

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590635

研究課題名（和文） 胚性幹細胞複製分子を用いた新たな肺癌診断マーカーの開発

研究課題名（英文） Development of novel diagnostic marker targeting embryonic stem cell replication factors in lung cancers

研究代表者 小林 大介
(KOBAYASHI DAISUKE)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：50295359

研究成果の概要（和文）：本研究では、胚性幹細胞（ES 細胞）の再生/自己複製に必須の分子群に着目し、肺癌特異性の高い腫瘍マーカーを開発することを目的とした。候補分子の機能解析では、Nanog および SALL4 の遺伝子発現の減少は著明な癌細胞の増殖抑制を引き起こした。特に SALL4 siRNA 導入細胞は G1 期と S 期早期における細胞周期の停止を介し、最終的に分裂能を失って大型化した。非癌肺組織と比べた際の肺癌組織における Nanog および SALL4 の発現量はそれぞれ 1,000 倍、50 倍高まっており、stage IA から高発現していた。また、Nanog および SALL4 遺伝子の診断能を ROC 解析で調べたところ、感度 80%（特異度 93%）および感度 85%（特異度 93%）と優れた診断能を有していた。以上の結果から、幹細胞複製分子、特に SALL4 が肺癌細胞の増殖に極めて重要であり、早期肺癌の補助診断マーカーとして有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, by targeting the molecules essential in the reproducibility and/or self-replication of embryonic stem cells (ESC), we aimed to develop lung-specific tumor markers. Transduction of siRNAs against Nanog and SALL4 resulted in remarkable growth inhibition. SALL4 inhibition in cancer cells triggered proliferation catastrophe via cell cycle arrest at G1 and early S-phase, leading size enlargement without cell division. In clinical samples, Nanog and SALL4 expression in cancerous part revealed to 1,000- and 50-fold increase, and this alteration of the expression was found already at stage IA. ROC analysis of Nanog and SALL4 gene resulted in the sensitivity of 80% (specificity of 93%) and the sensitivity of 85% (specificity of 93%). These findings suggested that ESC-replication factor, especially SALL4, plays an crucial role in the proliferation of lung cancer cells and could be applicable as the markers to support the diagnosis of lung cancers even at early clinical stages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：腫瘍検査学

1. 研究開始当初の背景

近年、癌で重要な役割を果たす増殖因子、抗アポトーシス分子や浸潤・転移促進因子に

関する解析が飛躍的に進んだ。それに伴い、異なる機能を持つ複数のマーカーを組み合わせることで個々の癌の性状が把握可能に

なり、治療法の選択や予後予測に威力を発揮しつつある。一方、癌の存在診断においては、臓器特異的に高発現し、かつ早期に検出可能な腫瘍マーカーが理想的であるが、前立腺癌におけるPSAを除くと、これまでそのようなマーカーはみつかっていなかった。

申請者らは、survivinやOLFM4などの抗アポトーシス分子やチロシンキナーゼSTYK1の発現が各種癌で高まっており、癌細胞の増殖に極めて重要な役割を担っていることを見出してきた。興味深いことに、いずれの分子も癌における発現亢進に臓器特異性はみられなかったものの、非癌部での発現レベルは肺で最も低かった。この結果は、肺では消化器系の臓器や乳腺に比べ、生理的な再生能が最も低いことを反映していると考えられた。このことは、再生（自己複製）に関わる分子を用いると、肺癌をさらに感度良く特異的に診断できる可能性を意味している。

ES細胞と癌細胞は、異常を来たすシグナル伝達経路に共通点が多い。最近、ES細胞の複製に関わる分子群が同定され、なかでもNanogおよびSALL4が、増殖能の亢進と脱分化能の維持、すなわちES細胞の自己複製に必須であることが明らかになった。これらの分子を標的にすれば、脱分化したまま続けられる無秩序な増殖、すなわち癌化した細胞の本質である「自己複製能の亢進」を捉えることができる可能性が高い。以上の背景を基に、ES細胞複製分子を用いることで、非再生性臓器である肺由来の癌を早期から、特異的に検出できると考えられた。

2. 研究の目的

(1) まず、候補マーカーの分子機能を解析するため、各種癌細胞におけるES細胞複製分子の発現をsiRNAで抑制し、増殖、アポトーシスや細胞周期に及ぼす影響および分化誘導能を調べ、機能を既報の分子群と比較検討した。

(2) 次に、各種臓器（肺 vs 乳腺、胃、大腸）由来の癌組織における発現を解析し、陽性率を正常組織におけるそれと比較し、臓器特異的診断能について検討した。さらに、個々の症例における発現量と各種臨床背景因子との関係を調べ、早期から高発現する分子の同定を目的とした。さらに、早期発現分子のmRNAを用いた血中診断系の確立を試みた。以上を基盤として、ES細胞複製分子を用

いた肺癌の特異的かつ早期診断マーカーの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) NanogおよびSALL4に対するsiRNAを肺癌細胞に導入し、細胞増殖の変化をトリパンブルー染色およびMTTアッセイで経時的に調べた。

(2) siRNA導入がアポトーシスへ及ぼす影響は、形態およびAnnexin V/propidium iodide (PI)染色で経時的に解析した。細胞周期については、細胞をPI染色後、DNA histogramをフローサイトメーターで検討した。すなわち、siRNA導入細胞で特定の細胞周期停止やsub G1 populationすなわちアポトーシス細胞の増加、あるいは不可逆的な細胞老化が起きるか否かを調べた。

(3) さらに、siRNAを追加導入し、遺伝子発現を抑えたまま長期間（約2週間程度）培養後、形態変化を追跡し、分化誘導がどの程度みられるか解析した。

(4) 各種臓器（肺 vs 乳腺、胃、大腸）由来の癌組織における各複製分子のmRNA発現量をTaqMan RT-PCR法で調べ、非癌組織のそれと比較検討した。非癌組織における発現量からカットオフ値を設定し、癌組織における陽性率を臓器別に調べた。ROC解析にはStatflex version 5.0を用い、発現量と臨床背景因子（年齢、性、組織型、TNM因子）との関係はエクセルアドインソフトStatcelで解析した。また、血中診断系を確立するため、血清よりtotal RNAを抽出し、18S rRNAを含む各種分子の遺伝子発現の検出を試みた。

4. 研究成果

癌細胞における胚性幹細胞複製分子の役割

(1) 癌細胞におけるNanogの発現意義を検討するため、肺小細胞癌由来SBC-1細胞にNanog siRNAを導入したところ、導入2日目にはnon-silencing control RNA導入細胞に比べ、約60%の増殖抑制がみられた。また、細胞周期について調べたところ、特異的な停止は観察されなかった。また、分化の程度についてsiRNAを追加導入し経過を追跡したが、増殖抑制効果が全面に出たため、分化誘導の程度については観察不能であった。

(2) 同様にSBC-1細胞にSALL4 siRNAを導入し、発現意義を検討した。導入24時間目までは変化がみられなかったが、48時間およ

び72時間目に74%および94%の増殖抑制が観察された。この間 non-silencing control RNA (NSC) 導入細胞には明らかな変化はみられなかった (図1)。

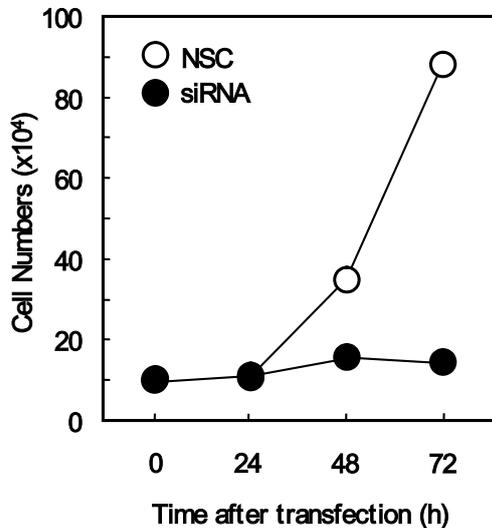


図1 SALL4 siRNA 導入 SBC-1 細胞における増殖抑制効果

一方、siRNA を導入した場合、48時間目にはG1期細胞の増加(38.8→67.8%)とS期細胞の減少(27.6→9.4%)がみられた。すなわち、G1期とS期の早い段階で細胞周期停止が停止していることが明らかとなった(図2)。また、siRNA 導入細胞ではFS(横軸)とSS(縦軸)で表される細胞の形態にも右上方へのシフトが確認され(図2)、顕微鏡下で確認された細胞容積の著明な増大と一致していた。

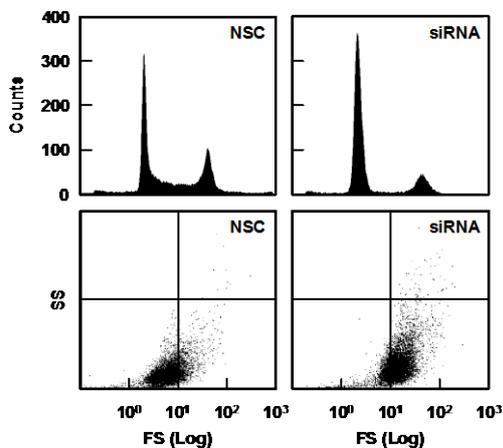


図2 : SALL4 siRNA 導入細胞における細胞周期の変化(48時間目)

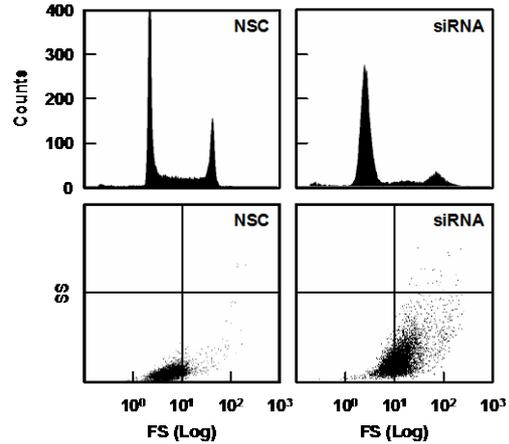


図3 : SALL4 siRNA 導入細胞における細胞周期の変化(72時間目)

尚、いずれの細胞においても sub-G1 期の細胞数に変動はみられなかった。さらに、72時間目には、NSC 導入細胞の増殖は顕著になり、細胞密度の増加による小型化と鋭い G2/M ピークが観察された。一方、siRNA 導入細胞ではG1期の増加(48.5→66.3%)とS期の減少(25.2→14.5%)が48時間目と同様に確認され、G2/M期細胞の減少も、より明らかとなった(図3)。すなわち、G1期およびS期早期での細胞周期の停止が続いていることが明らかとなった。また、48時間目にみられた細胞パラメータの右上方へのシフトはより顕著となり、細胞分裂がほぼ完全に停止していることが示唆された(図3)。

癌における胚性幹細胞複製分子の発現様式

(1) 各種癌における Nanog の発現量を解析した結果、胃、大腸および乳腺では、非癌組織と癌組織との間に mRNA 発現量の差異はなかった。一方、肺の非癌および癌組織における平均発現量(mean±SD)は、 0.02 ± 0.08 (n=15) vs 94.71 ± 620.78 (n=46) と、癌組織で有意 ($p < 0.0001$) に高かった。非癌組織における平均発現量+2SD をカットオフ値とした場合の陽性率は、76.1% (35/46) であった。Nanog の診断能を ROC 解析で調べたところ、感度 80.4%、特異度 93.3%であった。臨床病期別に陽性率をみると、stage IA で 68.4% (13/19)、stage IB で 84.6% (11/13)、stage II-IV で 77.8% (7/9) と、比較的早期から高発現していた。

(2) ①癌および非癌組織における SALL4 mRNA の平均発現量は乳癌で 0.083 ± 0.101 (n=51) vs 0.013 ± 0.011 (n=40)、肺癌で 5.46 ± 12.77 (n=47) vs 0.11 ± 0.237 (n=14) と、癌組織で有意に高値を示した ($p < 0.001$)。非癌組織における平均発現量+2SD をカットオフ値とした場合の乳癌および肺癌の陽性率は、それぞれ 74.5% (38/51)、80.9% (38/47) であった (肺癌のプロットを図 4 に示す)。

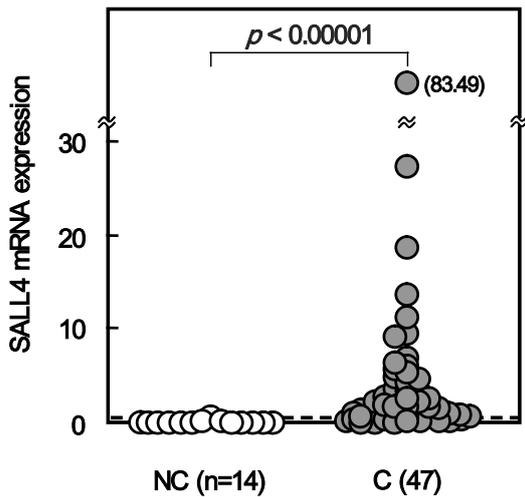


図 4 非癌および肺癌組織における SALL4 発現量の分布 (縦軸は 18S rRNA の発現量に対する SALL4 mRNA の発現量を表す)

②SALL4 の診断能を ROC 解析で調べたところ、乳癌で感度 80.4%、特異度 80.0%、肺癌では感度 85.1%、特異度 92.9% であった (肺癌の解析結果を図 5 に示す)。

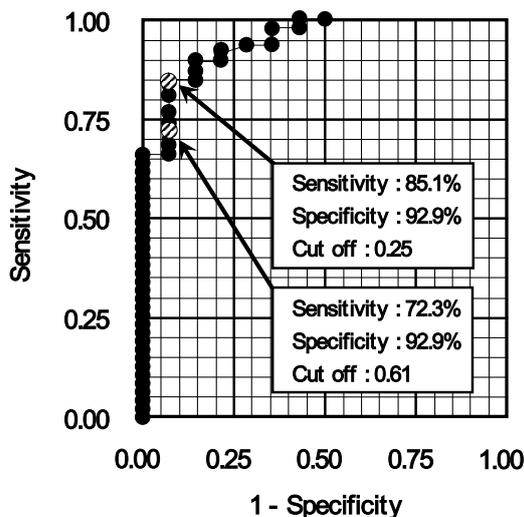


図 5 SALL4 の肺癌診断能

③臨床病期別にみた SALL4 mRNA の平均発現量は、乳癌で 0.074 ± 0.109 (stage I-IIA) vs 0.089 ± 0.089 (stage IIB-IV)、肺癌では 6.44 ± 18.79 (stage IA) vs 4.05 ± 4.56 (stage IB-IV) と、早期から高発現していた。

以上の結果から、SALL4 に限れば乳癌でも補助診断マーカーとしての候補となり得るが、Nanog の解析結果を併せ一般化すると、幹細胞複製分子は肺癌における早期診断能がより優れていることが示唆された。尚、血中の mRNA を用いた診断系については、内部標準として用いる 18S rRNA の定量は検討した全サンプルで可能であった。血中での標的分子の検出については、検出感度 (陽性率) が低く、当初想定していた系は現在のところ確立できていない。

総括

以上の結果から、Nanog や SALL4 などの幹細胞複製分子は癌細胞の増殖に極めて重要な役割を担っており、肺癌で早期から高発現していることが初めて明らかになった。診断ツールとして用いる場合、現時点では、組織や細胞が必用なため、材料は生検や気管支鏡洗浄液などで得られた試料に限られる。また、良性腫瘍性病変における値の分布評価や測定値とアウトカムとの相関評価は今後の課題であるが、現状でも補助診断法としての有用性は想定可能である。すなわち、病理診断がグレーゾーンの場合に手術・経過観察を含めた治療方針決定に用いるなど、病理診断を補助できる診断マーカーがない肺癌では、新たな検査診断法の候補として期待できると考えられる。また、検診への応用を考えた場合、RT-PCR 法や Immuno-PCR 法による血中・喀痰中 mRNA および微量蛋白の検出も理論的には可能である。現在効率の良い増幅系および検出系の高感度化を模索中である。

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 7 件)

- ① Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, Watanabe N. SALL4 is essential for cancer cell proliferation and is overexpressed at early clinical

stages in breast cancer. Int J Oncol 38: 933-939, 2011. (査読有)

- ② Kobayashi D, Kuribayashi K, Tanaka M, Watanabe N. Overexpression of SALL4 in lung cancer and its importance in cell proliferation. Oncology Report 26: 965-970, 2011. (査読有)
- ③ Tanabe H, Kuribayashi K, Tsuji N, Tanaka M, Kobayashi D, Watanabe N. Sesamin induces autophagy in colon cancer cells by reducing tyrosine phosphorylation of EphA1 and EphB2. Int J Oncol 33: 33-40, 2011. (査読有)
- ④ Onoda C, Kuribayashi K, Nirasawa S, Tsuji N, Tanaka M, Kobayashi D, Watanabe N. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in gastric cancer cell lines by down-regulating survivin expression. Int J Oncol 38: 1403-1408, 2011. (査読有)
- ⑤ Goto M, Kuribayashi K, Umemori Y, Ohe Y, Asanuma K, Tanaka M, Kobayashi D, Watanabe N. High prevalence of human anti-mouse antibodies in the serum of colorectal cancer patients. Anticancer Res 30: 4353-4356, 2010. (査読有)
- ⑥ Moriai R, Tsuji N, Moriai M, Kobayashi D, Watanabe N. Survivin plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat 117: 261-271, 2009. (査読有)
- ⑦ Saeki M, Kobayashi D, Tsuji N, Kuribayashi K, Watanabe N. Diagnostic importance of overexpression of Bmi-1 mRNA in early breast cancers. Int J Oncol 35: 511-515, 2009. (査読有)

[学会発表] (計5件)

- ① 小林大介, 渡邊直樹. 肺癌におけるES細胞複製分子 SALL4 発現の意義. 第23回日本バイオセラピー学会総会, 2010年12月10日, 大阪.
- ② 栗林景晶, 大江由衣, 梅森祥央, 浅沼康一, 佐藤和昭, 田中真樹, 小林大介, 渡

邊直樹. 腫瘍マーカーとしてのジアセチルスペルミンとジアセチルスペルミジンの評価. 第57回日本臨床検査医学会学術集会, 2010年9月10日, 東京.

- ③ 渡邊直樹. シンポジウム「予防医学と臨床検査-分担-がん検診における腫瘍マーカーの位置づけ」. 第50回日本臨床化学会年次学術集会, 2010年9月24日, 甲府.
- ④ 小林大介, 渡邊直樹. シンポジウム「臨床化学の若い力で発信しつつある新たな検査、病態解析法-分担-幹細胞自己複製分子を標的とした癌診断」. 第49回日本臨床化学会年次学術集会, 2009年9月19日, 長崎.
- ⑤ 栗林景晶, 小林大介, 田中真樹, 渡邊直樹. ワークショップ「定量遺伝子検査の精度保証と標準化へのキックオフ-分担-固形癌におけるmRNAの定量とその問題点」. 第49回日本臨床化学会年次学術集会, 2009年9月19日, 長崎.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 大介 (KOBAYASHI DAISUKE)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50295359

(2) 研究分担者

栗林 景晶 (KURIBAYASHI KAGEAKI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50381257

渡邊 直樹 (WATANABE NAOKI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10158644