

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861926

研究課題名(和文) TGF 関連細胞外分泌タンパク質を応用した新規扁平上皮癌マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of the new squamous cell carcinoma marker that applied TGFbeta-associated extracellular secretion protein

研究代表者

萩原 純孝 (Hagiwara, Sumitaka)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40547551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：基礎実験として、FLAG標識型CD109高発現細胞を移植したヌードマウスの血中CD109(FLAG標識型CD109)濃度をウェスタンブロットング法およびELISAを用いて測定した。その結果、移植細胞の腫瘍サイズに相関して血中CD109濃度が上昇することが確認された。CD109を発現する悪性腫瘍においてはそれが新たな診断マーカーとなりうる可能性が示唆された。

次に、口腔癌患者および口腔前癌病変患者から提供いただいた血液検体を用いて、血中CD109濃度を測定し臨床像との関連性を検討した。その結果、腫瘍進展にともない血中CD109濃度が低下する傾向を認め、腫瘍マウスモデルの結果とは相反した。

研究成果の概要(英文)：In xenografted BALB/c-nu/nu mice that were subcutaneously injected the FLAG-tagged CD109 overexpressing cells, CD109 secreted from inoculated tumors was detected in sera, using western blotting and CD109 ELISA. Concentrations of tumor-secreted CD109 increased proportionally as tumors enlarged. These results indicate that CD109 is present in serum as a soluble form, and suggest its potential as a novel tumor marker in patients with cancers that express CD109. In clinical experiment, concentration of CD109 in sera that were from oral cancer patients including precancerous lesion was measured using CD109 ELISA. The result did not reflect the tumor size dependent manner that was shown in xenografted mice.

研究分野：口腔外科学

キーワード：CD109 口腔扁平上皮癌 血液腫瘍マーカー TGF シグナル

1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまでの研究で、ヒト口腔・食道・肺・子宮頸部の扁平上皮癌 (SCC) において CD109 という GPI アンカー型糖タンパク質が特異的に高発現することを明らかにした。CD109 は、もともとわれわれのグループの研究で、多発性内分泌腫瘍症 (MEN) 2B 型変異を有する RET 癌原遺伝子の下流で発現誘導される遺伝子として同定され、癌精巢抗原としてのキャラクターをもつタンパク質であることを報告した経緯がある。また過去には、造血系幹細胞の垂型の血球細胞や血小板での発現が報告されている。

以前本研究代表者が行った基礎研究にて、CD109 は癌の発生初期においては癌抑制的にはたらくとされる TGF-beta/Smad シグナルを不に制御することで細胞増殖活性を上昇させている可能性が示唆された。さらに培養細胞を使用した実験では、1445 アミノ酸からなる CD109 が細胞内で分子量約 155kDa のタンパク質として生合成され、さらに 205kDa の糖タンパク質として糖鎖修飾をうける過程でタンパク分解酵素 Furin の作用を受けて第 1270 ~ 1273 アミノ酸サイトで 180kDa と 25kDa のフラグメントに切断され、細胞膜上へリクルートされたのちに 180kDa のものが培養上清中へ分泌されることも明らかにして報告した。

一方、臨床検体を使用した研究として口腔扁平上皮癌 (OSCC) の切除標本より薄切組織切片を作成し、ある種の抗 CD109 ポリクローナル抗体を用いて免疫組織学的に評価したところ、CD109 は SCC 組織の中でも高分化型を呈する組織でより高発現する結果であった。同様に、舌 SCC 切除標本に限定して免疫染色を行い悪性度の指標とされる Ki-67 との発現相関を検討した結果、CD109 と Ki-67 との発現に正の相関を認め悪性腫瘍における CD109 の発現意義を報告した。

2. 研究の目的

近年、悪性腫瘍の診断において腫瘍マーカーを応用することにより癌を早期発見する試みがなされ、またその手法も多様化している。OSCC は、解剖学的に視診・触診が比較的容易に行える「口腔」という部位に発生する悪性腫瘍であるにもかかわらず、進行期となってから診断に至るケースが多い。それは多覚的には発見が容易であったとしても、罹患者本人の自覚症状に乏しいものや口腔の解剖学的形態の複雑さゆえにセルフチェックが難しいなどの理由があると思われる。

OSCC はその進行スピードが様々ではあるものの、ほとんどの発癌過程で白板症をはじめとする前癌病変の病態を介するとされ、定期的な口腔検診による要注意粘膜病変のフォローアップや、罹患初期にあらゆる診断

技術を応用することにより早期発見することが十分に可能と思われる。

しかし口腔領域の前癌病変やごく初期の SCC (上皮内癌等) においては、SCC であるか否かの診断基準が診断医の経験に頼るところが大きいのが現状で、時に臨床医と病理医の見解が合致しないこともある。そこで研究代表者は、初期 OSCC の早期発見に寄与すべく新たな診断補助マーカーを探求する目的で、以前報告した *in vitro* において細胞外へ分泌される CD109 (分泌型 CD109) の存在に着目した。分泌型 CD109 は生体では血液をはじめとする体液中に分泌されている可能性があるとの仮説を立てて、血液中の CD109 を定量化し新規 SCC マーカーとして有用か否かを検討することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 培養上清中の CD109 の定量

予備実験として、使用予定であるヒト CD109-ELISA キットが分泌型 CD109 を適切に同定可能か、293 細胞に FLAG 標識型ヒト CD109 を遺伝子導入した高発現細胞を樹立し、それらの培養上清を用いて検証した。

複数の CD109 安定発現株を選択し、ウェスタンブロット法にてその発現量を定性的に確認したうえで、培養期間を変えたものおよび培養上清濃度を濃縮法にて変化させたものを調整し定量 (濃度測定) が可能であるか検討した。

(2) CD109 トランスジェニックマウスにおける血中 CD109 の定性

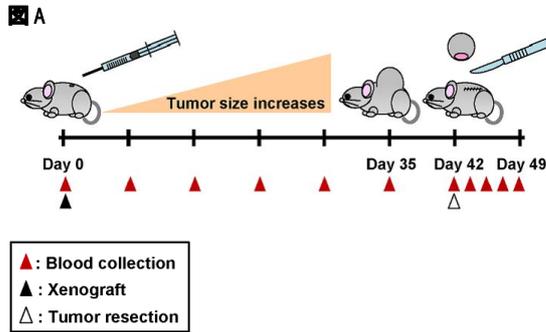
以前われわれの研究グループで作成した FLAG 標識型マウス CD109 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (TG) より採血を行い、血清を分離し検体とした。コントロールとして同種野生型マウス (WT) の血液を使用した。

各々 3 個体から採取した検体を用い、抗 FLAG (ラビットポリクローナル) 抗体によるウェスタンブロット法にて血中 CD109 の存在を確認することを試みた。

(3) 腫瘍移植マウスモデルにおける血中 CD109 濃度の測定

(1) にも使用した FLAG 標識型ヒト CD109 高発現細胞をヌードマウスの背部皮下へ移植し腫瘍モデルを作成、それらのマウスより腫瘍発育の過程で週一回定期的に採血した。血清を凍結保存し検体とした。コントロールとして、同種マウスに CD109 無発現細胞を移植したもの (VC) の血液を使用した。

ヌードマウス血中 CD109 濃度をヒト CD109-ELISA キットを用いて測定した。腫瘍移植後 35 日で腫瘍塊を摘出し、摘出後の血中濃度も経時的に評価した (図 A)。



(4) OSCC および前癌病変患者の血中 CD109 濃度の測定

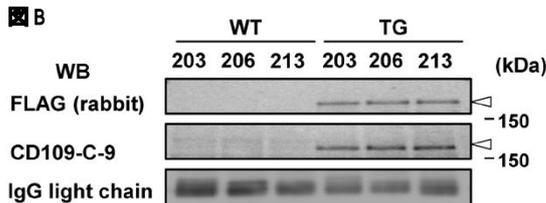
臨床研究として当院生命倫理審査委員会の承認のもと、当科を受診した OSCC 患者および白板症などの口腔前癌病変や扁平苔癬などの粘膜病変（非 OSCC）患者から提供いただいた血液検体を用いて、基礎実験と同様にヒト CD109-ELISA キットを用いて血中 CD109 濃度を測定し、臨床情報と各群における CD109 平均値の関連性を検討した。

検体は、当院口腔外科を受診した上記疾患患者を対象に、研究に対するインフォームドコンセントを行ったうえで当科初診時もしくは術前検査のスクリーニングとして採血検査を行う際に採取し、血清を分離し凍結保存したものを使用した。

4. 研究成果

(1) 培養期間が長期になるにつれてウェスタンブロットにおけるヒト CD109 の発現量は増加し細胞数に相関して培養上清中の濃度も上昇することが確認された。また培養上清の濃縮率に相関して CD109 濃度の定量値も増加し、分泌型 CD109 はヒト CD109-ELISA キットを使用した定量が可能であることを確認した。

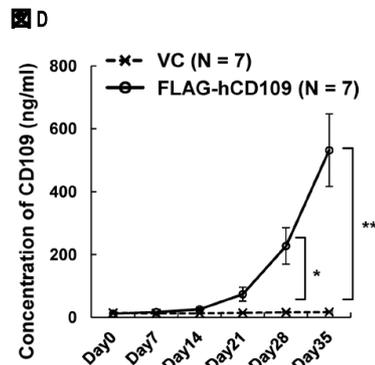
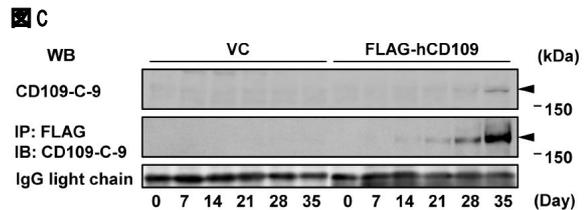
(2) FLAG 標識型マウス CD109 を発現するトランスジェニックマウスすべての検体中に、抗 FLAG 抗体で認識されるマウス CD109 が確認され、トランスジェニックマウスにおいて CD109 は血液中に存在していることが確認された（図 B）。



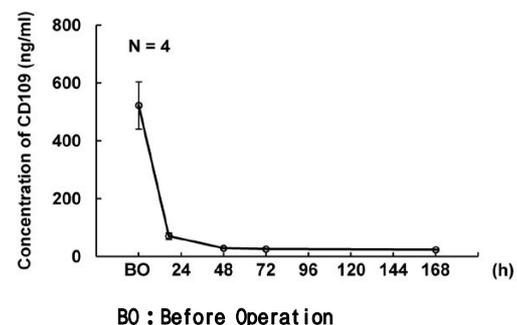
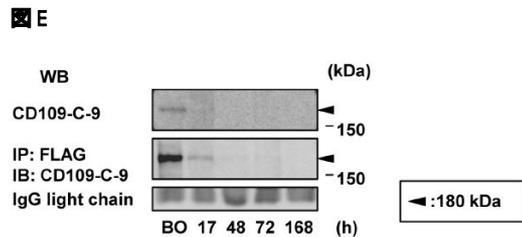
(3) 腫瘍移植マウスモデルでは FLAG 標識型ヒト CD109 発現細胞株の腫瘍塊発育に相

関して、移植後 21 日時点より血中の CD109（FLAG 標識型ヒト CD109）濃度が上昇することがウェスタンブロット法、ELISA 法ともに確認された（図 C,D）。また、形成した腫瘍塊を摘出しその後の血中 CD109 濃度を測定したところ、腫瘍由来 CD109 濃度は速やかに減少し 48 時間後にはほぼ消失した（図 E）。これらの結果より、*in vivo* においても腫瘍から血中に分泌されたヒト CD109 は ELISA 法により同定が可能であり、ヒトの体内においても扁平上皮癌組織にて CD109 が産生・分泌されているのであれば、臨床診断の場においても新たな血液腫瘍マーカーとなり得る可能性が示唆された。

= 腫瘍移植後 =



= 腫瘍摘出後 =



(4) 約 40 例の臨床検体を用いて血中 CD109 濃度を測定した結果、性別や年齢においては CD109 濃度の平均値に差は認めなかった。OSCC 群(30 例)対非 OSCC 群で血中 CD109 値を比較したところ、OSCC 群で低値であった。さらに OSCC 群のみに限定して検討した結果、T 分類および病期分類(Stage)において血中 CD109 値との間に負の相関を認めしたが、リンパ節転移の有無では血中 CD109 値に有意な差は認めず、腫瘍サイズに依存して血中 CD109 値は低下していた。また、5 年生存群対非生存群で血中 CD109 値を比較したところ 5 年非生存群で低値であり、初診時の段階で進行癌である症例をはじめ腫瘍の進展にともない血中 CD109 値は低下する傾向にあった。初期 OSCC(Tis および Stage)の群と非 OSCC 群においても血中 CD109 値を比較したが有意な差は認めなかった。

これらの結果は、腫瘍増大にともない血中 CD109 濃度が上昇するというマウスで得られた結果とは相反するものであった。ヒト OSCC 組織内での CD109 発現状態に差があることや、生体における内因性 CD109 との相互作用などの影響があると思われた。また現時点では初期 OSCC と非 OSCC 病変の鑑別には血中 CD109 が有用な診断マーカーの候補とは明言しがたい結果であり、各個体における組織内での CD109 発現と血中 CD109 濃度との相関性の検討が必要であるなど、今後のわれわれの検討課題と考える。

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 2 件)

CD109 attenuates TGF-beta1 signaling and enhances EGF signaling in SK-MG-1 human glioblastoma cells.

Jing-Min Zhang, Yoshiki Murakumo, Sumitaka Hagiwara, Ping Jiang, Shinji Mii, Emir Kalyoncu, Shoji Saito, Chikage Suzuki, Yasutaka Sakurai, Yoshiko Numata, Toshimichi Yamamoto, Masahide Takahashi.

Biochemical and Biophysical Research Communications: 459 (2015) 252-258

Doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.093

査読 ; 有

Detection of a soluble form of CD109 in serum of CD109 transgenic and tumor xenografted mice.

Hiroki Sakakura, Yoshiki Murakumo, Shinji Mii, Sumitaka Hagiwara, Takuya Kato, Masato Asai, Akiyoshi Hoshino, Noriyuki Yamamoto, Sayaka Sobue, Masatoshi Ichihara, Minoru Ueda,

Masahide Takahashi.

Plos One: Vol9-Issue1(2014)-e83385

Dio: 10.1371/journal.pone.0083385

査読 ; 有

〔学会発表〕(計 3 件)

「浸潤型病変と非浸潤型病変が隣接して発生した舌扁平上皮癌の一例」

萩原純孝、山本憲幸、西川雅也、古江浩樹、玉利正之、日比英晴、上田 実。

第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会。

2014 年 10 月 17~19 日

(幕張メッセ、千葉県千葉市)

「Exosome 構成タンパク質としての CD109」

坂倉寛紀、萩原純孝、山本憲幸、古江浩樹、長嶺健二郎、西川雅也、日比英晴、高橋雅英、上田 実。

第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会。

2013 年 10 月 11~13 日

(マリンメッセ福岡、福岡県福岡市)

「CD109 は培養細胞においてその培養上清中の Exosome 上に発現する」

坂倉寛紀、村雲芳樹、三井伸二、萩原純孝、山本憲幸、上田 実、高橋雅英。

第 72 回日本癌学会

2013 年 10 月 3~5 日

(パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

萩原 純孝 (HAGIWARA SUMITAKA)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 40547551

(2)研究分担者

なし