



Title	肝芽腫におけるOCIAD2の機能解析
Author(s)	湊, 雅嗣
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15926号
Issue Date	2024-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k15926
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/92214
Type	theses (doctoral)
File Information	MINATO_Masashi.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

肝芽腫における OCIAD2 の機能解析
(Functional analysis of OCIAD2
in Hepatoblastoma)

2024 年 3 月

北 海 道 大 学

湊 雅 嗣

学 位 論 文

肝芽腫における OCIAD2 の機能解析
(Functional analysis of OCIAD2
in Hepatoblastoma)

2024 年 3 月

北 海 道 大 学

湊 雅 嗣

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語集	6 頁
緒言	8 頁
方法	10 頁
結果	15 頁
考察	24 頁
総括および結論	29 頁
謝辞	30 頁
利益相反	31 頁
引用文献	32 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Minato M, Honda S, Miyagi H, Taketomi A.

Function of OCIAD2 in hepatoblastoma.

Genetics and molecular Research, 2022 Feb 27: DOI: 10.4238/gmr19006

本研究は以下の学会に発表した。

1. 湊雅嗣, 本多昌平, 岡田忠雄, 檜山英三, 武富紹信
PARP6の高メチル化は肝芽腫の新しい予後因子である
第114回日本外科学会, 若手優秀演題賞 (2014年4月4日 京都)
2. 湊雅嗣, 本多昌平, 岡田忠雄, 檜山英三, 武富紹信
肝芽腫における新規予後予測因子としてのDNAメチル化異常の同定,
第51回日本小児外科学会 (2014年5月9日 福岡)
3. Masashi Minato, Shohei Honda, Hiromu Suzuki, Tadao Okada, Eiso Hiyama, Akinobu Taketomi,
Aberrant hypermethylation of the OCIAD2 promoter is a new prognostic factor in hepatoblastoma patients. シンポジウム,
第25回消化器癌発生学会 (2014年11月13日 福岡)
4. 湊雅嗣, 本多昌平, 岡田忠雄, 檜山英三, 鈴木拓, 武富紹信
OCIAD2の高メチル化は肝芽腫の予後不良因子である,
第115回日本外科学会, Young investigator award (2015年4月18日 名古屋)
5. Masashi Minato, Shohei Honda, Hiromu Suzuki, Eiso Hiyama, Akinobu Taketomi,
OCIAD2 functions as a tumor suppressor in hepatoblastoma cells and is downregulated by DNA methylation,
第74回日本癌学会 (2015年10月10日 名古屋)
6. 湊雅嗣, 本多昌平, 小林希, 三好早香, 岡田忠雄, 檜山英三, 鈴木拓, 武富紹信,
OCIAD2はDNAメチル化により制御される肝芽腫の癌抑制遺伝子である,
第52回日本小児外科学会 (2015年5月28日 神戸)
7. 湊雅嗣, 本多昌平, 岡田忠雄, 檜山英三, 鈴木拓, 武富紹信,
肝芽腫において異常メチル化で発現抑制される PARP6 の機能解析,

第116回日本外科学会（2016年4月14日 大阪）

8. 湊雅嗣，本多昌平，宮城久之，新開真人，北河徳彦，田中水緒，田中祐吉，武富紹信，

網羅的 DNA メチル化解析を用いた肝芽腫脱メチル化異常の解析，

第54回日本小児外科学会（2017年5月11日 仙台）

9. 湊雅嗣，本多昌平，宮城久之，新開真人，北河徳彦，田中水緒，田中祐吉，武富紹信，

網羅的DNAメチル化解析を用いた肝芽腫遠隔転移予測マーカーの探求，

第117回日本外科学会（2017年4月27日 横浜）

10. 湊雅嗣，本多昌平，藤好直，宮城久之，檜山英三，武富紹信，
肝芽腫における化学療法抵抗性エピジェネティックマーカーの探求，

第50回制癌剤適応研究会（2017年3月17日 徳島）

要旨

【背景と目的】

小児に発症する肝悪性腫瘍のなかで、最も多くを占めるのが肝芽腫であり、小児 3 大固形腫瘍のひとつとされている。その発生頻度は非常に稀で、数万人に1人の発症である。治療は外科的切除を基本とし、化学療法を組み合わせることで肝芽腫全体の予後は5年無病生存率で74%程度に5年全生存率は90%程度に改善した。しかし、遠隔転移を有する例や、再発症例などでは依然予後が不良である。このような難治例に対する治療成績の向上のためには、個々の症例に適した個別化治療が必要であるが、そのためには有効な予後予測によって治療方針を決定する必要がある。分子生物学的な発生機序の全容は判明しておらず、有効な分子標的薬や予後予測因子として使用できるバイオマーカーに確立されたものがないのが現状である。

肝芽腫においては、多くの症例でβカテニンをコードしている *CTNNB1* 遺伝子の変異を認め、その結果おこるβカテニンの蓄積が肝芽腫発症に関与していることが知られているが、肝芽腫症例の悪性度や進展度の個体差の説明には不十分である。近年行われた網羅的な Genomic 解析からも、新しい有用な知見は得られておらず、Genomic 異常でない機序、つまり Epigenetic な要因を考える必要があると考えた。われわれのグループは、Epigenetic 異常として DNA のメチル化異常に焦点をあて研究を行い、癌抑制遺伝子である *RASSF1A* プロモーター領域の異常メチル化が独立した予後予測因子となることや *IGF2* プロモーター領域の異常メチル化が癌化に関与していることを見出した。メチル化の関与が証明されたところで、さらにメチル化異常の網羅的解析を行い、肝芽腫症例の予後予測因子となる4つの異常メチル化遺伝子を特定した。これらの遺伝子の異常メチル化は、予後予測マーカーとして利用が可能であるものの、実際の分子細胞学的影響は未知であるため、これを解明することでより臨床応用に結びつく可能性がある。本研究では、これら異常メチル化を認めた4遺伝子のうちのひとつである *OCIAD2* に対し、異常メチル化と *OCIAD2* の発現の関係、また肝芽腫における *OCIAD2* の機能について解析した。

【対象と方法】

使用した臨床検体の対象は1994年から2011年の間に当院で外科的切除を受けた患者9例で、肝芽腫腫瘍検体とペアの正常肝組織である。また、細胞実験にはヒト肝芽腫細胞株である HepG2 と HUH6 を使用し、HLF をヒト低分化型肝細胞癌細胞株として使用した。

肝芽腫腫瘍組織および正常肝組織の FFPE 切片から正常肝、胎児型腫瘍部、胎芽型腫瘍部を macrodissection にて分別し、DNA サンプルを抽出した。抽出したゲノム DNA を Sodium Bisulfite 処理し、*OCIAD2* および *RASSF1A* のプロモーター領域のメチル化状態をそれぞれバイサルファイトパイロシーケンス法で解析した。免疫組織化学染色は前述の FFPE 切片に対し抗 *OCIAD2* 抗体を用いて行い、正常肝組織、胎児型肝芽腫腫瘍部、胎芽型肝芽腫腫瘍部、混合型肝芽腫腫瘍部でそれぞれの染色状態を評価した。また、各部位から抽出した mRNA、タンパク質抽出液を用いて *OCIAD2* の発現をリアルタイム PCR、ウエスタンブロットにより解析した。

HepG2、HUH6、HLF に対し、遺伝子組み込みを行い、*OCIAD2* の強制発現株を作製した。

強制発現株および空ベクター株における *OCIAD2* の発現は、定量的リアルタイム PCR およびウエスタンブロット法にて確認した。細胞機能評価として、細胞増殖能、遊走能、浸潤能について検討した。細胞増殖能は Cell Titer 96 Aqueous One Kit を用い、遊走能の評価には Transwell を用い、浸潤能の評価には Matrigel invasion chamber を用いて評価した。各細胞株について E-cadherin, Vimentin, MMP2, GAPDH の発現をウエスタンブロット法にて解析した。

【結果】

免疫組織染色では、*OCIAD2* の非メチル化検体では *OCIAD2* の発現が 60.0% に認められたが、*OCIAD2* のメチル化検体では全検体で *OCIAD2* の発現がみられなかった。腫瘍部では *OCIAD2* のメチル化検体が有意に多く、*OCIAD2* の発現検体は有意に低かった。リアルタイム PCR, ウエスタンブロットの結果からも、*OCIAD2* のメチル化群では有意に *OCIAD2* の発現が低かった。腫瘍部 *OCIAD2* メチル化 6 検体のうち 5 検体で *RASSF1A* のメチル化を認め、腫瘍部 *OCIAD2* 非メチル化検体 7 検体のうち 6 検体は *RASSF1A* が非メチル化状態であった。腫瘍部の *OCIAD2* と *RASSF1A* のメチル化率は相関係数 0.62 の正の相関を認めた。

HepG2, HUH6 の細胞株は、リアルタイム PCR, ウエスタンブロット法にて解析すると、*OCIAD2* の発現を認めないが、*OCIAD2* 強制発現株では *OCIAD2* の発現が認められた。細胞増殖能は *OCIAD2* の強制発現によって有意な変化は見られなかった。遊走能、浸潤能は *OCIAD2* 強制発現株で有意に低下した。HepG2, HUH6, HLF において、*OCIAD2* の強制発現株では E-cadherin, Vimentin の発現に変化は見られなかった。MMP2 の発現は *OCIAD2* の強制発現株で低下した。

【考察】

OCIAD2 は、卵巣癌患者腹水から同定された *OCIAD1* に類似するタンパク質として 2001 年に発見されたが、その発現制御や機能については詳しくわかっていなかった。発現制御としての DNA メチル化について、本研究では *OCIAD2* のメチル化が *OCIAD2* の発現を抑制しているといった結果を得たが、他方では 5-Aza 処理による *OCIAD2* の脱メチル化により *OCIAD2* の発現が回復するといった報告があり、これらを合わせると *OCIAD2* タンパク質の発現は *OCIAD2* のメチル化によって制御されていると考えられた。また、腫瘍部の *OCIAD2* と *RASSF1A* のメチル化率は正の相関関係にあり、腫瘍部 DNA のメチル化が促進されている傾向を反映しているものと考えられた。

本研究では、*OCIAD2* の強制発現により肝芽腫細胞の遊走能・浸潤能が抑制されたが、同様の結果が他の HCC 細胞株を用いた研究でも示されている。その機序として、本研究では浸潤に関わるタンパク質である MMP2 の発現低下が示唆された。これらの結果から *OCIAD2* のメチル化が遠隔転移に関連する根拠が説明可能となり、*OCIAD2* のメチル化ではなく *OCIAD2* タンパク質自体を評価することで遠隔転移リスクを予測できる可能性が示唆された。他の研究で *OCIAD2* は AKT 経路を抑制することや、AKT 経路の活性化は MMP2 の発現を上昇させることが示されており、本研究結果を支持している。一方で、胎児腎臓細胞株での *OCIAD2* 強制発現では、細胞増殖と遊走能の増加がみられ、本研究とは反対の結果がでており、組織によって活性経路が異なる可

能性が考えられた。

【結論】

OCIAD2 の発現は OCIAD2 の DNA メチル化により抑制される。肝芽腫細胞において、OCIAD2 は遊走能、浸潤能を抑制しており、メチル化によりその抑制が解除されることで、より悪性度が高くなると考えられた。また、OCIAD2 のメチル化状態を解析するのではなく、より簡便に OCIAD2 タンパク質の発現を直接解析することで予後や転移能の予測に活用できる可能性が示唆された。

略語集

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

5-Aza, 5-aza-2'-deoxycytidine
AD, Alzheimer's disease
AFP, alpha fetoprotein
APC, adenomatous polyposis coli
AR, activin receptor
BAC, bronchioloalveolar carcinoma
BSA, Bovine serum albumin
CEBPG, CCAAT enhancer binding protein gamma
CTNNB1, catenin beta 1
DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium
EMT, epithelial mesenchymal transition
FAK, focal adhesion kinase
FFPE, formalin fixed paraffin embedded
GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPR180, G protein-coupled receptor 180
HBO1, histone acetyltransferase binding to ORC1
HCN-NOS, hepatocellular neoplasm, not otherwise specified
IGF2, insulin-like growth factor 2
JAK, Janus kinase
JCRB, Japanese cancer research resource bank
lncRNA, long noncoding RNA
LOI, loss of imprinting
LPA, lepidic predominant adenocarcinoma
MMP2, matrix metalloproteinase 2
MST1R, macrophage stimulating 1 receptor
OCIAD1, ovarian carcinoma immunoreactive antigen-like protein 1
OCIAD2, ovarian carcinoma immunoreactive antigen-like protein 2
PARP6, poly[ADP-ribose] polymerase family member 6
PCR, polymerase chain reaction
PRETEXT, pre-treatment extent of tumor
PVDF, poly vinylidene difluoride
RASSF1A, RAS association domain family 1 isoform A

RFX5, regulatory factor X5

SB, sample buffer

SDS, sodium dodecyl sulfate

SMAD, Contraction of Sma and Mad (Mothers against decapentaplegic)

SP4, specificity protein 4

STAT, signal transducer and activation of transcription

TBS, Tris-buffered saline

TBST, Tris-buffered saline with Tween 20

TGF β , transforming growth factor- β

Δ Ct, delta threshold cycle

緒言

肝芽腫は小児の代表的な肝悪性腫瘍であり、日本小児肝癌研究会の年次登録者数はおよそ 25~35 人/年である。肝芽腫は 1970 年代では 2 年無病生存率が 42% (Hata et al, 1990) と予後不良な疾患であったが、近年術前化学療法や肝移植を含めた手術療法の組み合わせなどにより肝芽腫全体の予後は 5 年無病生存率 74.2% (Hiyama et al, 2020) と改善してきた。しかし、遠隔転移を有する進行肝芽腫の 2 年生存率は 35%に過ぎず、病型によっては肝移植術を要することから患児・家族への負担も大きい。病巣を完全切除できるかが治療の最重要項目であるが、完全切除ができたにも関わらず再発する症例や、初発時から既に遠隔転移を有する症例などといった難治例にしばしば遭遇する。このような難治例に対する更なる成績向上のためには個々の症例に適した治療の選択が肝要であり、その治療方針を決定する上で有用な治療効果および予後の予測因子が必要である。これまでに予後予測因子として、年齢 3 歳以上、AFP 高値、病理組織型が胎芽型肝芽腫、PRETEXT IV, Stage 3B/4, シスプラチン不応例では有意に予後が不良である (Brown et al, 2000, Hishiki et al, 2011, Hiyama, 2014) ことが知られているが、分子生物学的な予後判定は明確にされていないのが現状である。同様に分子生物学的な肝芽腫発生機序の全容は判明していないこともあり、効果の高い分子標的治療薬の開発も遅れている。

Beckwith-Wiedemann 症候群 (Koufos et al, 1985) や家族性腺腫性ポリポーシス (Giardiello et al, 1991) の患者で肝芽腫の発生リスクが高いことが報告され、以降それぞれ *IGF2* 遺伝子の LOI (Loss of imprinting) (Rainier et al, 1995), *APC* 遺伝子の異常 (Kurahashi et al, 1995) が肝芽腫の発生に関与していることが明らかとなった。さらに詳細な研究結果によりこれらは Wnt 経路を活性化し β カテニンの蓄積を引き起こすことで腫瘍形成に関与していることが分かった (Koch et al, 1999; Jeng et al, 2000)。また β カテニンをコードしている *CTNNB1* の活性変異により、*APC* 遺伝子異常に類似した β カテニンの蓄積を引き起こすことも報告され (Blaker et al, 1999), このように β カテニンの蓄積が肝芽腫の発生に関与していることが明らかとなってきたが、その下流の標的遺伝子については未だに研究段階である。

Whole-exome sequencing 解析が医学界で行われるようになると、肝芽腫では 1 症例当たり平均で 4.67 somatic mutations (range, 2-8 mutations) を認め、成人癌に比して他の小児悪性腫瘍と同様に塩基配列変異の頻度は非常に少ないことが分かった (Jia, 2014)。その後の報告でも肝芽腫での塩基配列変異が少ないことが相次いで確認されている (Sumazin et al, 2016; Carrillo-Reixach et al, 2020)。塩基配列変異の頻度は少ないものの、 β カテニンをコードしている *CTNNB1* 遺伝子の変異に限るとその変異は 77% の肝芽腫症例から確認され (Nagae et al, 2021), β カテニン変異は肝芽腫発生に一定の関与があると証明されている。しかし、肝芽腫において網羅的な Genomic 解析 (Rumbajan et al, 2013) や lncRNA 解析 (Dong et al,

2014)が行われたが新たに有用な知見は得られず、肝芽腫症例の悪性度や進展度の個体差の説明には不十分であり、Genomic 異常以外の機序も関与していると考えられた。

Genomic 異常ではない機序、つまり塩基配列の変異を伴わない遺伝子発現の異常として Epigenetic な異常があげられる。Epigenetic な遺伝子制御の分野では DNA のメチル化およびヒストン修飾の2つの分子機構に焦点が当てられており (Jaenisch et al, 2003), その中でも DNA のメチル化異常に関して、網羅的解析が進歩し新しい知見が多数得られるようになった(Plass et al, 2013)。特に細胞リプログラミング技術によって細胞初期化と癌発生に共通する分子機序として epigenetic 異常は大きくクローズアップされることとなり(Semi et al, 2013), 肝癌幹細胞においてもメチル化異常の主要な関連が知られるようになった(Raggi et al, 2014)。これらの背景から胎児肝を発生母地とする肝芽腫においては、 β カテニン変異を代表とする塩基配列異常もさることながら、epigenetic 異常がその発癌および進展に強く関わっていると考えられ、われわれのグループは epigenetic 異常のなかでも DNA のメチル化異常について研究をつづけ一定の成果を得てきた。その中で、癌抑制遺伝子である *RASSF1A* プロモーター領域の異常メチル化が独立した予後予測因子となること(Honda et al, 2008a)や *IGF2* プロモーター領域の異常メチル化が癌化に関与していること(Honda et al, 2008b)を見出したことにより、肝芽腫におけるメチル化の関与を証明することとなった。

肝芽腫における DNA のメチル化異常のさらなる研究を進め、DNA メチル化異常のゲノムワイドな解析を行い、肝芽腫患者の予後不良と相関する4つの異常メチル化遺伝子、*OCIAD2*, *GPR180*, *PARP6*, および *MST1R* を特定した(Honda et al, 2016)。この4つの遺伝子の異常メチル化は、診断時の年齢、遠隔転移、肝静脈浸潤と有意に相関した。この肝芽腫の予後不良と相関する4遺伝子の異常メチル化は、予後予測因子としての利用が可能であることはもとより、同時に治療対象として活用できる可能性を有していると考えた。治療対象として利用するためには、これらの遺伝子の異常メチル化という現象が、単なる予測マーカーといった“状態”を見ているものではなく、腫瘍に対してのなんらかの“機能”および“作用”を有していることが必要である。そこで4つの候補遺伝子のうち、まだ機能が解析されていない *OCIAD2* を取り上げ、メチル化異常と発現の関係そして肝芽腫の腫瘍細胞に対する機能を明らかにする。

方法

1. 臨床検体

本実験は北海道大学病院高度先進医療センター自主臨床研究事務局により承認された課題名「DNA メチル化解析による進行肝芽腫予後予測分子マーカーの確立」(臨床研究番号: 自 010-0202) に基づき行った。対象は 1994 年から 2011 年の間に当院で外科的切除を受けた患者 9 例で、肝芽腫腫瘍検体と対の正常肝組織を得た。研究プロトコールは当院の倫理委員会により承認され、すべての症例について情報に基づく署名された同意を得ている。そのうえで、「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に従って本研究を実施した。

2. 細胞株

本研究の細胞実験には HepG2 と HUH6 をヒト肝芽腫細胞株として使用し、HLF をヒト低分化型肝細胞癌細胞株として使用した。これらの細胞株は、Japan Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB 細胞バンク, Japan) から購入した。また、Lenti-X 293T をレンチウイルス産生のための細胞株として TaKaRa (TaKaRa Clontech, Japan) から購入した。これらの細胞株の培養には 10% 非働化ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Nacalai Tesque, Japan) を用い、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

3. DNA メチル化分析

DNA サンプルは、肝芽腫腫瘍組織および正常肝組織の Formalin fixed paraffin embedded (FFPE) から正常肝、胎児型腫瘍部、胎芽型腫瘍部を macrodissection にて分別し、それぞれ QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Germany) を用いて抽出した。9 症例中 4 症例から胎児型腫瘍部および胎芽型腫瘍部の両方を採取できたため、合計の検体数は正常肝 9 検体、腫瘍部 13 検体となった。また新鮮凍結検体の正常肝および腫瘍部からそれぞれ QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Germany) を用いて抽出した。抽出の手順は、macrodissection した検体のパラフィンを除去してから proteinase K 処理を 1 時間 56°C で行い組織の溶解を確認した。徐々に温度を上げないために 90°C に達しているヒートブロックに移して 1 時間 90°C でインキュベートし脱クロスリンク処理を行った。脱クロスリンク後のサンプルを RNase 処理し DNA を精製した。EpiTect bisulfite kit (QIAGEN, Germany) を用いて、抽出したゲノム DNA の非メチル化シトシンを Sodium Bisulfite 処理した。この処理により非メチル化シトシンのみウラシルに変換され、メチル化シトシンと識別できるようになり、OCIAD2 プロモーター領域のメチル化状態を、PSQ96MA システム (Biotage, Sweden) にてバイサルファイトパイロシーケンス法で計測し、Pyro Q-CpG software (Biotage, Sweden) で解析した。OCIAD2、RASSF1A のメチル化率はそれぞれ先行研究で用いられた 34.3% (Honda et al, 2016)、31.8%

(Kondo et al, 2022) をカットオフとし、カットオフ以上をメチル化状態と判定し、未満を非メチル化状態と判定した。使用したプライマーは表 1 に示す。

表 1: バイサルファイトパイロシーケンスに用いたプライマー

OCIAD2

pyro-seq PCR primer-forward; 5'-AGATAGGTGGGGTATTYGGGAAGT-3'

pyro-seq PCR primer-reverse; 5'-Bio-CCRAAACRAAACTCACCTATATAATC-3'

sequencing primer; 5'-TATTYGGGAAGTTGGAG-3'

RASSF1A

pyro-seq PCR primer-forward; 5'- GAAGGAGGGGAAGGAAGGGTAAG-3'

pyro-seq PCR primer-reverse; 5'-Bio- GCCTCCCCCAAATCCAA-3'

sequencing primer; 5'- TTGTATTTAGGTTTTTATTG-3'

4. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は FFPE 切片を 4 μ m に薄切したスライドにて行った。抗 OCIAD2 抗体 (Sigma Aldrich, USA, HPA040979) を 1/300 に希釈し免疫組織化学染色に用い、ヘマトキシリンで対比染色した。OCIAD2 タンパク質の発現強度を以下表 2 のように定義し、正常肝組織、胎児型肝芽腫腫瘍部、胎芽型肝芽腫腫瘍部、混合型肝芽腫腫瘍部でそれぞれ合計 21 検体について染色状態を評価した。

表 2: OCIAD2 に対する免疫組織化学染色の判定基準

陰性: 隣接する胆管上皮細胞よりも染色がないか弱い染色

陽性: 隣接する胆管上皮細胞よりも強い染色

5. RNA 発現解析

QIAamp RNA Blood Mini キット (QIAGEN, Germany) を使用して各種細胞株から Total RNA を抽出し、First Strand cDNA 合成キットと ReverTra Ace- α (TOYOBO, Japan) を使用して cDNA を合成した。定量的リアルタイム PCR は、自己設計プライマーを用い (プライマー配列は表 3)、LightCycler FastStart DNAMaster ハブリダイゼーションプローブ (Roche, Switzerland) およびユニバーサルプローブライブラリープローブ (Roche, Switzerland, Prove#16,#60) を使用し行った。相対的発現レベルは、ハウスキーピング遺伝子である

GAPDH を内在性コントロールとして用いた ΔCt 法を使用して定量化した。

表 3: qPCR に用いたプライマー配列とプローブナンバー

<i>OCIAD2</i>	forward: 5'-TTGGTCCACAGCATAACAGG-3'
	Reverse: 5'-CCATGCTTTATTTTGCATTCC-3'
	Probe #16
<i>GAPDH</i>	Forward: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
	Reverse: 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
	Probe #60

6. タンパク質発現解析

細胞株のタンパク質は、プロテアーゼ阻害剤を含む NP40 溶解バッファーで細胞を溶解して抽出した。タンパク質濃度が 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように 6xSB で調整し、95°C で 5 分間加熱した。Running buffer として SDS を用い、20 μg のタンパク質抽出液を Mini-PROTEAN TGX Precast Gels (BIO-RAD, USA) の各レーンにロードし、電気泳動にかけた。そのゲルに 100V の電圧をかけ、メタノール処理をした PVDF 膜へ転写した。転写した PVDF 膜は、3% BSA および Tween-20 を 0.1% 加えた TBS (TBST) にて 1 時間室温でブロッキングした。ブロッキング後 TBST で洗浄し、OCIAD2 (1:1000, Sigma, USA, SAB3500119), E-cadherin (1:100, Abcam, UK, ab1416), vimentin (1:1000, CST, USA, #5741), MMP2 (1:1000, CST, USA, #40994), GAPDH (1:5000, CST, USA, #5174) に対する一次抗体を用いて 4°C で一晩インキュベートした。インキュベートの後 TBST で 3 回洗浄し、抗ウサギ二次抗体 (1:5000, CST#7074) 希釈液で室温にて 1 時間インキュベートした。基質として SuperSignal West Dura extended duration substrate (Thermo Fisher Scientific, USA) を PVDF 膜に滴下し ChemiDOC イメージングシステム (BIO-RAD, USA) を用いて化学発光を検出した。

7. OCIAD2 強制発現細胞株の樹立

本実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って行った。*OCIAD2* の全長 cDNA (465 bp) をヒト全血より RT-PCR 法でクローニングし、得た *OCIAD2* の cDNA 塩基配列に変異がないことをライブラリと比較参照し確認した上で、pLVSIN-IRES-ZsGreen1 Vector (TaKaRa Clontech, Japan) に組み込んだ。その際の RT-PCR で使用したプライマーは制限酵素 NotI で処理可能なように設計した (表 4)。Lenti-X 293T および Lenti-XHTX パッケージングシステム (TaKaRa Clontech, Japan) を使用して、組換えレンチウイルス上清を取得した。Xfect トランスフェクション試薬 (TaKaRa Clontech, Japan) を使用して HepG2, HUH6 および HLF にトランスフェクションを行った。細胞を収集し、BD FACS Aria III (BD Biosciences, USA)

を用いて蛍光を有する細胞をソーティングした。また、対照とするため、遺伝子を組み込んでいない空の pLVSIN-IRES-ZsGreen1 Vector も同様に HepG2, HUH6 および HLF へトランスフェクションし、BD FACS Aria III (BD Biosciences, USA)を用いてソーティングした(空ベクター株)。強制発現株および空ベクター株の OCIAD2 発現は、定量的リアルタイム PCR およびウエスタンブロット法にて確認した。

表 4:OCIAD2 の全長クローニングプライマー配列(NotI 組み込み用)

forward: 5'-ATTTGCGGCCGCTGCCACCATGGCTTCAGCGTCTGCTCGTGGAAA-3'

Reverse: 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTTAGGAAGCTGAAGGCTGAGAGTCTCCC-3'

8.細胞増殖能評価

各細胞株を 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 2,000 細胞の密度で 100 μ L ずつ分注した。生細胞数は Day0, 1, 2 日目に Cell Titer 96 Aqueous One Kit (Promega, Germany)を測定するウェルに 20 μ L 滴下し、インキュベーターで 1 時間インキュベートした後 VARIOSCAN FLASH microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA)で 490nm の吸光度を測定し、細胞を含まない培地のみ吸光度の平均値を背景値として減算し測定値とした。同様の試験を 3 回行い、結果を解析した。

9.細胞遊走能評価

遊走能の評価には上下2つのチャンバーが多数の小孔 (8 μ m) を有する膜で隔てられた構造の Transwell (24 ウェルプレート 8.0 ミクロン, Corning, USA)を使用した。上のチャンバーに 50,000 個の細胞株を含む無血清の DMEM 100 μ L を分注し、下のチャンバーには通常の培地である 10%非働化ウシ胎児血清を含む DMEM を分注した。培地の水位に気をつけて 48 時間インキュベーションした。インキュベーション後、膜の上側に残っている細胞を取り除いてから膜を切り抜き、孔を通り抜け下側に移動した細胞を Diff-Quick (Sysmex, Japan)で染色し、全領域でカウントした。同様の試験を 3 回行い、結果を分析した。

10.細胞浸潤能評価

浸潤能の評価には上下2つのチャンバーが多数の小孔 (8 μ m) を有する膜で隔てられた構造の BD Matrigel invasion chamber (24 ウェルプレート 8.0 ミクロン, BD Biosciences, USA)を使用した。また、この膜はマトリゲル基底膜マトリックスの薄層でコートされており、非浸潤性の細胞の移動はできない構造になっている。上のチャンバーに 150,000 個の細胞株を含む無血清の DMEM 100 μ L を分注し、下のチャンバーには通常の培地である 10%非働化ウシ胎児血清を含む DMEM を分注した。培地の水位に気をつけて 48 時間インキュベーションした。

インキュベーション後、膜の上側に残っている細胞を取り除いてから膜を切り抜き、孔を通り抜け下側に移動した細胞を Diff-Quick (Sysmex, Japan) で染色し、全領域でカウントした。同様の試験を 3 回行い、結果を分析した。

11. 統計解析

データは平均値 \pm SEとして表した。統計解析は、フィッシャーの直接確率検定、 χ^2 乗検定またはスチューデントの t 検定を使用した。統計分析は、統計パッケージ R (バージョン 3.2.2, <http://www.r-project.org> から無料でダウンロード可能) を使用して実施した。p<0.05 を統計学的に有意であるとした。

結果

1. *OCIAD2* のメチル化と *OCIAD2* 遺伝子の発現との関係

最初に、FFPE 切片から macrodissection により個別に抽出した 9 つの正常肝臓 DNA とペアの肝芽腫腫瘍 DNA（胎児型および/または胎芽型）との合計 21 サンプル、そして 7 つの肝芽腫腫瘍検体とペアの正常肝臓組織の凍結組織検体から抽出した DNA との合計 14 サンプルにおける *OCIAD2* プロモーター領域のメチル化率をバイサルファイトパイロシーケンス法にて測定し評価した。*OCIAD2* 遺伝子をメチル化または非メチル化として分類するための平均メチル化率のカットオフ値は 34.3%とした。*OCIAD2* のメチル化率の分布を以下に示す（図 1）。

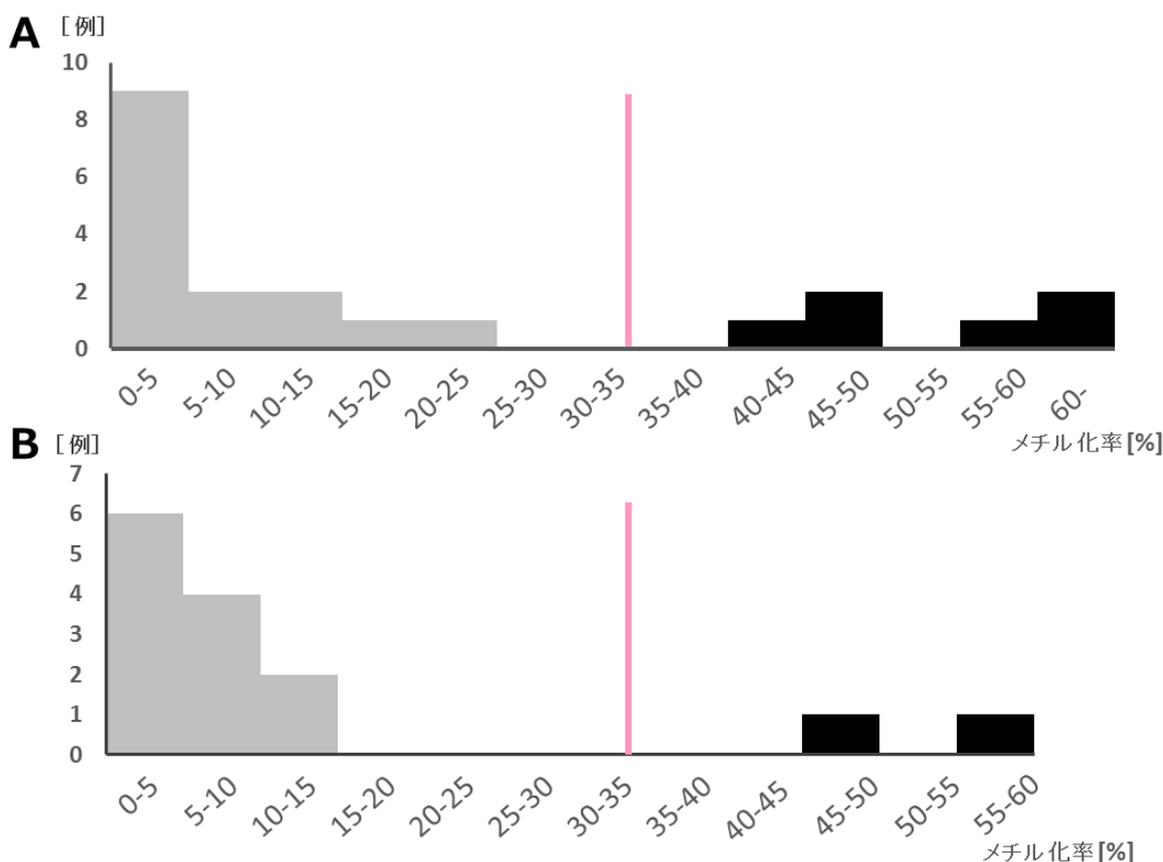


図 1. *OCIAD2* メチル化率の分布

- A. FFPE 切片より抽出した DNA を解析した *OCIAD2* メチル化率のヒストグラム
B. 凍結組織より抽出した DNA を解析した *OCIAD2* メチル化率のヒストグラム
いずれの図も赤線はカットオフ値である 34.3%の部位である。

次に OCIAD2 タンパク質の発現を評価するために、上記 21 サンプルの FFPE 切片に対し免疫組織化学染色を行い評価した (図 2)。

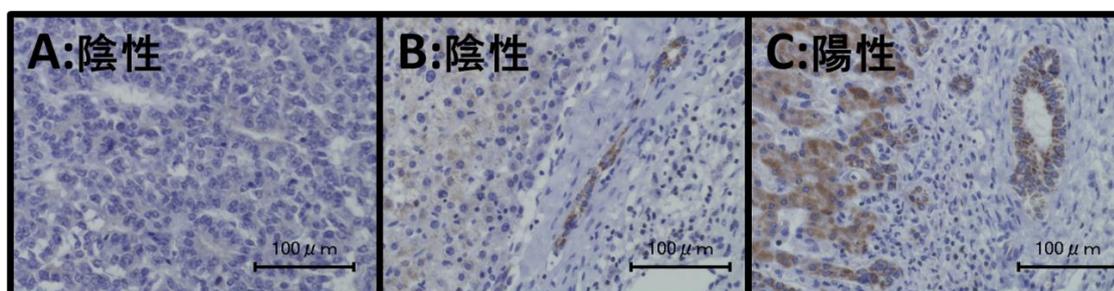


図 2. 肝芽腫腫瘍組織検体における OCIAD2 の免疫組織化学染色

表 2 の基準に基づき分類した OCIAD2 陰性および陽性の代表例を示した。

- A: 陰性, 染色されない
- B: 陰性, 隣接する胆管上皮細胞よりも弱い染色
- C: 陽性, 隣接する胆管上皮細胞よりも強い染色

9 つの正常肝のうち 1 つの正常肝で、また 12 の腫瘍部のうち 6 つの腫瘍部で OCIAD2 のメチル化が確認された。OCIAD2 のメチル化は正常肝に比べ腫瘍部で有意に多く確認された (図 3a)。OCIAD2 タンパク質の陽性染色率は、正常肝で 89%、腫瘍部で 8.3%であり、正常肝で有意に OCIAD2 タンパク質は発現していた (図 3b)。OCIAD2 のメチル化と OCIAD2 タンパク質の発現の関係については、OCIAD2 非メチル化群で OCIAD2 タンパク質の陽性染色率は 60.0%であったのに対し、OCIAD2 メチル化群では OCIAD2 タンパク質の陽性染色率は 0%であった (図 3c)。

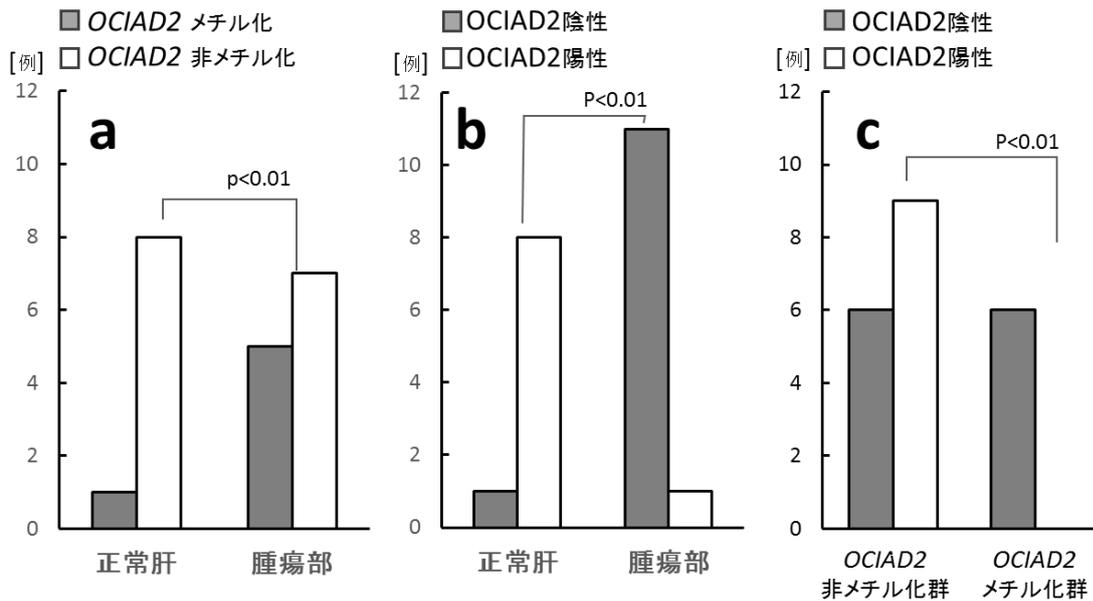


図 3. 正常肝・肝芽腫腫瘍部における *OCIAD2* のメチル化とタンパク質発現

a: 正常肝・肝芽腫腫瘍部における *OCIAD2* のメチル化状態の比較

b: 正常肝・肝芽腫腫瘍部における *OCIAD2* タンパク質発現状態の比較

c: *OCIAD2* のメチル化状態に対する *OCIAD2* タンパク質発現の比較

次に、7 つの肝芽腫腫瘍検体とペアの正常肝臓組織の凍結組織検体から抽出した mRNA をサンプルとし *OCIAD2* mRNA の発現を定量的リアルタイム PCR によって評価した。*OCIAD2*/*GAPDH* の相対的 mRNA 発現率は非メチル化群で 0.20 ± 0.12 、メチル化群で 0.05 ± 0.02 であり、*OCIAD2* メチル化群では有意に *OCIAD2* mRNA の発現が低かった ($p < 0.02$) (図 4A)。

同様に 7 つの肝芽腫腫瘍標本とペアの正常肝臓組織の凍結組織検体から抽出した溶解物をウエスタンブロット法によってタンパク質発現を解析した。*OCIAD2*/*GAPDH* の相対的なタンパク質発現率は、非メチル化群で 1.03 ± 0.26 、メチル化群で 0.02 ± 0.02 とメチル化群であり、有意に *OCIAD2* タンパク質の発現が低かった ($p < 0.002$) (図 4B)。

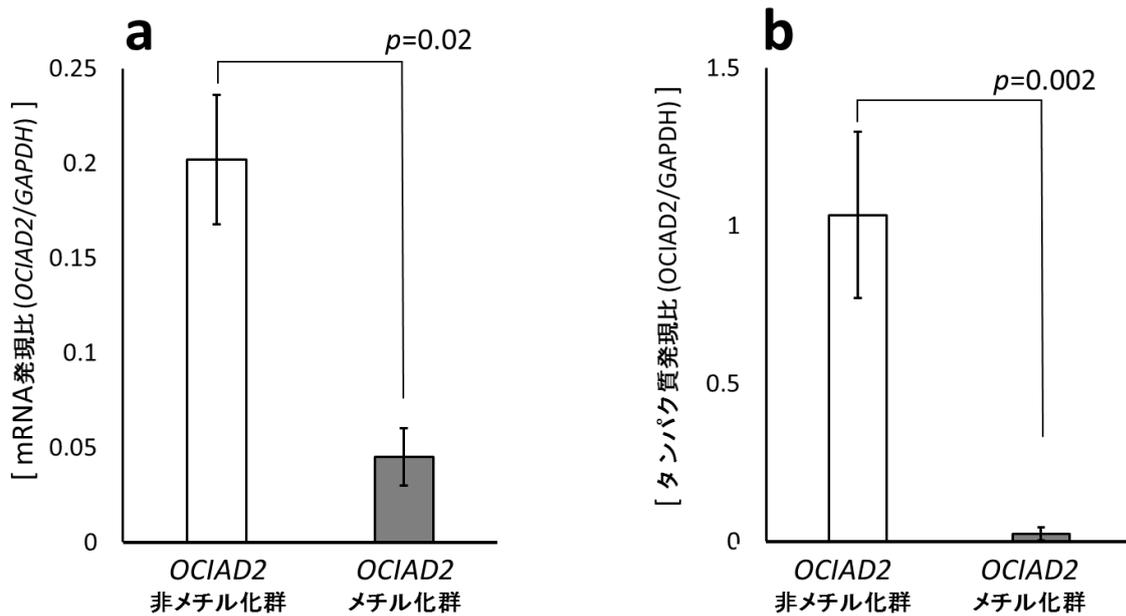


図 4. *OCIAD2* のメチル化状態に対する *OCIAD2* の発現量の比較

- a. *OCIAD2* mRNA の発現量の比較
- b. *OCIAD2* タンパク質の発現量の比較

なお、*OCIAD2* mRNA 発現とタンパク質発現の関係を図 5 に示す。*OCIAD2* mRNA とタンパク質の発現は相関係数 0.52 の正の相関を認めた。

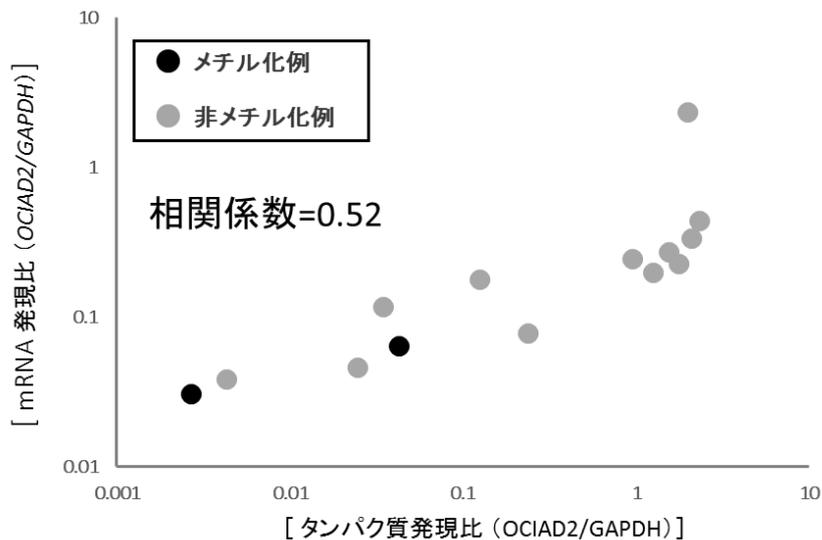


図 5. *OCIAD2* mRNA および *OCIAD2* タンパク質発現比のプロット図

FFPE 切片から macrodissection により個別に抽出した 9 つの正常肝臓 DNA とペアの肝芽腫腫瘍 DNA (胎児型および/または胎芽型) との合計 22 サンプルにおける *RASSF1A* プロモーター領域のメチル化率をバイサルファイトパイロシーケンス法にて測定し評価した。*RASSF1A* 遺伝子をメチル化または非メチル化として分類するための平均メチル化率のカットオフ値は 31.8% とした。*RASSF1A* のメチル化率の分布を図 6 に示した。腫瘍部の *RASSF1A* のメチル化は 6 検体に認めた。腫瘍部 *OCIAD2* メチル化 6 検体のうち 5 検体で *RASSF1A* のメチル化を認め、腫瘍部 *OCIAD2* 非メチル化検体 7 検体のうち 6 検体は *RASSF1A* が非メチル化状態であった。腫瘍部における *OCIAD2* と *RASSF1A* のメチル化率の関係は、相関係数 0.62 の正の相関を認めた (図 7)。

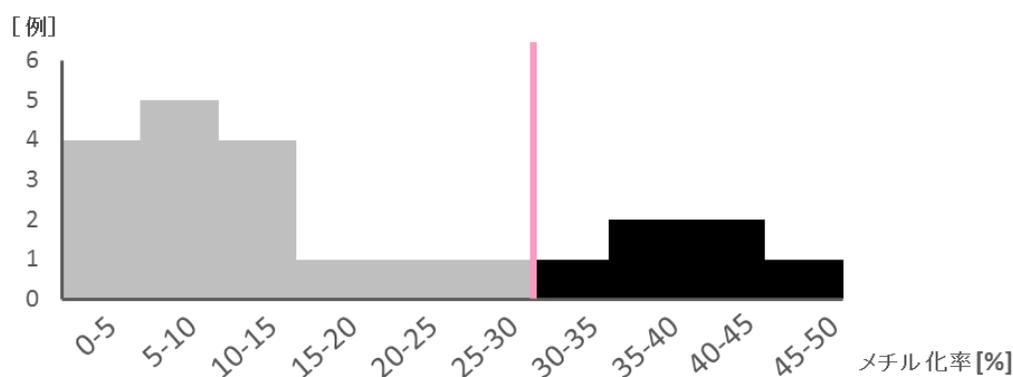


図 6. *RASSF1A* のメチル化率の分布。カットオフ値である 31.8% を赤線で示した。

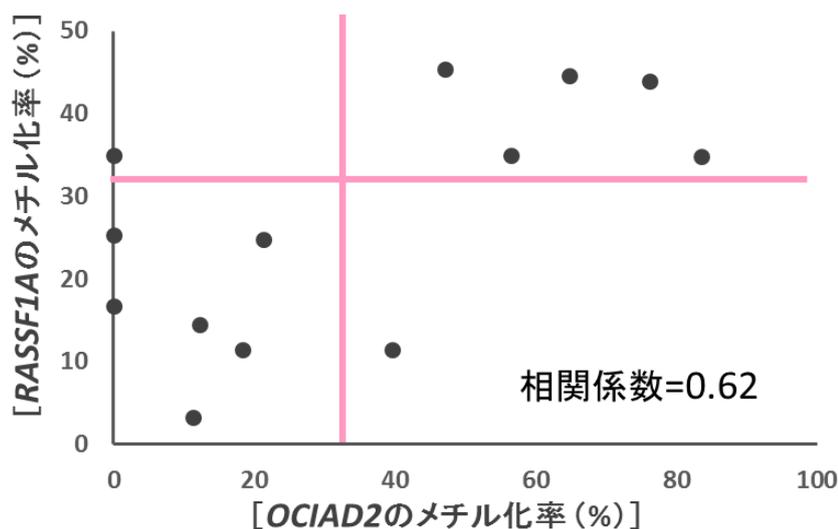


図 7. *OCIAD2* のメチル化率と *RASSF1A* のメチル化率のプロット図

RASSF1A のカットオフ値を赤の横線で、*OCIAD2* のカットオフ値を赤の縦線で示した。

2. 細胞増殖, 遊走および浸潤に対する OCIAD2 強制発現の影響

肝芽腫における OCIAD2 タンパク質の機能を評価するために, 肝芽腫由来である HepG2 および HUH6 細胞に対して OCIAD2 の強制発現株を作製した。これらの強制細胞株における OCIAD2 mRNA の発現は, 定量的リアルタイム PCR を使用して確認した。OCIAD2 を強制発現していない HepG2 および HUH6 に対して強制発現株では OCIAD2 mRNA 量は有意に増加していた (図 8a)。また, OCIAD2 タンパク質の発現をウエスタンブロット法によって確認した。OCIAD2 を強制発現していない HepG2 および HUH6 では OCIAD2 タンパク質の発現は認めなかったが, 強制発現株においては HepG2, HUH6 いずれも OCIAD2 タンパク質を発現していた (図 8b)。

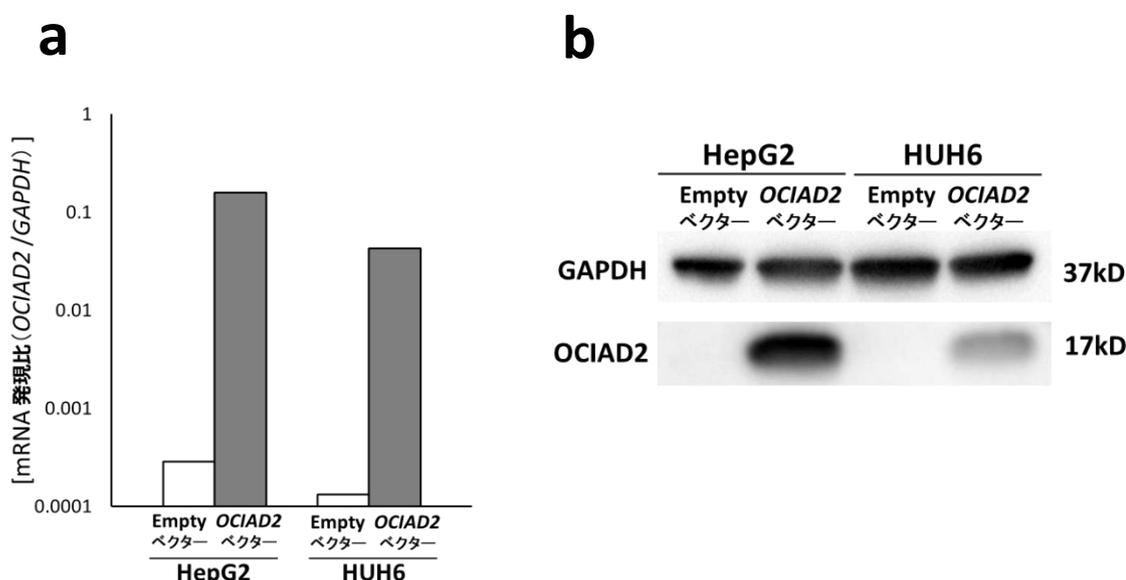


図 8. 強制発現株における OCIAD2 発現の確認

a: qPCR による OCIAD2 発現の確認

b: ウエスタンブロットによる OCIAD2 発現の確認

OCIAD2 強制発現細胞株 HepG2 および HUH6 を使用して, 増殖, 遊走, 浸潤能力などの細胞機能の変化を評価した。

図 6 に示すように, 細胞増殖は 48 時間で HepG2 では約 3 倍, HUH6 では約 6 倍に増加したが, OCIAD2 ベクターまたは Empty ベクターでトランスフェクトされた細胞株間では細胞増殖に有意差は認めなかった (図 9)。

細胞遊走アッセイにより, 遊走した HepG2 細胞の数は, Empty ベクター群で 191 ± 9 /ウェル, OCIAD2 ベクター群で 14 ± 5 /ウェルであった ($p < 0.01$)。遊走した HUH6 細胞の数は, Empty ベクター群で 1672 ± 110 /ウェル, OCIAD2 ベクター群で 449 ± 175 /ウェル

ルであった ($p < 0.02$)。HepG2 および HUH6 の両群において OCIAD2 の過剰発現株では、遊走能が大幅に減少していた (図 10a)。

細胞浸潤アッセイの結果であるが、浸潤した HepG2 細胞の数は Empty ベクター群で 134 ± 40 / ウェル, OCIAD2 ベクター群で 22 ± 11 / ウェルであった ($p < 0.05$)。同様に、浸潤した HUH6 細胞の数は, Empty ベクター群で 355 ± 37 / ウェル, OCIAD2 ベクター群で 105 ± 31 / ウェルであった ($p < 0.02$)。HepG2 および HUH6 の両群において OCIAD2 の過剰発現株では、浸潤能が大幅に減少していた (図 10b)。

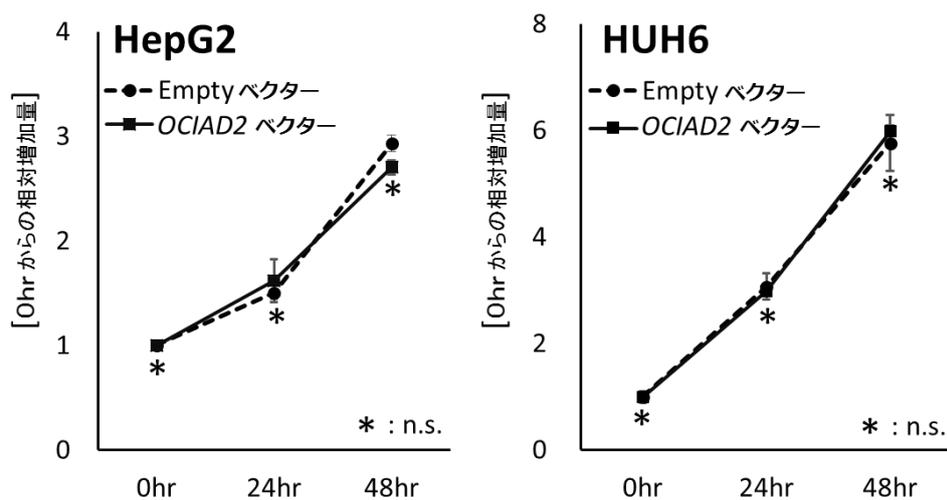


図 9. 細胞増殖能の解析

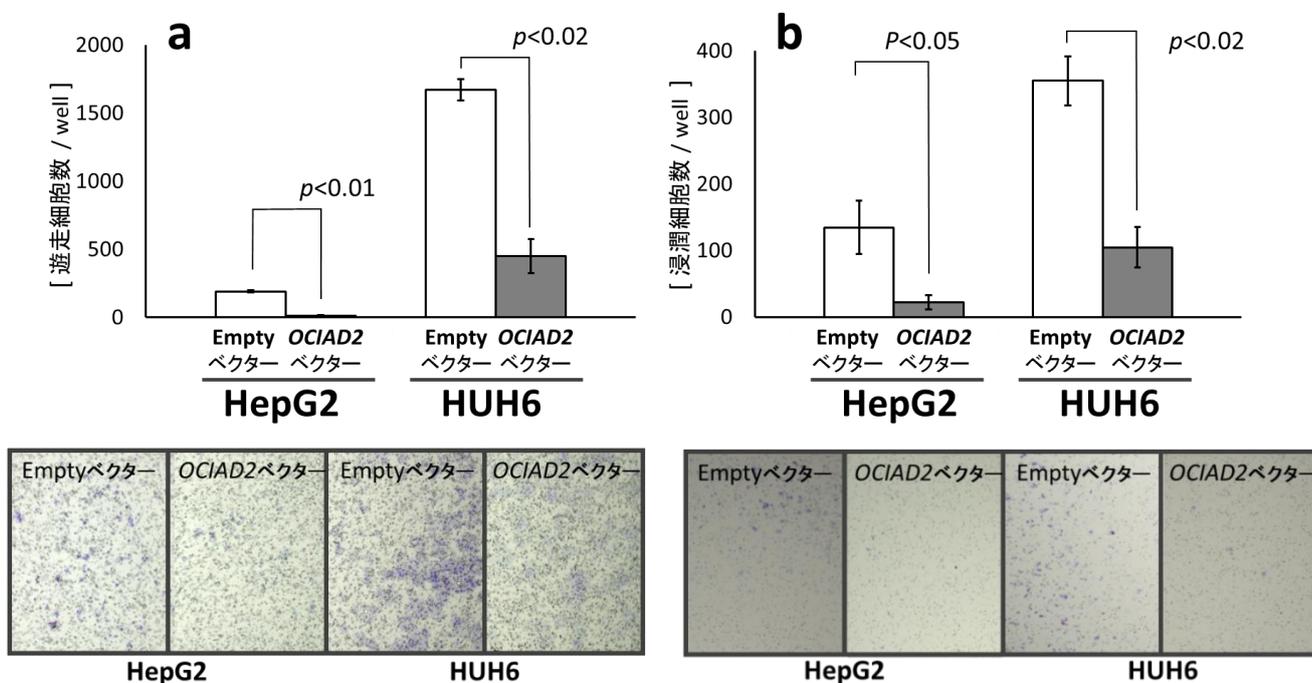


図 10a. 遊走能の解析とその顕微鏡写真, b. 浸潤能の解析とその顕微鏡写真

3. OCIAD2 過剰発現に対するタンパク質発現の影響

OCIAD2 の強制発現株で遊走および浸潤能が低下するメカニズムを明らかにするために、ウエスタンブロット法を用いて、E-cadherin, Vimentin, および MMP2 など遊走・浸潤に関連するタンパク質の発現変化を解析した。この比較解析では、上皮間葉転換 (EMT) の典型的な形態学的表現型を示す低分化肝細胞癌細胞株として HLF を追加した。

HepG2 では E-cadherin, Vimentin は発現がなく OCIAD2 の強制発現株においても同様であった。HUH6 では E-cadherin は発現し、Vimentin は発現していなかったが、OCIAD2 強制発現株でも同様であった。また、HLF においては、E-cadherin は発現がなく、Vimentin は発現していたが、OCIAD2 の強制発現株においても同様であった。しかし各細胞株において OCIAD2 の強制発現株では MMP2 の発現は減少していた (図 11, 図 12)。

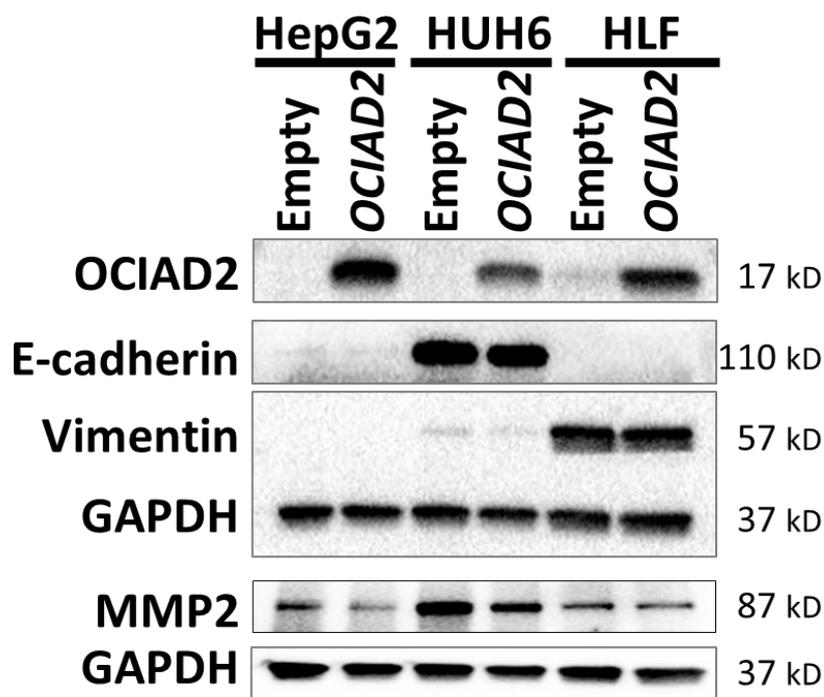


図 11. 各細胞株でのウエスタンブロットの比較

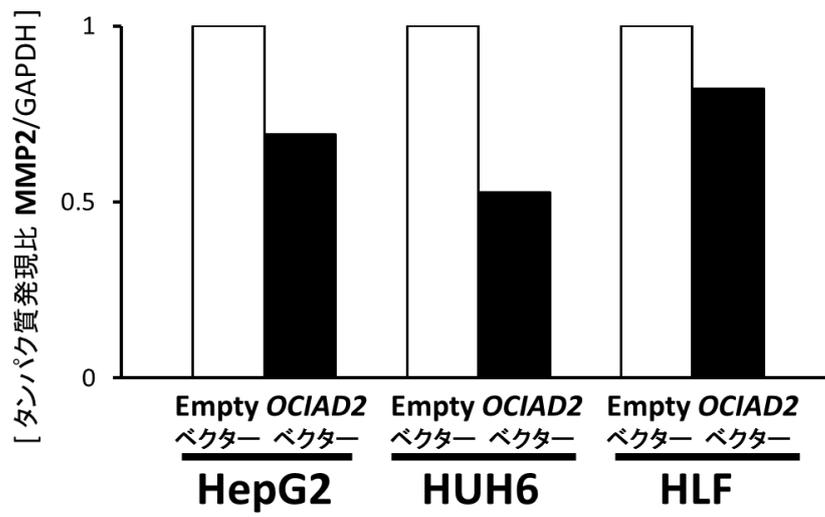


図 12. ウエスタンブロットの解析による MMP2 の発現比

考察

OCIAD2 総論

Ovarian carcinoma immunoreactive antigen domain 1 (*OCIAD1*)は、卵巣癌患者の腹水中から同定された免疫反応性抗原で、その塩基配列から新規遺伝子として報告され (Luo et al, 2001) , その翌年 National Institutes of Health Mammalian Gene Collection Project の中で *OCIAD2* は *OCIAD1* に類似する塩基配列を持つ遺伝子として始めて同定された (Strausberg et al, 2002) 。*OCIAD2* は 154 アミノ酸からなるタンパク質で、4 番染色体の長腕 (4q11) において *OCIAD1* (4q11) に隣接して位置し、それぞれ N-末端領域に高い類似性を有し、OCIA ドメイン family に属している (Sakashita et al, 2018) 。この2つの遺伝子は進化の過程で無脊椎動物から存在し遺伝子重複により分かれ、その後も脊椎動物に広く保存されているといわれている (Sinha et al, 2018) 。しかし生理的機能や相互作用は詳しく分かっておらず、我々の以前の研究で DNA メチル化異常のゲノムワイドな解析を行い、*OCIAD2* の高メチル化が肝芽腫患者の予後不良と相関することを特定した (Honda et al, 2016) が、この時点では *OCIAD2* の機能はおろか、*OCIAD2* のメチル化が *OCIAD2* の発現に影響を及ぼすかどうかも未知であった。

The human protein atlas を参照すると *OCIAD2* は腎臓、肝臓で他の組織よりも多く発現しており、このことは *OCIAD2* が組織特異的な機能を有している可能性を示唆している。これは、広く分布し発現している *OCIAD1* と対照的である。*OCIAD* タンパク質は様々な癌においても発現が確認されているが、*OCIAD2* では特に肺癌、腎癌でその発現が高い (Praveen et al, 2020) 。GFP タグを付けた全長 *OCIAD2* を HEK293 細胞株に組み込み免疫蛍光分析が行われ、*OCIAD2* は初期エンドソームとミトコンドリアに局在することが明らかになった。また、変異解析から *OCIAD2* の OCIA ドメイン、特に2つの α ヘリックスを持つ 77 アミノ酸の中央領域が *OCIAD2* の細胞内局在を制御するのに重要であることが示され (Sinha et al, 2018) , 疎水部である α ヘリックスの部位が膜貫通領域を形成していると言われている (Han et al, 2014) 。また詳細な解析により、*OCIAD2* はミトコンドリア内膜に存在し、N 末端部分はミトコンドリア膜間腔に存在していることが判明した (Chojnacka et al, 2022) 。*OCIAD2* と *OCIAD1* の相互作用については、免疫沈降解析により OCIA ドメインを介して相互作用していることが示されている (Sinha et al, 2018) 。

OCIAD1 の生理的機能の一つとして、ミトコンドリア内膜に存在しミトコンドリアにおける電子伝達系の呼吸鎖複合体 I と相互作用しその作用を調整し、また呼吸鎖複合体 III の制御を行っていることが解明された (Shetty et al, 2018 ; Le Vasseur et al, 2021) 。さらには、*OCIAD2* も呼吸鎖複合体 III の会合因子として同定され、*OCIAD2* のノックアウト細胞株ではミトコンドリアの形態異常や呼吸鎖複合体 III および呼吸鎖超複合体 III+IV の大幅な減少そして呼吸鎖複合体 III の活性低下が生じることが判明した (Chojnacka et al, 2022) 。重要な生理機能を有するものの、International mouse phenotyping

consortium で示されている OCIAD1 および OCIAD2 それぞれのノックアウトマウスは、生存可能で繁殖力があり肉眼的な異常を示さないことが分かっている。

OCIAD2 の病理学的な側面としては、悪性腫瘍以外にアルツハイマー型認知症 (AD) との関連が報告されている (Han et al, 2014)。その中では、AD 患者の海馬は非 AD 患者の海馬と比較して OCIAD2 の発現が有意に上昇しており、OCIAD2 は AD の初期段階で主要な神経毒性を引き起こすとされるアミロイド β を増加させる γ セクレターゼの選択的活性化因子であると述べられている。

OCIAD2 高メチル化が OCIAD2 発現に及ぼす影響

OCIAD2 の mRNA 発現は、HUH6 と HepG2 の両方で DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) による処理によって増加することを以前に報告した (Honda et al, 2016)。5-Aza は DNA 鎖に組み込まれた後、メチルトランスフェラーゼに不可逆的に結合し、その活性を阻害することで、DNA の脱メチル化を加速させる。つまり、OCIAD2 の脱メチル化によって OCIAD2 の mRNA 発現が増加したのであるから、OCIAD2 のメチル化によって OCIAD2 の発現は抑制されていたと推測できた。同様に HCC 細胞株においても 5-Aza で処理すると、OCIAD2 の mRNA とタンパク質が有意に増加したと報告されている (Wu et al, 2017)。現在の技術では任意の遺伝子のメチル化および非メチル化状態を操作することができないため、我々は実際の臨床検体で、OCIAD2 のメチル化状態を解析し、メチル化状態に応じた OCIAD2 の mRNA、タンパク質の発現についてその関係性を解析した。

免疫組織化学染色ではメチル化群にあたる 7 検体においては全検体で OCIAD2 タンパク質が陰性であったものの、非メチル化群 14 検体中 5 検体でも OCIAD2 タンパク質が陰性であった。抽出 mRNA および抽出タンパク質における OCIAD2 の発現は、いずれもメチル化群で有意に低下していた。以上をまとめると、OCIAD2 のメチル化によって OCIAD2 の発現は mRNA およびタンパク質のいずれのレベルでも抑制されるといえる。本実験の制限としては、臨床検体の数が 21 検体と少ないことや、正常肝ではメチル化が 1 検体で腫瘍部では OCIAD2 陽性が 1 検体と検体のバランスの悪いことが挙げられる。よって、本結果は OCIAD2 のメチル化が OCIAD2 mRNA およびタンパク質の発現を抑制していることを示唆するものの直接の証明には至らず、OCIAD2 のメチル化と次項の機能解析の結果を結びつけることができないでいた。

The Cancer Genome Atlas (TCGA) を用いた報告では、371 の HCC 組織と 50 の隣接する正常肝組織から抽出した RNA シーケンスと DNA メチル化データを解析し、腫瘍組織では OCIAD2 のプロモーター領域が有意に高メチル化されており、OCIAD2 の mRNA 発現レベルは対応する隣接正常組織よりもはるかに低いこと述べられている (Wu et al, 2017)。また、小児肝芽腫と成人型 HCC の移行型を示す hepatocellular neoplasm, not otherwise specified (HCN-NOS) の発現プロファイルおよび DNA メチル化の網羅的研究

においても *OCIAD2* の異常メチル化そして *OCIAD2* の発現の低下が示された(Zhou et al, 2022)。これらの結果は、*OCIAD2* のメチル化が *OCIAD2* の発現を抑制するという今回の研究結果を支持するものであった。加えて注目すべき点は、肝芽腫、HCN-NOS、HCC いずれにおいても *OCIAD2* の異常メチル化がみられ（正常肝では *OCIAD2* は通常非メチル化状態である）、かつ *OCIAD2* の発現低下がみられる点であり、*OCIAD2* は肝芽腫のみならず小児から成人に至るまでの幅広い肝悪性腫瘍において重要な分子である可能性を示唆している。

RASSF1A は正常細胞に広く存在し、微小管に局在して細胞周期、アポトーシス、微小管の安定性などを制御している。そのプロモーター領域のメチル化によって不活化されると腫瘍発生に関わることから腫瘍抑制遺伝子として知られている（García-Gutiérrez, 2020）。早くから *RASSF1A* のメチル化は肺癌、乳癌、扁平上皮癌、胆管癌、大腸癌、胃癌、食道癌、グリオーマ、Ewing 肉腫、急性白血病、腎癌、卵巣癌、前立腺癌、神経芽腫、網膜芽腫、肝芽腫、Wilms 腫瘍といった年代も臓器も多種多様な悪性腫瘍で報告されている（Hesson LB et al, 2007）。*RASSF1A* および *OCIAD2* は異常メチル化が肝芽腫の予後不良因子となるが、それぞれのメチル化状態について双方の関係について解析を行った。FFPE より抽出した腫瘍部 DNA 13 検体について *OCIAD2* および *RASSF1A* のメチル化率を解析したところ、*OCIAD2* および *RASSF1A* の両方がメチル化しているものが 5 検体、両方が非メチル化のものが 6 検体あり、相関係数 0.57 の正の相関を認めた。腫瘍部 DNA の高メチル化傾向を反映している可能性が考えられた。

OCIAD2 のメチル化以外の発現調整

OCIAD2 のメチル化により *OCIAD2* の発現が抑制されるということが、*OCIAD2* のメチル化を認める検体では全例 *OCIAD2* の発現を認めなかったという本研究結果や、前述の他の研究結果により示されたが、一方で本研究では、*OCIAD2* のメチル化を伴わない *OCIAD2* の発現抑制例を認め、DNA のメチル化によらない発現調整経路の存在が示唆された。*OCIAD2* の pathway 解析から、TGF β シグナルにより *OCIAD2* が発現するといった TGF β 1-TGF β R1-SMAD2/3-SMAD4/AR-*OCIAD2* という経路が見出された(Zhang, 2014)。この研究では TGF β 1 処理により Hep-3B, Du-145 の細胞株で *OCIAD2* の上昇を認め、TGF β 1 受容体阻害剤でキャンセルされることが確認されている。一方、*OCIAD2* のプロモーター領域の配列から RFX5, CEBPG, SP4 などの転写因子が結合可能であると予想され、これらは発現の調節において重要な役割を果たしている可能性があると考えられている（Praveen et al, 2020）。

また、今回エピジェネティックな制御として DNA メチル化異常に焦点を当てたが、ヒストン修飾による制御の可能性も考えられる。*RASSF1A* においてはヒストン H3 の脱アセチル化が *RASSF1A* の発現低下をひき起こすことが報告されている（Strunnikova et al, 2005）。*OCIAD2* では直接ヒストン修飾を解析し、*OCIAD2* の発現変化を評価した

報告はないものの、ヒストンアセチル化に重要なタンパク質である HBO1 のノックアウト細胞株にてヒストン H3 の減少および OCIAD2 の著しい発現減少がみられたと報告されており (Chen et al, 2022) , OCIAD2 領域でのヒストン H3 脱アセチル化による OCIAD2 の発現低下の可能性が考えられる。OCIAD2 の発現制御の機序としてヒストン修飾の解析も重要であり今後の課題である。

OCIAD2 の機能解析

本研究では、OCIAD2 の強制発現により肝芽腫細胞である HepG2 および HUH6 は遊走能・浸潤能が抑制されることを示した。遠隔転移能のさらなる評価としては、免疫不全マウスへの移植実験などが挙げられ、今後の検討課題としていきたい。HCC 細胞株である Sk-hep1 においても、OCIAD2 の強制発現により遊走能と浸潤能が抑制されたと報告されている (Wu et al, 2017) 。このように肝臓由来の肝芽腫・肝細胞癌は、OCIAD2 は腫瘍抑制遺伝子として振舞う。一方で、胎児腎臓細胞株である HEK293 を用いた実験では、OCIAD2 の過剰発現が細胞増殖と遊走を促進したという我々の結果とは反対の報告がされた (Sinha et al, 2018) 。これらが事実だとすると、OCIAD2 の下流の経路は複数存在するというを示唆している。

OCIAD2 の下流経路

OCIAD2 の下流経路について 2 つの報告がある。OCIAD2 を HCC 細胞株でノックダウンすると、AKT と FAK が活性化されコロニー形成、遊走、浸潤が劇的に増加するが、その状態で AKT シグナルを阻害すると、OCIAD2 が介在していた HCC 細胞のクローン形成、遊走能および浸潤能の変化が回復した (Wu et al, 2017) というもので、OCIAD2 は AKT シグナルを抑制することが述べられている。本研究では肝芽腫細胞株において OCIAD2 の過剰発現は MMP2 の発現を抑制した。MMP2 は細胞外基質を分解し基底膜を介して浸潤するための、癌の進行の各段階で重要なタンパク質である (Noel et al, 1997) 。AKT 経路の活性化は HCC での MMP2 発現につながる (Wu et al, 2017) を踏まえると、肝芽腫細胞においても OCIAD2 は AKT 経路を抑制することで MMP2 の発現を低下させていることが推測できる。さらに HCC において Sonic hedgehog 経路は AKT 経路を経て MMP2 を増加させ、遊走・浸潤を促進するということも報告されており (Chen et al, 2013) , OCIAD2 は AKT 経路を抑制するため、この遊走・浸潤に寄与する Sonic hedgehog 経路を遮断できる可能性も考えられた。

一方で、胎児腎臓細胞株である HEK293 を用いた実験では、OCIAD2 の過剰発現が細胞増殖と遊走を促進したが、これは JAK / STAT3 シグナル伝達を介してのものであるとしている (Sinha et al, 2018) 。受容体複合体の活性化状態は組織や細胞によって異なるため、Smad 非依存的シグナル系である AKT 経路の TGF β シグナルへの応答はその細胞の種類および環境に固有の反応を示す (Zhang et al, 2009) といわれているよう

に、TGF β シグナルを受けた OCIAD2 の下流経路は臓器や癌種だけでなく正常組織か癌組織か、発生段階の胎児組織か成熟組織化などによって活性化状態が異なることが予想され、その結果異なる結果が生み出されたと考えられる。

実際の OCIAD2 の臨床像として、OCIAD2 が癌と関連して初めて言及されたのは、Bronchioloalveolar carcinoma (BAC)を含む肺混合型腺癌（現在の分類では lepidic predominant adenocarcinoma (LPA)に相当する）において OCIAD2 の高発現は予後良好であるという報告で、その中ではさらに OCIAD2 の発現がリンパ管浸潤、脈管浸潤、リンパ節転移と逆相関していた (Ishiyama, 2007) というものである。OCIAD2 のメチル化が肝芽腫において、予後不良因子となり、遠隔転移、肝静脈浸潤と有意に相関した (Honda et al, 2016) という我々の報告と、癌種が違うものの同様の臨床像を呈している点では、OCIAD2 はある特定の癌種にとって腫瘍抑制遺伝子としての機能を有していると考えられる。

発癌および癌の進展は癌遺伝子・癌抑制遺伝子といったドライバー遺伝子の変異・欠失・増幅・転座・メチル化異常などの異常が複数重積することによって引き起こされるといわれているが (Vogelstein et al, 2013) , 本研究の結果をふまえると OCIAD2 のメチル化も肝芽腫の発生・進展に関与していると考えられた。遊走浸潤に関わると考えられるため、遠隔転移リスクの予測や治療の補助としての利用が期待できる。

結論

1. *OCIAD2* の発現はエピジェネティックな機序で制御されており, *OCIAD2* のメチル化は *OCIAD2* の発現を mRNA・タンパク質の両レベルで抑制制御していると示唆された。
2. 肝芽腫細胞株において *OCIAD2* は遊走能・浸潤能を抑制する機能を有していると考えられた。
3. 肝芽腫細胞株において *OCIAD2* は *MMP2* の発現を抑制する可能性が示唆された。

上記から, *OCIAD2* のメチル化により遊走能や浸潤能の抑制が解除されることで, より悪性度が高くなると考えられ, *OCIAD2* のメチル化の有無が遠隔転移のリスク予測因子や予後予測因子となる理由となりうる。したがってメチル化解析よりも計測が簡便な *OCIAD2* のタンパク質発現解析によって予後や転移リスクの予測ができる可能性が考えられる。また *OCIAD2* は浸潤、遊走を抑制することから *OCIAD2* タンパク質を治療のターゲットとして活用できる可能性が考えられる。さらなる研究を進めることで, 肝芽腫の新しいバイオマーカーや治療薬の開発につながると考えられる。

謝辞

バイサルファイトパイロシーケンシングを実施していただきました札幌医科大学医学部分子生物学講座 鈴木拓教授、臨床検体や臨床データをご提供いただきました JPLT 研究参加施設の御担当医のみなさま、そして研究の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 I 武富紹信教授に深く感謝を申し上げます。また、本研究に関わる御助言、技術的御指導を賜りました北海道大学病院消化器外科 I 講師 本多昌平先生，深井原先生，相山健先生，また実験助手の小林希氏，三好早香氏をはじめ同教室の先生方や学術研究員の皆様に、厚く御礼を申し上げます。

バイサルファイトパイロシーケンスを使用したメチル化分析は，文部科学省の革新的分野に関する科学研究のための癌研究助成金の科学支援プログラムによってサポートいただきました。

利益相反

本研究に関して、著者に開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Blaker H, Hofmann WJ, Rieker RJ, Penzel R, Graf M, Otto HF, (1999). Beta-catenin accumulation and mutation of the CTNNB1 gene in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 25, 399-402.

Brown J, Perilongo G, Shafford E, Keeling J, et al. (2000). Pretreatment prognostic factors for children with hepatoblastoma- results from the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) study SIOPEL 1. *Eur. J. Cancer*. 36, 1418-1425.

Carrillo-Reixach J, Torrens L, Simon-Coma M, Royo L, et al. (2020). Epigenetic footprint enables molecular risk stratification of hepatoblastoma with clinical implications. *J. Hepatol*. 73, 328-341.

Chen JS, Huang XH, Wang Q, Huang JQ, et al. (2013). Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in liver cancer. *Carcinogenesis*. 34, 10-19.

Chen TF, Hao HF, Zhang Y, Chen XY, Zhao HS, Yang R, Li P, Qiu LX, Sang YH, Xu C, et al. (2022). HBO1 induces histone acetylation and is important for non-small cell lung cancer cell growth. *Int J Biol Sci*. 18, 3313-3323.

Chojnacka KJ, Elancheliyan P, Mussulini BHM, Mohanraj K, Callegari S, Gosk A, Banach T, Góral T, Szczepanowska K, Rehling P, et al. (2022). Ovarian carcinoma immunoreactive antigen-like protein 2 (OCIAD2) is a novel complex III-specific assembly factor in mitochondria. *Mol Biol Cell*. 33, Epub.

Dong R, Jia D, Xue P, Cui X, Li K, Zheng S, He X, and Dong, K. (2014). Genome-wide analysis of long noncoding RNA (lncRNA) expression in hepatoblastoma tissues. *PloS one*, 9, e85599.

García-Gutiérrez L, McKenna S, Kolch W, Matallanas D. (2020). RASSF1A Tumour Suppressor: Target the Network for Effective Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 12, 229.

Giardiello FM, Offerhaus GJA, Krush AJ, Booker SV, Tersmette AC, Mulder J-WR, Kelly CN, Hamilton AR. (1991). Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. *J. Pediatr.*, 119,

766-768

Han J, Jung S, Jang J, Kam TI, Choi H, Kim BJ, Nah J, Jo DG, Nakagawa T, Nishimura M, et al. (2014). OCIAD2 activates γ -secretase to enhance amyloid β production by interacting with nicastrin. *Cell Mol Life Sci.* 71, 2561-2576

Hata Y, (1990). The clinical features and prognosis of hepatoblastoma: follow-up studies done on pediatric tumors enrolled in the Japanese Pediatric Tumor Registry between 1971 and 1980. Part I. Committee of Malignant Tumors, Japanese Society of Pediatric Surgeons. *Jpn. J. Surg.* 20, 498-502

Hesson LB, Cooper WN, Latif F. (2007). The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers.* 23, 73-87.

Hishiki T, Matsunaga T, Sasaki F, Yano M, et al. (2011). Outcome of hepatoblastomas treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) protocol -2: report from the JPLT. *Pediatr. Surg. Int.* 27, 1-8.

Hiyama E. (2014). Pediatric hepatoblastoma: diagnosis and treatment. *Transl Pediatr.* 4, 293-299

Hiyama E, Hishiki T, Watanabe K, Ida K, Yano M, Oue T, Iehara T, Hoshino K, Koh K, Tanaka Y, et al. (2020). Outcome and late complications of hepatoblastomas treated using the Japanese study group for pediatric liver tumor 2 protocol. *J. Clin. Oncol.* 38, 2488-2498.

Honda S, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, Ohira M, Matsunaga T, Yamaoka H, Ohnuma N, Nakagawara A, et al. (2008a). The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int. J. Cancer.* 123, 1117-1125.

Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, Ohira M, Yamaoka H, Horie H, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, et al. (2008b). Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer.* 99, 1891-1899.

Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka, KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, et al. (2013). RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr. Surg. Int.* 29, 1147-1152.

Honda S, Minato M, Suzuki H, Fujiyoshi M, Miyagi H, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, et al. (2016). Clinical prognostic value of DNA methylation in hepatoblastoma: Four novel tumor suppressor candidates. *Cancer. Sci.* 107, 812-819.

Ishiyama T, Kano J, Anami Y, Iijima T, et al. (2007). OCIA domain containing 2 is highly expressed in adenocarcinoma mixed subtype with bronchioloalveolar carcinoma component and is associated with better prognosis. *Cancer. Sci.* 98, 50-57.

Jaenisch R and Bird A, (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33, 245–254.

Jeng YM, Wu MZ, Mao TL, Chang MH, Hsu HC, (2000). Somatic mutations of beta-catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma. *Cancer Lett.* 152, 45-51

Jia D, Dong R, Jing Y, Xu D, Wang Q, Chen L, Li Q, Huang Y, Zhang Y, Zhang Z, et al. (2014). Exome sequencing of hepatoblastoma reveals novel mutations and cancer genes in the Wnt pathway and ubiquitin ligase complex. *Hepatology* 60, 1686-1696.

Koch A, Denkhous D, Albert S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T, (1999). Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res.* 59, 269-273

Kondo T, Honda S, Suzuki H, Ito YM, Kawakita I, Okumura K, Ara M, Minato M, Hiyama E, Taketomi A, et al. (2020). A novel risk stratification model based on the Children's Hepatic Tumours International Collaboration-Hepatoblastoma Stratification and deoxyribonucleic acid methylation analysis for hepatoblastoma. *Eur J Cancer.* 172, 311-322.

Koufos A, Hansen MF, Copeland NG, Jenkins NA, Lampkin BC, Cavenee WK, (1985), Loss of heterozygosity in three embryonal tumours suggests a common pathogenetic mechanism. *Nature.* 316, 330-334

Kurahashi H, Takami K, Oue T, Kusafuka T, Okada A, Tawa A, Okada S, Nishisho I, (1995). Biallelic inactivation of the APC gene in hepatoblastoma. *Cancer Res.* 55, 5007-5011.

Le Vasseur M, Friedman J, Jost M, Xu J, Yamada J, Kampmann M, Horlbeck MA, Salemi MR,

Phinney BS, Weissman JS, et al, (2021). Genome-wide CRISPRi screening identifies OCIAD1 as a prohibitin client and regulatory determinant of mitochondrial Complex III assembly in human cells. *Elife*. 26, e67624.

Luo LY, Soosaipillai A, Diamandis EP, (2001). Molecular cloning of a novel human gene on chromosome 4p11 by immunoscreening of an ovarian carcinoma cDNA library. *Biochem Biophys Res Commun*. 280, 401-406.

Nagae G, Yamamoto S, Fujita M, Fujita T, Nonaka A, Umeda T, Fukuda S, Tatsuno K, Maejima K, Hayashi A, et al. (2021). Genetic and epigenetic basis of hepatoblastoma diversity. *Nat. Commun*. 20, 5423.

Noel A, Gilles C, Bajou K, Devy L, Kebers F, Lewalle JM, Maquoi E, Munaut C, Remacle A, Foidart JM. (1997). Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis*. 17, 221-239.

Plass C, Pfister S, Lindroth AM, Bogatyrova O, Claus R, Lichter P. (2013). Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. *Nat Rev Genet* 14, 765–780.

Praveen W, Sinha S, Batabyal R, Kamat K, Inamdar MS. (2020). The OCIAD protein family: comparative developmental biology and stem cell application. *Int J Dev Biol*. 64, 213-225.

Rainier S, Dobry CJ, Feinberg AP. (1995). Loss of imprinting in hepatoblastoma. *Cancer Res*. 55, 1836-1838.

Raggi C, Factor VM, Seo D, Holczbauer A, Gillen MC, Marquardt JU, Andersen JB, Durkin M and Thorgeirsson SS. (2014). Epigenetic reprogramming modulates malignant properties of human liver cancer. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 59, 2251–2262.

Rumbajan JM, Maeda T, Souzaki R, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S, Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima, H and Joh K. (2013). Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma. *BMC cancer*, 13, 608.

Sakashita M, Sasashita S, Murata Y, Shiba-Ishii A, Kim Y, Matsuoka R, Nokano N, Noguchi M, (2018). High expression of ovarian cancer immunoreactive antigen domain containing 2

(OCIAD2) is associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Pathol. Int.* 68, 596-604

Semi K, Matsuda Y, Ohnishi K, and Yamada Y. (2013). Cellular reprogramming and cancer development. *International journal of cancer*, 132, 1240–1248.

Shetty DK, Kalamkar KP, Inamdar MS. (2018). OCIAD1 Controls Electron Transport Chain Complex I Activity to Regulate Energy Metabolism in Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 11, 128-141.

Sinha S, Bheemsetty VA, Inamdar MS. (2018). A double helical motif in OCIAD2 is essential for its localization, interactions and STAT3 activation. *Sci Rep.* 8, 7362.

Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, et al. (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 16899-16933.

Strunnikova M, Schagdarsurengin U, Kehlen A, Garbe JC, Stampfer MR, Dammann R. (2005). Chromatin inactivation precedes de novo DNA methylation during the progressive epigenetic silencing of the RASSF1A promoter. *Mol Cell Biol.* 25, 3923-33.

Sumazin P, Chen Y, Trevino LR, Sarabia SF, Hampton OA, Patel K, Mistretta TA, Zorman B, Thompson P, Heczey A, et al. (2016). Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups. *Hepatology* 65, 104-121.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, et al. (2013). Cancer genome landscapes. *Cell.* 339, 1546-1558.

von Schweinitz D. (2012). Hepatoblastoma: recent developments in research and treatment. *Semin. Pediatr. Surg.* 21, 21-30.

Wu D, Yang X, Peng H, Guo D, et al. (2017). OCIAD2 suppressed tumor growth and invasion via AKT pathway in Hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 38, 910-919.

Zhang R, Zhao C, Xiong Z, Zhou X. (2014). Pathway bridge based multiobjective optimization approach for lurking pathway prediction. *Biomed. Res. Int. Epub.*

Zhang YE, (2009). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Research* 19, 128-139

Zhou S, Li M, Ostrow D, Ruble D, Mascarenhas L, Pawel B, Buckley JD, Triche TJ. (2022). Potential methylation-regulated genes and pathways in hepatocellular neoplasm, not otherwise specified. *Front Oncol*. Epub.

International mouse phenotyping consortium (IMPC).

[https://www.mousephenotype.org/ /data/genes/MGI:1916377](https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1916377) (OCIAD2),

<https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1915345> (OCIAD1)

Access date: 2024/01/28

The human protein atlas. <https://www.proteinatlas.org/search/OCIAD2>

Access date: 2024/01/28