

主論文の要旨

**Overexpression of melanoma-associated antigen
D4 is an independent prognostic factor in
squamous cell carcinoma of the esophagus**

〔 食道扁平上皮癌における Melanoma-associated antigen D4
遺伝子発現の臨床的意義の検討 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

大屋 久晴

【緒言】

食道癌の 2008 年の全世界における年間死亡患者数は 406, 000 例にのぼり、癌死因の第 6 位となっている。一般に食道癌は診断時にすでに進行病期であることが多く、5 年生存率は 10%以下と報告されている。そのため、予後の改善につながりうる新規予後予測マーカーおよび治療方略の開発が望まれている。Melanoma-associated antigen (MAGE) family 遺伝子は悪性腫瘍への関連が注目されている遺伝子群である。初めに MAGE-A が、悪性黒色腫細胞株より腫瘍関連抗原として 1994 年に同定された。MAGE-A は悪性腫瘍細胞増殖への強い関与が示されており、悪性黒色腫や肺小細胞癌に対する免疫療法の有望な標的分子として、臨床応用に向けた研究が進んでいる。現在、MAGE family 遺伝子群には約 60 種の遺伝子が属しているが、比較的新しく同定された MAGE-D4 の働きについてはいまだ明らかにされておらず、食道扁平上皮癌を含む消化器系悪性腫瘍への関与についての報告はない。今回我々は、食道扁平上皮癌における MAGE-D4 の発現および、その臨床的意義について検討した。

【対象及び方法】

本研究では、9 種類の食道扁平上皮癌細胞株および術前化学療法非施行の食道扁平上皮癌切除症例 65 例から得た組織を対象に、MAGE-D4 mRNA 発現を定量的 real-time PCR 法にて解析した。各症例での癌部および非癌部における MAGE-D4 mRNA 発現度を比較解析し、全生存期間を含む各種臨床病理学的因子との相関性を検討した。さらに、良好な切片が得られた 30 症例を対象に、免疫組織学的染色法によって組織内の MAGE-D4b (MAGE-D4 の優勢 isoform) 蛋白発現分布を評価した。

【結果】

9 種中 8 種の食道扁平上皮癌細胞株において、非癌部食道組織 (65 例の中央値) と比較して MAGE-D4 mRNA が高発現していた (Figure 1A)。臨床検体では、65 例中 59 例 (91%) で癌部での MAGE-D4 mRNA 発現度が非癌部より高値を示し、癌部の平均 MAGE-D4 mRNA 発現度は、非癌部と比べて有意に高かった ($P < 0.001$; Figure 1B)。癌部での MAGE-D4 mRNA 発現度の四分位解析における第四分位の 17 症例を高発現群と定義し、臨床病理学的因子との相関性を検討した。MAGE-D4 mRNA 高発現群は、非高発現群に比して有意に全生存期間が短縮していた (2 年生存率 44% 対 73%、 $P = 0.006$; Figure 2A)。術後無再発生存期間は MAGE-D4 mRNA 高発現群で、非高発現群に比して短い傾向がみられた (2 年生存率 66% 対 79%、 $P = 0.058$; Figure 2B)。全生存期間に対する単変量解析において、年齢 65 歳以上、リンパ管侵襲、MAGE-D4 mRNA 高発現が有意な予後因子として検出され、これらを対象とした多変量解析では、MAGE-D4 mRNA 高発現は独立予後因子として検出された (ハザード比 2.194、95%信頼区間 1.04-4.49、 $P = 0.039$; Table 1)。また、MAGE-D4 発現度と臨床病理学的因子との相関性解析では、MAGE-D4 mRNA 高発現は、Brinkman 指数 1000 以上 ($P = 0.008$) および術前血清 CEA 5 ng/ml 以上 ($P = 0.002$) と有意な

相関を認めた (Table 2)。代表的な 3 例の MAGE-D4b 免疫組織学的染色法の結果を Figure 3 に示す。症例 A、B は MAGE-D4 mRNA 高発現群症例であり、免疫組織学的染色法において癌部組織でのみ細胞質および細胞膜に MAGE-D4b 蛋白の強発現を認めた。一方で、症例 C は MAGE-D4 mRNA 非高発現症例であるが、癌部・非癌部ともに MAGE-D4b 蛋白発現を認めなかった。これらのごとく、MAGE-D4b 免疫組織化学染色法施行例においては、MAGE-D4b 蛋白と MAGE-D4 mRNA の発現度に相関性が確認された。

【考察】

2001 年に同定された MAGE-D4 は、脳および卵巣以外の正常組織ではほとんど発現がないとされているが、神経膠腫、非小細胞肺癌、乳癌および口腔癌などの悪性腫瘍において、その過剰発現が報告されている。MAGE-D4 は X 染色体短腕 11.22 に存在し、細胞分裂に重要な微小管構成要素である tubulin と分布が類似しており、細胞分裂に重要な役割を持つ可能性が示唆されている。本研究では、これまでに報告のない食道扁平上皮癌における MAGE-D4 の発現とその臨床的意義について検討した。食道扁平上皮癌細胞株および臨床検体の癌部組織において、高頻度に MAGE-D4 mRNA の発現増加が認められた。また、MAGE-D4 mRNA 高発現症例は有意に予後不良であり、全生存期間に対する多変量解析において MAGE-D4 mRNA 高発現は、全生存期間に対する独立予後不良因子であった。これらの結果から、食道扁平上皮癌において MAGE-D4 は悪性度に相関しており、癌細胞に促進的に作用する癌遺伝子として働いていることが示唆された。癌部における MAGE-D4 mRNA 高発現は、術前血清 CEA 値および Brinkman 指数高値と有意な相関を示した。MAGE-A1、-A3、および -B2 は非小細胞肺癌において、プロモーターの低メチル化を介した発現異常に喫煙が関与しているとの報告がある。本研究の結果からは、喫煙が MAGE-D4 発現異常の誘引の 1 つとなる可能性が示されたが、その機序は明らかではなく、さらなる検討が必要である。

MAGE-D4 遺伝子には、MAGE-D4-a、b、c の 3 つの isoform がある。MAGE-D4 は乳癌と口腔癌で、腫瘍細胞の増殖および浸潤に関与することが報告されており、これらの癌腫では MAGE-D4b が優勢な isoform であることが示されている。少数症例での検討ではあるが、定量的 real-time PCR 法での癌部 MAGE-D4 mRNA 発現度と免疫組織化学染色法での癌部 MAGE-D4b 蛋白発現度に相関性が認められたことから、食道扁平上皮癌においても MAGE-D4b が、優勢な isoform として働いていることが考えられた。将来的に、MAGE-D4 の機能解析を含むさらなる研究により、食道扁平上皮癌における MAGE-D4 の分子生物学的機序の解明が期待される。

【結語】

MAGE-D4 遺伝子の発現は食道扁平上皮癌の発癌および進展に関与し、新たな予後予測マーカーや分子標的となる可能性が示唆された。