

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17015042

研究課題名（和文） 消化器がん個性診断法の開発

研究課題名（英文） Development of individualized diagnosis for cancer of digestive organ

研究代表者

坂元 亨宇 (SAKAMOTO MICHIE)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40221270

研究成果の概要（和文）：

Cyclase-associated protein (CAP) 2 が、肝細胞がんの多段階発がん過程の早期がんの段階から悪性化に伴って発現亢進することを見出した。同ホモログ CAP1 が膵がんを高率に過剰発現していること、細胞運動・浸潤に関わり予後不良因子となることを示した。免疫不全マウスにてヒト膵がん神経浸潤モデルを作成し、高神経浸潤群と低浸潤群間の遺伝子発現プロファイルを比較し、CD74 が神経浸潤に関与することを初めて示した。プロテオーム解析ならびに機能解析から、Synuclein- が膵がん神経浸潤ならびに転移に関与すること、独立した予後不良因子であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

We found that cyclase-associated protein 2 (CAP2) is up-regulated in early HCC and is further up-regulated in progressed HCC. Another homologue CAP1 was overexpressed in pancreatic cancer and was involved in cancer cell motility and poor prognosis. We established a novel perineural invasion model and distinguished high- and low- perineural invasion group in pancreatic cancer. Gene expression analysis revealed CD74 as a possible molecule involved in perineural invasion. Proteomic analysis revealed synuclein- is closely involved in perineural invasion and distant metastasis and is a prognostic factor in pancreatic cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	13,200,000	0	13,200,000
2006 年度	13,400,000	0	13,400,000
2007 年度	13,400,000	0	13,400,000
2008 年度	13,400,000	0	13,400,000
2009 年度	13,300,000	0	13,300,000
総計	66,700,000	0	66,700,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：多段階発がん、早期肝細胞がん、浸潤性膵管がん、神経浸潤、移植モデル、遺伝子発現プロファイル、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝細胞がんの多くは肝炎ウイルスの持続感染による慢性障害肝を背景に生じるが、我が国における HCV キャリアは 150 ~ 200 万にも及び、HCV からの発がんのリスクは極めて高い (肝硬変では年 5 % 程度)。これまでの解析から、肝細胞がんの多くは、血管新生を伴わない早期肝細胞がん、その脱分化過程に相当する結節内結節型の肝細胞がん、そして転移能を有する進行肝細胞がんへと多段階的に発生・進展することが示されてきた。肝細胞がんの初期像に関しては我が国がリードして解明が進められてきたが、早期肝細胞がんの診断に有用な客観的な分子マーカーの開発が望まれている。さらに、肝細胞がん症例の多くが、背景に障害肝を有していることは、がんに対する治療選択を難しくしており、悪性化、転移の指標が明らかになれば、最適な治療法の選択が可能となることが期待される。また肝細胞がんは、肝外への転移に比して肝内に高率に転移する性格を有しているが、実際の転移様式に対応したモデルを用いた検討は我々以外にはほとんどなされておらず、この研究により、臨床にも応用可能な分子が同定されることが期待される。

(2) 膵管がんは日本におけるがん死亡原因の第五位に位置し、最も予後不良な悪性腫瘍の一つである。これは、膵の解剖学的位置に加えて、膵がん自体が高い悪性度を有し、早期より浸潤・転移をきたすことや、早期発見が困難であることが原因と考えられている。また、膵管がん組織を用いた解析は、量的かつ質的にも困難な点が多い。そのような中で本研究では、多数の膵管がん細胞株に加えて切除された膵管がん組織を直接移植して、実際のがんをよく模倣する同所性移植モデルを既に確立しており、この系を用いることにより、がんで発現している遺伝子、蛋白、あるいはシグナル伝達の変化を広く解析することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、消化器がんの中でも難治ながん

として一層の対策が求められている肝細胞がんと膵管がんを主な対象として、その個性診断法の開発を目指す。(1) では早期肝細胞がんのマーカー、脱分化のメカニズム、そして肝内転移の分子機構を一層明らかにし、早期診断、悪性度の評価、予後の予測に基づく適切な治療法の選択や、新たな治療法の実現を行う。(2) では膵がんの浸潤・転移機構の解明と早期に発見できる新しい診断法の実現を進める。以上の目的を達成するために、切除組織、培養細胞株ならびに免疫不全マウスを用いた同所性移植モデルを用いて、遺伝子発現解析、生化学的解析、細胞生物学的解析を総合的に行う事で、実際の診断、予知あるいは標的治療への応用をも可能とすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞がんの多段階発がん過程における遺伝子・蛋白の発現解析

慢性障害肝を背景に、腺腫様過形成、早期肝細胞がん、結節内結節型肝細胞がん、そして進行肝細胞がんへと多段階的に発生増悪することが、臨床病理学的検討から明らかになってきた。本研究では特に、発がん初期の遺伝子・蛋白発現解析、脱分化および肝内転移に関わる分子群の同定を行い、肝多段階発がんの分子機構を解明する。

多段階発がん過程に対応する手術材料を用いて、Gene chip にて解析を行い、発がん初期に発現の変化する遺伝子群、脱分化および肝内転移に関わる遺伝子群を同定する。二次元電気泳動、LC-MS によるプロテオーム解析も併せて行い、両者のデータを比較しながら解析を進める。

上記解析で得られた遺伝子・分子群につき、RT-PCR, in situ hybridization, 免疫染色を行い、発現の局在、病変部における発現の意義を更に検討する。また遺伝子導入、RNAi 等を用い、in vivo での機能解析を行う。

既に確立している、肝細胞がん肝内転移モデルを用いて、新たに同定された分子の造腫瘍性・浸潤性・転移性への影響を解析すると

共に、インヒビター等を用いた治療の可能性につき検討する。

(2) 膵管がん神経浸潤モデル・肝転移モデルの開発と応用

現在最も難治ながんである膵管がんを対象に、その悪性度を規定すると考えられる神経浸潤ならびに肝転移のモデルを、免疫不全マウスを用いて作成する。同様のモデルの報告は全くなされておらず、膵管がんの病態解明にきわめて有用なモデルとなることが期待される。膵管がんは、臨床検体からのサンプルの採取も困難であることから、このモデルを用いて、遺伝子・蛋白の発現解析を行う。

後腹膜神経叢を NOD/SCID ないし NOG マウスの皮下に移植し、生着後同部に膵管がん細胞株を注入することで、神経周囲浸潤モデルを作成する。膵管がん細胞株の中で、神経周囲浸潤能を有する株と有さない株の比較を行うことで、浸潤能に関与する分子、細胞生物学的特性を明らかにする。

膵がん組織を直接免疫不全マウスの膵臓(同所)に移植し、肝転移モデルを作成する。肝転移能を有する腫瘍と有さない腫瘍の間で、網羅的遺伝子・蛋白発現解析を行い、肝転移に関与する分子群を同定し、1)と同様に解析する。

(3) 病理・病態関連分子の、診断・治療への有用性の検討

上記解析で同定された分子群の病態への関与、臨床的有用性を検討するために、臨床材料を用いたレトロスペクティブ・プロスペクティブな大規模検討、動物モデルを用いた前臨床試験を行う。

病理標本における分子の発現を、免疫組織化学、in situ hybridization にて検討し、臨床病理像との比較検討を行う。

腫瘍マーカーの候補分子に関しては、血清、尿中などにおける量を測定し、病像との比較を行う。

治療への応用の可能性を、同所性移植モデルを用いて検討する。特異的阻害剤、抗体等による造腫瘍性、浸潤・転移性への影響、副作用の有無を検討する。

4. 研究成果

(1) 肝多段階発がんモデルに相当する7症例の結節内結節型の症例の DNA マイクロア

レイ解析を行い、早期肝細胞がんで過剰発現する遺伝子としてリストアップされた Cyclase-associated protein 2 (CAP2)の解析を行った。定量 RT-PCR にてがんの進行に伴い発現の上昇を認めた。さらに特異的ポリクローナル抗体を作成し、蛋白発現解析を行った結果、肝細胞がん細胞株と肝細胞がん組織に明瞭な発現を認め、一方、非腫瘍部にはわずかな発現のみであった。肝細胞がん72例(早期型:29, 結節内結節型:10, 進行がん:33)、腺腫様過形成7例、および背景肝組織の免疫組織化学的検討では、非腫瘍部、腺腫様過形成ではほとんど発現は認められずがんの進行に伴い強い陽性所見を認め、CAP2 は肝細胞がん多段階発がんに関連した分子であることが明らかとなった。さらに、CAP2 に対する免疫沈降にてCAP2とアクチンが相互作用すること、siRNA にて発現を抑制すると浸潤性が抑えられることが示された。

(2) 膵がんは未だに早期診断が困難であり、また早期から高い浸潤性を示す。膵がん同所移植腫瘍の DNA マイクロアレイ解析から、CAP1 の高率な過剰発現と細胞運動能・浸潤性への関与を始めて見出し報告したが、その臨床的な意義を解析した。検討した73例の全てで陽性を示したが、各症例において正常膵管よりも強いCAP1染色性を示すがん細胞の割合は平均で78.5%であり、陽性率75%を境にCAP1高発現群と低発現群とに分類した。CAP1高発現はリンパ節転移($P = 0.015$)および神経周囲浸潤($P = 0.005$)さらには5年生存率($P = 0.021$, log-rank test)との間に有意な相関関係が見られた。これらのことから、CAP1の過剰発現は、膵がんの浸潤・転移能と予後不良に関連すると考えられた。

(3) 膵がんの悪性度を規定すると考えられる神経(周囲)浸潤(PNI)モデルを作成して、神経浸潤機構の解明と新しい診断法の開発を行った。後腹膜神経組織を皮下に移植し、同部に7種類の膵がん細胞株を移植して、PNIモデル作成を行った。ヒト-PNIモデルでは、7種類の膵がん細胞株のうち4種類でヒト移植神経への臨床例と同様な神経浸潤を認め、細胞株でも神経浸潤する性質が保たれていることが確認された。しかし、このモデルでは定量的な評価が困難であったため、

マウス - PNI モデルで定量的な評価を行った。2種類の膵がん細胞株はそれぞれ 11 例中 6 例、13 例中 9 例にマウスの皮下神経に神経浸潤が見られた。しかし 3 種類の膵がん細胞株では神経浸潤は見られなかった。次に両群間の発現プロファイル解析を行い高 PNI 株で高発現している 37 個の遺伝子と低発現している 12 個の遺伝子を特定した。そのうち腫瘍 神経の相互作用から膜蛋白と思われる Invariant Chain (CD74)について検討した。Real-Time RT-PCR では有意差をもって高 PNI 群で CD74 は高発現していた。Western Blot 法、免疫細胞染色法でも同様の結果であり、CD74 は細胞質だけでなく細胞膜にも発現が見られた。膵がん切除標本での免疫組織学的解析では、標本上のリンパ球を陽性コントロールとし、10%以上のがん細胞で陽性に認められた場合に CD74 陽性とした。正常の膵管上皮細胞では発現は見られなかった。高 PNI 症例では低分化の腫瘍細胞でも高発現が見られ、また神経浸潤している腫瘍細胞も高発現していた。各臨床病理学的因子を検討すると、神経浸潤に有意差をもって相関した ($P < 0.008$)。以上、ヒト膵がん細胞株を用いてはじめて膵がん神経浸潤モデルが作製できた。今後 CD74 の神経浸潤への機能的関与を明らかにしていくと共に、このモデルを用いることで、神経浸潤機構の一層の解明が進むものと期待される。

(4) 上記の系を用いて、LC-MS/MS による proteomics 解析および transcriptomics 解析で高 PNI 群と低 PNI 群を比較すると、synuclein- γ のみがいずれの解析においても高発現していた。Synuclein- γ 発現の臨床病理学的意義を調べるため、当科で 1995-2004 年に切除を行った浸潤性膵管がん 62 例を retrospective に解析した。62 例のうち 38 例 (61%) が synuclein- γ 陽性、22 例 (39%) が陰性であった。また Stage I 症例の 33% に synuclein- γ の発現を認めた。カイ 2 乗検定では PNI、腫瘍径 20mm、リンパ節転移陽性、UICC ステージ IIB、血管侵襲が synuclein- γ 発現と有意に相関した ($P < 0.05$)。Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析では synuclein- γ 過剰発現のみが生存期間の独立した予後不良因子(ハザード比 3.4[95%

信頼区間 1.51-7.51], $P=0.003$)であった。無再発生存期間については synuclein- γ 陽性、リンパ節転移陽性、UICC ステージ IIB、リンパ管/血管侵襲、神経周囲浸潤が単変量解析で有意に予後不良であり、多変量解析では synuclein- γ 発現が最も強く無再発生存期間の短縮に独立して寄与していた(ハザード比 2.8[95%信頼区間 1.26-6.02], $P=0.011$)。またマウス PNI モデルおよびマウス膵同所移植モデルを用いて short hairpin RNA による synuclein- γ の knockdown の影響を調べた。マウス PNI モデルでは、Control 群の 82% と比し PNI の頻度が knockdown 群では 25% ($P=0.009$) と有意に減少していた。マウス膵移植モデルでは Control 群と比し、knockdown 群でリンパ節および肝臓への転移が有意に減少(それぞれ $P=0.019$, $P=0.020$) した。以上より、膵がんにおいて synuclein- γ 発現が PNI および遠隔転移と密接に関連し、強い予後不良因子であることが初めて示された。Synuclein- γ は膵がんの早期診断マーカー、新たな予後規定因子ならびに転移抑制のための分子標的となりうる可能性が示唆された。

(5) さらに、PNI における SNCG の役割を解明するために、tetracycline-inducible SNCG 発現細胞を樹立した。SNCG を過剰発現による、細胞増殖・運動への影響を検討したが、SNCG 発現による有意な変化は見られなかった。SNCG の転移・浸潤への関与は、*in vivo* 解析によるものであることを考えると、SNCG が細胞に何らかの影響を与えるためには、細胞外マトリックスや増殖因子をはじめとする微小環境の必要性が示唆される。一方、膵癌神経周囲浸潤における分子機序の *in vitro* の系による解明に関しては、膵癌組織において、膵癌細胞が Schwann 細胞と相互作用していると考え、高 PNI 株 Capan-1、低 PNI 株 AsPC-1 とマウス Schwann 細胞株 SW10 の 3 つの細胞株を用いた非接触培養 (transwell) の系より検討を進めている。マウス Schwann 細胞液性因子が膵癌細胞の運動能に与える影響を migration assay より評価したところ、Capan-1 では運動能の低下、AsPC-1 では運動能の亢進が見られた。また、このときの transwell 中の Capan-1 を観察し

たところ、SW10 存在下において、高分化で接着性の増した形態を示していた。これらの結果から、膵癌神経周囲浸潤のメカニズムとして、Schwann 細胞によって分泌される液性因子が、浸潤中の膵癌細胞を神経周囲に留まりやすくし、さらに、その場で分化させる方向へ導いている可能性が示唆された。

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] 全て査読あり(全27件)

1. Effendi K, Mori T, Komuta M, Masugi Y, Du W, Sakamoto M. Bmi-1 gene is upregulated in early-stage hepatocellular carcinoma and correlates with ATP-binding cassette transporter B1 (ABCB1) expression. *Cancer Sci*, 2010 in press.
2. Tanese K, Fukuma M, Ishiko A, Sakamoto M. Endothelin-2 is upregulated in basal cell carcinoma under control of Hedgehog signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:486-491.
3. Yamazaki K, Takamura M, Masugi Y, Mori T, Du W, Hibi T, Hiraoka N, Ohta T, Ohki M, Hirohashi S, Sakamoto M. Adenylate cyclase-associated protein 1 overexpressed in pancreatic cancers is involved in cancer cell motility. *Lab Invest*. 2009;89(4):425-432.
4. Douguchi J, Hashiguchi A, Sakamoto M. Construction of human monoclonal single-chain Fv antibodies against small-cell lung cancer by phage display libraries derived from cell-immunized SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes. *Proteomics Clin Appl*, 2009;3:1265-1272.
5. Hibi T, Mori T, Fukuma M, Yamazaki K, Hashiguchi A, Yamada T, Tanabe M, Aiura K, Kawakami T, Ogiwara A, Kosuge T, Kitajima M, Kitagawa Y, Sakamoto M. Synuclein-gamma is closely involved in perineural invasion and distant metastasis in mouse models and is a novel prognostic factor in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 2009;15(8):2864-2871.
6. Tanese K, Fukuma M, Yamada T, Mori T, Yoshikawa T, Watanabe W, Ishiko A, Amagai M, Nihsikawa T, Sakamoto M: G-Protein-Coupled Receptor GPR49 is Up-regulated in Basal Cell Carcinoma and Promotes Cell Proliferation and Tumor Formation. *Am J Pathol*, 2008; 173: 835-843.
7. Kamiya K, Hayashi Y, Douguchi J, Hashiguchi A, Yamada T, Izumi Y, Watanabe M, Kawamura M, Horinouchi H, Shimada N, Kobayashi K, Sakamoto M: Histopathological features and prognostic significance of the micropapillary pattern in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 2008 21: 992-1001.
8. Hanada S, Maeshima A, Matsuno Y, Ohta T, Ohki M, Yoshida T, Hayashi Y, Yoshizawa Y, Hirohashi S, Sakamoto M: Expression Profile of Early Lung Adenocarcinoma: Identification of MRP3 as a Molecular Marker for Early Progression. *J Pathol*, 2008; 216: 75-82.
9. Kuwabara Y, Yamada T, Yamazaki K, Du W, Banno K, Aoki D, Sakamoto M: Establishment of an ovarian metastasis model and possible involvement of E-cadherin down-regulation in the metastasis. *Cancer Sci*, 2008; 99: 1933-1939.
10. Higashiguchi A, Yamada T, Susumu N, Mori T, Suzuki A, Aoki D, Sakamoto M: Specific Expression of Hepatocyte Nuclear Factor-1 β in the Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma and its Application to Cytological Diagnosis. *Cancer Sci* 98: 387-391, 2007
11. Koide N, Yamada T, Shibata R, Mori T, Fukuma M, Yamazaki K, Aiura K, Shimazu M, Hirohashi S, Nimura Y, Sakamoto M: Establishment of Perineural Invasion Models and Analysis of Gene Expression Revealed an Invariant Chain (CD74) as a Possible Molecule involved in

- Perineural Invasion in Pancreatic Cancer. Clin Cancer Res 12(8):2419-2426, 2006
12. Shibata R, Mori T, Du W, Chuma M, Gotoh M, Shimazu M, Ueda M, Hirohashi S, Sakamoto M: Overexpression of cyclase-associated protein 2 in multistage hepatocarcinogenesis. Clin Cancer Res 12(18):5363-5368, 2006
13. Nakanishi K, Sakamoto M, Yamasaki S, Todo S, Hirohashi S: Akt Phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Cancer 103:307-312, 2005
14. Oikawa T, Ojima H, Yamasaki S, Takayama T, Hirohashi S, Sakamoto M. Multistep and multicentric development of hepatocellular carcinoma: histological analysis of 980 resected nodules. J Hepatol 42: 225-229, 2005

研究者番号 : 40221270

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称 : 血中の CAP2 の測定方法、肝臓疾患の
検出方法及び血中 CAP2 測定用検出キット

発明者 : 坂元亨宇、他 2 名

権利者 : 坂元亨宇、他 2 名

種類 : 特許

番号 : 特願 2009-060966、2009

出願年月日 : 2009 年 3 月 13 日

国内外の別 : 国内

名称 : Hedgehog シグナル活性調節剤、細胞
増殖調節剤及びその使用方法。

発明者 : 坂元亨宇、他 2 名

権利者 : 坂元亨宇、他 2 名

種類 : 特許

番号 : 特願 2006-317576、2006

出願年月日 : 2006 年 11 月 24 日

国内外の別 : 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂元 亨宇 (SAKAMOTO MICHIE)

慶應義塾大学・医学部・教授