

主論文の要旨

**Reduced Expression of Adherens Junctions
Associated Protein 1 Predicts Recurrence of
Hepatocellular Carcinoma After Curative
Hepatectomy**

肝細胞癌における Adherens Junctions Associated Protein 1
遺伝子発現とその調節機序に関する検討

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

(指導：小寺 泰弘 教授)

江坂 和大

【背景】

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma、以下 HCC)は全世界で毎年約 50 万人が罹患し、その死亡患者数は悪性腫瘍の中で第 3 位である。外科的肝切除は HCC の局所制御において最も優れた治療法とされるが、治癒切除術後にも高頻度に再発をきたすことが臨床上問題となっている。適切な術後患者管理のためには再発を鋭敏に予測する新規バイオマーカーの同定が望まれる。

Adherens junctions associated protein 1 (AJAP1)遺伝子は 1 番染色体短腕 36 に位置し、上皮細胞の E-cadherin 複合体と関連して接着結合を制御する膜貫通蛋白質をコードしている。神経膠腫において AJAP1 遺伝子の発現低下が不良な予後と関連し、その主たる発現調節機序は DNA メチル化であることが報告されている。1 番染色体短腕 36 のヘテロ接合性喪失が HCC 組織の 28%にあると報告されていること、過去に当教室で実施したマイクロアレイ解析において AJAP1 発現が非癌部と比較して HCC 癌部で低下していたこと (Table 1)、AJAP1 DNA のプロモーター領域に非常に密な CpG island が存在しており DNA メチル化が発現調節に関与する可能性が示唆されたこと (Fig. 1a)、HCC における AJAP1 の役割に関する過去の報告が皆無であることから、本研究では AJAP1 遺伝子に着目し HCC における臨床的意義について検討した。

【対象と方法】

9 種の HCC 細胞株を対象に定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現量、メチル化特異的 PCR 法による DNA メチル化の有無、5-aza-dC を用いた脱メチル化処理による AJAP1 mRNA 発現量の変化、Bisulfite sequencing analysis 法によるプロモーター領域の DNA メチル化状態、Copy number analysis による DNA コピー数について検討した。既知の癌関連細胞間接着分子である Dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3)、Ezrin (EZR)、Focal adhesion kinase (FAK)、Cellular-SRC (SRC)の mRNA 発現量を調べ、AJAP1 mRNA 発現量との相関性を評価した。HCC 患者 144 例から得た肝切除検体の癌部および非癌部組織を対象に、AJAP1 mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法により測定し、DNA のメチル化状態、各種臨床病理学的因子および予後との相関性について検討した。また、48 症例の切除組織切片を対象として、AJAP1 蛋白の発現分布を免疫組織化学染色法により調べた。

【結果】

9 種中 7 種の HCC 細胞株において AJAP1 mRNA 発現の低下を認め、うち 6 種で AJAP1 プロモーター領域の DNA メチル化を、2 種でコピー数減少を認めた (Fig. 1b)。DNA メチル化を認めた細胞株では脱メチル化処理により mRNA 発現量が上昇した (Fig. 1b)。Bisulfite sequencing analysis 法で得られた AJAP1 プロモーター領域の塩基配列から、メチル化特異的 PCR により判定したメチル化状態が正確であることが確認された (Fig. 1c)。細胞株を対象とした癌関連細胞間接着分子との発現相関解析で

は、AJAP1 mRNA 発現量と SRC mRNA 発現量とに負の相関関係がみられた (Fig. 2)。臨床検体では、144 例中 129 例 (90%) で癌部 AJAP1 mRNA 発現量が非癌部と比較して低値であり、癌部 AJAP1 DNA メチル化を 60 例 (42%)、コピー数減少を 18 例 (13%) に認めた。背景肝の状態による非癌部組織中 AJAP1 mRNA 発現量には有意な変化を認めなかったが、癌部組織では AJAP1 mRNA 発現量が非癌部と比較して有意に低下していた (Fig. 3a)。また病期ごとに検討すると、Stage I 症例の癌部組織と比較して Stage II / III 症例の癌部における AJAP1 mRNA 発現量は有意に低値であった (Fig. 3b)。癌部 AJAP1 mRNA 発現量は、腫瘍径、術前 PIVKA -II 値、癌部 SRC mRNA 発現量と負の相関を示した (Fig. 3c)。免疫組織化学染色法ではメチル化を認めた検体において癌部での染色強度低下を認め (Fig. 4a、Fig. 4b)、AJAP1 蛋白染色強度は mRNA 発現量と有意に相関していた (Fig. 5a)。癌部 AJAP1 mRNA 発現量の中央値を用いて低発現群と高発現群の 2 群に分けると、癌部 AJAP1 mRNA 低発現は術前 AFP 高値、術前 PIVKA II 高値、腫瘍径 3 cm 以上、漿膜浸潤、被膜浸潤、脈管浸潤、SRC mRNA 高発現、癌部 AJAP1 DNA メチル化、コピー数減少と有意に相関していた (Table 3)。癌部 AJAP1 mRNA 低発現群では全生存期間の短縮を認め (5 年全生存率 58% 対 76%、 $P=0.016$: Fig. 6a)、同様に無再発生存期間も有意に短縮していた (3 年無再発生存率 27% 対 59%、 $P<0.001$: Fig. 6b)。無再発生存期間に対する単変量解析では男性、術前 PIVKA II 高値、腫瘍径 3 cm 以上、漿膜浸潤、脈管浸潤、進行病期、癌部 AJAP1 mRNA 低発現が有意な予後因子として検出され、これらの因子を対象とした多変量解析において、癌部 AJAP1 mRNA 低発現が独立予後不良因子として検出された (ハザード比 1.63、95%信頼区間 1.04-2.59、 $P=0.035$: Table 4)。

【考察】

本研究では HCC における AJAP1 発現量と、その臨床的意義について検討した。HCC 細胞株では 9 種のうち 7 種で、臨床検体の 90% に癌部 AJAP1 mRNA 発現量低下を認め、AJAP1 は HCC において高頻度に発現が抑制されていることが明らかとなった。その発現調節機序については、HCC 細胞株の脱メチル化処理により AJAP1 mRNA 発現量の上昇を認め、臨床検体において癌部 AJAP1 mRNA 発現量低下と AJAP1 DNA のメチル化が有意に相関していたことから、AJAP1 DNA のプロモーター領域のメチル化が AJAP1 発現の重要な調節機序であることが示された。一方で、Hep3B 細胞株のごとく脱メチル化処理により AJAP1 mRNA 発現量の上昇を認めない場合もあり、DNA メチル化以外の発現調節機序も存在する可能性が示唆された。Hep3B では AJAP1 DNA コピー数減少を認めていたこと、臨床検体において癌部 AJAP1 mRNA 低発現群ではコピー数減少を認める頻度が有意に高かったことから、AJAP1 DNA メチル化のない HCC ではコピー数減少が AJAP1 発現抑制の要因となっているものと考えられた。

HCC は背景肝の慢性炎症や線維化を母地として発癌することがよく知られている。HCC 関連遺伝子の中には発現異常が発癌段階で顕在化することがあるため非癌部肝

組織における AJAP1 発現量を背景肝状態別に検討した。その結果、肝炎や肝硬変の段階での AJAP1 mRNA 発現量の変化は認めなかった。また、癌部 AJAP1 mRNA 発現量は Stage I よりも Stage II/III の HCC 組織中で有意に低値であった。以上から、AJAP1 mRNA 発現は背景肝の炎症や線維形成には影響を受けず、発癌もしくはそれ以降の腫瘍進展に関与することが示唆された。次に、HCC 組織中 AJAP1 発現のバイオマーカーとしての臨床的意義について検討した。癌部 AJAP1 mRNA 発現量は、根治的肝切除後の無再発生存期間と関連しており、多変量解析においても独立した予後不良因子であった。この結果より、AJAP1 が HCC 患者の術後再発リスク層別化に有用であると考えられ、肝生検または切除標本における AJAP1 発現量が術後経過観察の頻度や検査のモダリティの選択、周術期化学療法の適応を決定する一助となることが期待される。

【結語】

AJAP1 は HCC において主に DNA メチル化を介して抑制されており、その癌部における発現量は治癒切除術後の再発予測バイオマーカーとなる可能性が示唆された。