との相関について明らかにする。続いて、基礎的研究において、肝芽腫培養細胞 HepG2 および Huh6 について CEACAM1 の発現の増減によって抗癌剤の感受性が変化することを明らかにする。その結果より、CEACAM1 発現誘導作用のある retinoic acid や gamma interferon を併用することによって抗腫瘍効果が変化することを明らかにする。

CEACAM1 の細胞内ドメイン発現と肝芽腫臨床検体の病理学的因子との比較検討、および抗癌剤感受性増強効果の検討および retinoic acid による CEACAM1 誘導抗癌剤感受性増強の検討は本研究がはじめての試みである。臨床検体を用いた検討においては、CEACAM1 の発現が低下したものの予後が不良で、さらに、CEACAM1-S あるいは L の isoform バランスが肝芽腫の予後と関連することが予想される。基礎実験においては、CEACAM1 の発現誘導効果をもつ retinoic acid や interferon を併用することで抗癌剤感受性が増強することが予想される。今回の研究で肝芽腫の転移や予後に対する CEACAM1 の発現のメカニズムが解明されることにより進行再発や転移を有する予後不良肝芽腫患者に対する新たな治療戦略が開発できる。また、retinoic acid や interferon は人への使用経験があり早急に臨床応用できる可能性がある。

### 3. 研究の方法

病理組織学的に確定診断を得られた肝芽腫の手術症例を対象として術前に本試験の目的および内容を説明し同意を得た患者とする。患者の同意には担当医師により試験の実施に際し、試験の内容を患者とその家族に十分に説明し同意を取得する。同意は必ず文書によって取得する。当科において施行された肝芽腫外科切除症例の原発巣と転移巣を対象に、CEACAM1 monoclonal antibody および CEACAM1 細胞内ドメイン特異的抗体である CEACAM1 long antibodies および CEACAM1 short antibodies による免疫染

色を施行し検討する。

肝芽腫の臨床検体において、CEACAM1の細胞内ドメイン発現について、CEACAM1細胞内ドメインの発現様式、臨床病理学的特長とCEACAM1細胞内ドメインの発現との相関について検討する。CEACAM1 isoform balanceの評価に関しては、正常肝組織や血管内皮の染色強度を internal control とし、2種類の抗体をそれぞれ、internal controlと癌組織との染色強度の差で比較する。発現強度に関しては0~4段階に分類する。検体の評価に関しては病理医を含めた3人以上で各プレパラートを検討し、Grade分類をすることとする。CEACAM1 isoform balanceと臨床病理学的因子(年齢、性別、腫瘍マーカー(AFP値)、原発腫瘍の占拠区域、腫瘍の大きさ、抗癌剤による腫瘍縮小率、局所進展度、組織型、脈管侵襲、リンパ節転移、血行性転移・部位、臨床病期(PRETEXT分類、COG分類)、無再発生存率、生存期間)に対して単変量解析および多変量解析を施行する。単変量解析としては $\chi^2$ 乗検定を使用する。多変量解析として multiple regression logistic analysis を施行する。

基礎的研究において、肝芽腫細胞株 HepG2 および Huh6 の CEACAM1 isoform balance を RT-PCR 法および Western blot 法により確認する。すでに予備実験により、肝芽腫培養細胞 HepG2 は CEACAM1-4L と CEACAM1-4S が発現し、Huh6 は CEACAM1 を発現していないことは確認済みである。

その結果を用いて、リポフェクション法により CEACAM1 shRNA により knock down する、あるいは、CEACAM1-L, CEACAM1-S を遺伝子導入し、CEACAM1 isoform balance を変化させる。肝芽腫の予後は抗癌剤での腫瘍制御が大きく関与してることがわかっており、その発現変化が抗癌剤の感受性を変化させるかどうかを検討する。また、CEACAM1 long および short の発現を認めていない肝芽腫培養細胞 Huh6 において、Retinoic acid を投与することによって CEACAM1 発現が誘導されることを確認し、シスプラチンと併用することにより、抗癌剤感受性が増強するかを確認する。また、CEACAM1 short と long をそれぞれ強制発現させることで long あるいは short いずれの isoform が抗癌剤増強に影響を与えるかを検討する。

#### 4. 研究成果

臨床的検討において、肝芽腫手術症例にて、免疫組織学的染色を行い検討した。症例数は少ないものの CEACAM1 の発現は予後良好因子であることが示唆された。

基礎的検討においては、肝芽腫細胞株である HepG2 と Huh6 の CEACAM1 の発現を RNA レベルで確認した。HepG2 が CEACAM1 long と short の両方を発現する

細胞で、Huh6 は CEACAM1 long および short の両方とも発現しない細胞であることが確認できた(図2)。

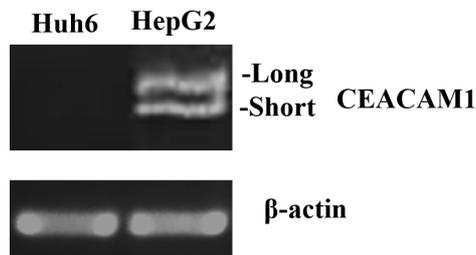


図2

まず、HepG2 においてリポフェクション法で CEACAM1 の発現を強制的に抑制した。HepG2 においては、CEACAM1 の発現を抑制することで肝芽腫治療での key drug である CDDP の感受性が低下することが判明した。(図3)

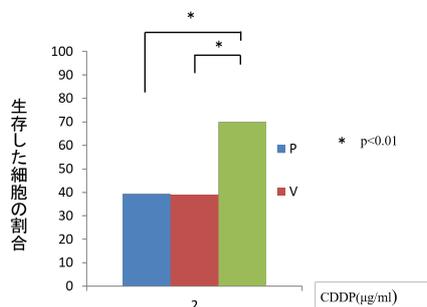


図3

また、CEACAM1 short および long の両方を発現していない肝芽腫細胞株 Huh6 において、all-trans retinoic acid (ATRA) を投与することで CEACAM1 long と short の両方の発現が誘導され、ATRA と CDDP とを併用することでその効果が増強することが判明した(図4、図5)。

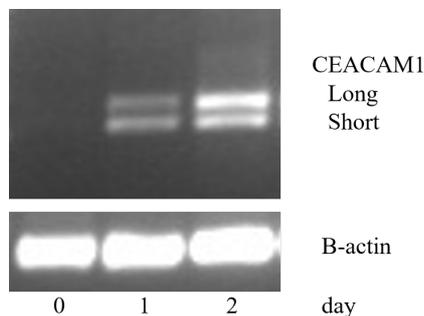


図4

また、CEACAM1 には long と short のどちらが抗癌剤の感受性に関与しているかを検証するために CEACAM1 の long と short の両方を発現していない Huh6 に、リポフェクション法によってそれぞれを強制発現し

た細胞株を作成した。その細胞株を用いて検討したところ、肝芽腫細胞株においては

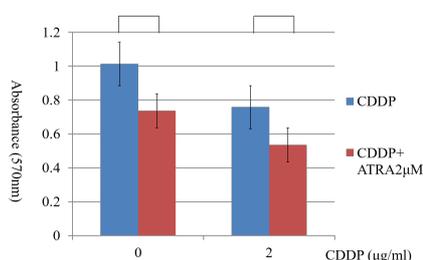


図 5

Short isoform の発現が CDDP に対する感受性増強に関与していることが判明した。

<引用文献>

1. Ieda A, et al: Int J Cancer. 2011
2. Montesano R, et al: J Cell Sci. 2002
3. Gencheva M, et al: BMC Mol Biol. 2010
4. Ozeki M, et al: J Leukoc Biol. 2008
5. Tsukada et al: J Pediatr Surg. 2009
6. Kiriyaama K et al: Ann Surg Oncol. 2014

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0件)

[学会発表](計2件)

1. Mitani Y, Yokoyama S, Kubota A, Takifuji K, Watanabe T, Kiriyaama S, Ieda J, Yamaguchi S, Yamaue H:  
The induction of CEACAM1 restrict cell proliferation in hepatoblastoma cells.  
24<sup>th</sup> Annual International CEA symposium, 2014. 9, Wakayama
2. Kiriyaama S, Yokoyama S, Ueno M, Hayami S, Ieda J, Yamamoto N, Yamaguchi S, Mitani Y, Nakamura Y, Tani M, Lopa Mishra, John E. Shively, Yamaue H:  
CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform is associated with invasion and recurrence of hepatocellular carcinoma.  
24<sup>th</sup> Annual International CEA symposium, 2014. 9, Wakayama

[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]  
特記すべきことなし。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三谷 泰之 (Mitani Yasuyuki)  
和歌山県立医科大学・  
医学部・学内助教  
研究者番号：40612106