創 薬

シリーズ(5)

トランスレーショナルリサーチ[®]

トランスレーショナルリサーチに向けた病理学的研究 — 消化管がんの新規診断マーカー・治療標的の同定

大上 直秀, 仙谷 和弘, 坂本 直也, 安井 弥

要約: がん細胞特異的に存在し、全身正常組織に存在しない分子は、分泌タンパク質であれば血清腫瘍マーカーとして、細胞表面タンパク質であれば治療の標的分子として期待される。著者らの研究室では、SAGE法・CAST法を用いて消化管がん、特に胃がんの特異性の高い遺伝子の探索を行っている。SAGE法から同定された胃がんの特異性の高い遺伝子は *REG4*, *OLFM4*, *MIA*, *MMP10*, *DKK4* 等で、*REG4* 遺伝子がコードする Reg IV, *OLFM4* 遺伝子がコードするオルファクトメジン 4 (olfactomedin 4) はいずれも分泌タンパク質であり、胃がん診断における高感度血清マーカーである。CAST法から同定された *DSC2* 遺伝子は細胞間接着分子デスモコリン 2 (desmocollin 2) をコードしており、腸型粘液形質を有する胃がんの細胞表面に発現していることから、診断マーカー・治療標的として有用である。

はじめに

がんは遺伝子発現異常の病気とも言われる。がん細胞特異的に存在し、全身正常組織に存在しない分子は、診断マーカー・治療の標的分子として有用である。さらに、分泌タンパク質であれば血清腫瘍マーカーとして、細胞表面タンパク質であれば治療の標的分子として期待される(1)。がん細胞特異的な分子の同定を目的とし、各種臓器のがん組織を対象に網羅的遺伝子発現解析が行われてきた。網羅的遺伝子発現解析の方法には様々なものがあるが、DNA マイクロアレイ(2)とSAGE法(serial analysis of gene expression 法)(3)が代表的な方法である。これらは、遺伝子発現という観点から解析を行う方法であり、がんの特異性の高い分子を同定できるが、同定した分子が必ずしも分泌タンパク質、細胞表面タンパク質であるわけではない。一方、タンパク質の局在という観点から解析する方法も開発されている。がん細胞の培養液あるいは細胞膜分画を材料に二次元電気泳動を行えば、分泌タンパク質

あるいは膜貫通タンパク質を網羅的に同定できる。しかし、タンパク質の構造は複雑であり、その同定が困難である場合が多い。CAST法(*Escherichia coli* ampicillin secretion trap 法)(4)はシグナルシーケンスを欠損させたアンピシリン耐性遺伝子である β -ラクタマーゼ遺伝子を組み込んだベクターに解析対象サンプルの cDNA を組み込み、シーケンスにより分泌タンパク質、膜貫通タンパク質を同定する方法である。

著者らの研究室では消化管がん、特に胃がんを材料にがん関連遺伝子の解析を行っており、SAGE法・CAST法を基盤にし、図1に示すストラテジーで胃がん関連遺伝子の解析を進めている(5)。本稿では、SAGE法・CAST法から同定された消化管がんの新規診断マーカー・治療標的について概説する。

1. SAGE 法による消化管がん特異的遺伝子の同定

1) SAGE 法の原理

SAGE法は、未知、既知に関わらず遺伝子発現を何万という単位で網羅的に調べることが可能な方法として、1995年に Velculescu らによって開発された(3)。その基本的な原理は(6)、mRNA の poly A テールから最も近い CATG から下流 10 塩基(これをタグと定義している)を PCR で増幅後、いくつも直列に連結し、クローニングベクターに組み込み、シーケンスしてタグの出現頻度と種類を解析するものである。タグの配列はわずか 10 塩基であるが、この配列は個々の遺伝子で特異性が高いことから、タグに対応する遺伝子を特定でき、さらに同じタグの個数を数えれば発現量が分かる。SAGE法の場合タグを連結してシーケンスを読むので、ESTなどの方法と比較し、効率が30倍以上よくなる。EST法では1万個の遺伝子発現を解析するのに1万クロンのシーケンスを行う必要があるが、SAGE法では330クロン程度で解析が可能となる。利点は未知遺伝子の解析も可能であること、定

キーワード: 胃がん, SAGE 法, CAST 法

広島大学 大学院 医歯薬学総合研究科 分子病理学研究室 (〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3)

E-mail: naoue@hiroshima-u.ac.jp 原稿受領日: 2010 年 11 月 8 日, 依頼原稿

Title: Identification of novel diagnostic and therapeutic targets of gastric cancer by SAGE and CAST analysis

Author: Naohide Oue, Kazuhiro Sentani, Naoya Sakamoto, Wataru Yasui

図1 当研究室における胃がん関連遺伝子同定の戦略

量性が高いことである。特に本法はがんにおいて発現が亢進している遺伝子の同定に優れており、新規診断マーカー・治療標的の探索に適している。欠点は多数のクローンをシークエンスにより解析しなければならないため、DNA マイクロアレイと比較し時間とコストがかかることである。近年、次世代シーケンサーの登場により、この欠点は克服されつつある。

2) 胃がんにおける SAGE 解析

胃がん組織を用いた SAGE 法による網羅的遺伝子発現解析は、著者らを含め 4 報が報告されている。著者らは、原発性の胃がん 4 例とそのリンパ節転移 1 例を材料に SAGE 法を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った(7)。合計で約 10 万クローンのシークエンスを行い、137,706 タグが得られ、38,903 種類の遺伝子を含んでいた。この SAGE データを相互に比較し、*CDH17* や *APOE* 等の多数の胃がん関連遺伝子を同定した。これらの結果は胃がん 4 例の解析結果であり、多数例での検証作業が必要である。そこで免疫染色を用いて多数例での発現解析を行い、検証作業を進めている。現在までに、*claudin-18*(8) や *Li-カドヘリン (Li-cadherin)* (9)、*PLUNC*(10) 等の胃がん関連遺伝子を報告している。

3) 胃がん特異的遺伝子の探索

正常臓器の SAGE データと胃がんの SAGE データを比較し、胃がん特異的に発現している遺伝子を探索した結果、*APIN*, *TRAG3*, *CYP2W1*, *MIA*, *MMP10*, *DKK4*, *OLFM4*, *REG4*, *HORMAD1* の 9 種類の遺伝子が、がん特異的遺伝子として同定された(11)。これらの分子は新規診断マーカー・治療標的として期待される。一方、胃がんの血清腫瘍マーカーとして、*CEA*, *CA19-9* が用いられているが感度は低く、胃がんの早期発見には不十分である。胃がんの新規血清腫瘍マーカーの開発の観点から、特に分泌タンパク質をコード

している *MIA*, *MMP10*, *DKK4*, *OLFM4*, *REG4* に注目した。

MIA, *MMP10*, *DKK4* に対しては利用可能な抗体があり、胃がん組織を材料に免疫染色を施行した結果(11)、いずれのタンパク質もがん細胞に染色され、陽性率はそれぞれ 31%, 45%, 1%であった。さらに *MIA*, *MMP10* 陽性例は有意に予後不良であった。胃がん患者の血清中の濃度を ELISA 法で測定すると、胃がん診断の感度は *MIA* では 6%と低く、臨床応用は困難であった。一方、*MMP10* の特異性は 85%とやや低かったものの、感度は 94%ときわめて高く、胃がんのスクリーニングに特に有用と考えられた。同一血清サンプルを材料に *CEA*, *CA19-9* も測定したが、感度はそれぞれ 10%程度と低かった。

REG4 遺伝子はもともと 2001 年に炎症性腸疾患で発現が亢進している遺伝子としてクローニングされたものであり、分泌タンパク質 *Reg IV* をコードしている。機能としては EGF 受容体 (epidermal growth factor receptor) をリン酸化し、Akt を介して転写因子 AP-1 を活性化し、その標的遺伝子であるサバイビン (survivin) や *MMP-7* の発現を誘導する。胃がん組織を材料に *Reg IV* の免疫染色を施行したところ(12)、30%の症例に染色された。*MUC2* 陽性の杯細胞様の腫瘍細胞およびクロモグラニン A が陽性となる神経内分泌細胞に分化する腫瘍細胞に染色され (図 2)、腸型粘液形質あるいは神経内分泌への分化に関与している。胃がん患者の血清中の濃度を ELISA 法で測定すると、胃がん診断の感度は 36%、特異性は 99%であり、感度が 10%程度であった *CEA*, *CA19-9* よりもはるかに高く、*Reg IV* は胃がん診断に適した血清マーカーである(13)。

印環細胞がんは腺がんの 1 つで、様々な臓器に発生するが、原発不明がんとして発見されることもめずら

しくない。胃原発の印環細胞がんにおいて Reg IV は 100% の症例で染色されたことから、消化管原発の印環細胞がんの同定に有用なマーカーになる可能性がある。そこで胃、大腸、肺、乳腺原発の印環細胞がんを材料に Reg IV の免疫染色を行ったところ、胃、大腸原発の印環細胞がんでは 100% の症例が陽性であったのに対し、肺、乳腺原発の印環細胞がんでは全く染色されなかった(14)。肺腺がんのマーカーである TTF-1 は、肺原発印環細胞がんの 89% に染色されたのに対し、他の印環細胞がんでは陰性であった。乳がんのマーカーであるマンマグロビン (mammaglobin), GCDFP15 は乳腺原発の印環細胞がんにおいてそれぞれ 100%, 90% の症例で染色されたが、他の印環細胞がんでは全く染色されなかった。以上から、原発不明の印環細胞がんにおいて、Reg IV, TTF-1, マンマグロビン, GCDFP15 の免疫染色は、原発巣同定に有用であることが分かった。

OLFM4 遺伝子の産物であるオルファクトメジン 4 (olfactomedin 4) に対する抗体は市販のものではなく、著者らの研究室でモノクローナル抗体を作成した。*OLFM4* は別名 *hGC-1*, *GW112* と呼ばれる遺伝子であり、もともと骨髄芽球からクローニングされたものである。機能としては、カドヘリンと結合し、細胞接着を制御することが報告されているが、詳細は不明である。一方、オルファクトメジン 4 はヒト腸の幹細胞のマーカーとして注目されている(15)。胃がん組織を材料にオルファクトメジン 4 の免疫染色を施行した結果(16)、56% の症例が陽性であり、高分化腺がんにおいて高頻度に染色された(図 2)。胃がん全症例については、オルファクトメジン 4 の発現と予後との間に有意な相関はなかったが、高分化腺がんに限って検討すると、オルファクトメジン 4 陽性例は有意に予後良好であった。胃がん患者の血清中の濃度を ELISA 法で測定すると、胃がん診断の感度は 31%, 特異性は 95% であった。なお、Reg IV とオルファクトメジン 4 を組み合わせて測定した場合、胃がん診断の感度は 57% まで上昇した。特にステージ I の胃がんでは、CEA と CA19-9 の組み合わせでは、感度は 7% であったが、Reg IV とオルファクトメジン 4 の組み合わせでは、感度

は 52% と半数以上が陽性になり、胃がんの早期発見に有用である。

4) 食道がんにおける SAGE 解析

上記のごとく、胃がんにおける SAGE 解析は当研究室を中心に行われているが、食道がんの SAGE 解析は進んでいない。そこで食道扁平上皮がんを材料に SAGE 法を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った(17)。合計で 14430 タグを同定し、正常食道の SAGE データと比較した結果、*ADAMTS16* 遺伝子が食道扁平上皮がんでは特に発現が亢進していた。全身正常組織と食道扁平上皮がんを材料に、*ADAMTS16* の発現をリアルタイム RT-PCR で測定した結果、*ADAMTS16* の発現は中枢神経、腎臓で認められたものの低かったのに対し、食道扁平上皮がんでは 40% の症例で高いレベルの発現を認め、食道扁平上皮がんの特異性が高いことが明らかになった。*ADAMTS16* は分泌タンパク質であり、食道がん細胞株 TE5 の培養液を材料にウェスタンブロット法 (Western blot) を行った結果、*ADAMTS16* タンパク質が検出され、分泌タンパク質であることが確認された。がんにおける *ADAMTS16* の機能は全く不明である。TE5 を材料に *ADAMTS16* の発現を siRNA でノックダウンした結果、細胞増殖能、浸潤能いずれもが抑制された。従って、*ADAMTS16* は食道がんの新規腫瘍マーカーになる可能性があり、さらに分子標的としても理想的と考えられる。

2. CAST 法を用いた細胞表面タンパク質の同定

1) CAST 法の原理

CAST 法は、分泌・膜貫通タンパク質を同定する方法として 2005 年に Ferguson らによって開発された(4)。CAST 法の概略を図 3 に示す(6)。まず、分泌に関与するシグナルシーケンスを欠損させたアンピシリン耐性遺伝子 (β -ラクタマーゼ遺伝子) を組み込んだベクター (pCAST vector) を準備する。次に欠損させたシグナルシーケンスの部分に解析対象サンプルの cDNA を組み込みライブラリーを作成する。これらが大腸菌に導入して、アンピシリン含有培地で培養する。ここで選択されてくる大腸菌はアンピシリン耐性株であり、 β -ラクタマーゼ遺伝子が分泌、あるいは大腸菌

図 2 胃がんにおける Reg IV, オルファクトメジン (olfactomedin) 4, デスモコリン (desmocollin) 2 の免疫染色像
Reg IV とオルファクトメジン 4 はがん細胞の細胞質に、デスモコリン 2 は細胞膜に染色されている。

図3 CAST法の概略図

の膜上に存在することを意味している。すなわち、pCASTに組込まれた遺伝子配列中に膜貫通ドメイン、あるいはシグナルシーケンスが存在することを示している。これらの陽性クローンからプラスミドDNAを抽出し、塩基配列を解析すれば、効率よく細胞表面・分泌タンパク質をコードする遺伝子を同定できる。

2) 胃がんにおけるCAST解析

著者らの研究室では、胃がん細胞株、胃がん組織を材料にCAST解析を行っている。胃がん細胞株MKN-1とMKN-28を材料にCAST解析を行った結果、様々な細胞表面・分泌タンパク質をコードする遺伝子が同定された(18)。膜タンパク質に焦点をあて、胃がん組織42例を材料にリアルタイムRT-PCR法で遺伝子発現を測定した結果、胃がんにおいて高発現している30種類の膜タンパク質を同定した。これらのうち、DSC2遺伝子は全身正常組織において発現が低く、胃がんにて特異性が高いことからさらに解析を行った。DSC2遺伝子は、膜貫通タンパク質デスモコリン2(desmocollin 2)をコードしており、細胞間接着装置であるデスモソームを構成しているタンパク質である。胃がん組織80例を材料にデスモコリン2の免疫染色を施行した結果、28%の症例が陽性であり、がん細胞の細胞膜に染色され、間質の細胞には染色されなかった(図2)。デスモコリン2は腸の転写因子CDX2により発現が誘導されることが知られており、胃型・腸型の粘液形質との関連を解析した結果、デスモコリン2陽性胃がんは腸型の粘液形質を有する胃がんが発現していることが明らかとなった。従って、デスモコリン2は腸型の粘液形質を有する胃がんのマーカー分子である。

デスモコリン2以外にも胃がんにおいて高発現している膜タンパク質を多数同定しており、現在免疫染色

で詳細な解析を進めている。

おわりに

以上、SAGE法・CAST法を用いた胃がんの新規診断・治療標的の探索について概説した。Reg IVとオルファクトメジン4を組み合わせた血清解析で、ステージIの胃がん患者の半数以上が陽性になるが、スクリーニング目的のためには80%以上の感度が必要であり、組み合わせる分子をさらに追加する必要がある。胃がん治療において、分子標的は現在HER2のみであるが、HER2の遺伝子増幅率は10~30%であり、すべての胃がんの治療標的になるわけではない。CAST法を用いて胃がんの細胞表面タンパク質を網羅的に同定し、治療標的としての有用性を検討すると共に、臨床応用を視野に入れ、免疫染色可能な抗体を検討あるいは作成し、免疫染色像を解析することが重要である。

文 献

- 1) Yasui W, et al. Cancer Sci. 2004;95:385-392.
- 2) Lockhart DJ, et al. Nat Biotechnol. 1996;14:1675-1680.
- 3) Velculescu VE, et al. Science. 1995;270:484-487.
- 4) Ferguson DA, et al. Cancer Res. 2005;65:8209-8217.
- 5) Yasui W, et al. Pathol Int. 2009;59:121-136.
- 6) 大上直秀, 他. 胃がんperspective. 2009;2:92-97.
- 7) Oue N, et al. Cancer Res. 2004;64:2397-2405.
- 8) Sanada Y, et al. J Pathol. 2006;208:633-642.
- 9) Ito R, et al. Virchows Arch. 2005;447:717-722.
- 10) Sentani K, et al. Mod Pathol. 2008;21:464-475.
- 11) Aung PP, et al. Oncogene. 2006;25:2546-2557.
- 12) Oue N, et al. J Pathol. 2005;207:185-198.
- 13) Mitani Y, et al. Oncogene. 2007;26:4383-4393.
- 14) Sentani K, et al. Am J Surg Pathol. 2008;32:1182-1189.
- 15) van der Flier LG, et al. Gastroenterology. 2009;137:15-17.
- 16) Oue N, et al. Int J Cancer. 2009;125:2383-2392.
- 17) Sakamoto N, et al. Cancer Sci. 2010;101:1038-1044.
- 18) Anami K, et al. J Pathol. 2010;221:275-284.