

学 位 論 文 題 名

Dickkopf-1 as a Novel Serologic and Prognostic Biomarker for Lung and Esophageal Carcinomas

(肺癌、食道癌の新規血清・予後バイオマーカー Dickkopf-1)

学位論文内容の要旨

【緒言】

肺癌は本邦における癌死の第1位を占めており、あらゆる集学的治療に対して難治性で、予後不良の疾患である。また、食道癌も消化器悪性腫瘍の中で最も悪性度の高い癌種のひとつであり、ほとんどが進行癌として発見されている。肺癌の腫瘍マーカーとしてProGRP, NSE, CYFRA21-1, SCC, CEA などが、また食道癌の腫瘍マーカーとしてSCC, CEA, CYFRA21-1 などが臨床応用されているが、早期診断に有用なものは未だ皆無であり、個別化治療に応用できるものも限られている。そこで肺癌、食道癌の新規診断バイオマーカー、分子標的治療薬開発を目的として本研究を行った。新規分子標的抽出のため、我々は27,648遺伝子をカバーするcDNAマイクロアレイを利用して肺癌、食道癌の網羅的遺伝子発現情報解析を行い、肺癌及び食道癌組織において高頻度に高いレベルで発現している遺伝子を抽出した。さらに、siRNAをもちいた遺伝子発現阻害実験や、細胞増殖、浸潤能に関する実験とともに約600症例の肺癌、食道癌組織マイクロアレイをもちいた免疫組織学的検討を行うことにより、新規診断マーカー、治療薬開発へ向けた標的遺伝子抽出のためのhigh-throughput screeningを行った。その結果、正常臓器組織では胎盤、前立腺においてのみ発現し、癌発生に重要な働きをしていると考えられるDickkopf-1(DKK1)を同定した。

DKK1は脊椎動物の頭部形成に重要な働きをしており、大腸癌においてはWnt signalのnegative regulatorとして知られている。しかしながら、DKK1の活性化が癌細胞の進展に関わるような知見や、癌の診断、治療への応用などを検討した報告は無い。そこで今回我々は、DKK1分子の肺癌、食道癌の早期診断、予後バイオマーカーとしての有用性とその治療への応用の可能性について検討した。

【対象と方法】

肺癌、食道癌組織試料: 北海道大学病院腫瘍外科およびその関連病院においてインフォームドコンセントの得られた非小細胞肺癌患者 279 症例から切除された癌組織とそれぞれの症例に対応した非癌部組織、また恵佑会札幌病院において食道癌患者 280 症例から切除された癌組織とそれぞれの症例に対応した非癌部組織を対象として、免疫組織学的検討を行った。同様にインフォームドコンセントの得られた肺癌、食道癌患者由来の試料を用いて total RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR を行った。

血清試料: 207 症例の健常者血清及び 88 症例の慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者血清は広島大学病院分子内科とバイオバンクジャパンより提供された。肺癌患者血清 265 症例 (腺癌 112 症例、扁平上皮癌 68 症例、小細胞癌 85 症例) は広島大学病院分子内科、神奈川県立がんセンター、バイオバンクジャパンより提供された。また、81 症例の食道癌患者血清は恵佑会札幌病院、バイオバンクジャパンより提供された。すべての血清試料につきインフォームドコンセントと各施設の倫理委員会での承認を取得済みである。

免疫組織学的検討: 抗体は市販の anti DKK1 ウサギポリクローナル抗体(Santa Cruz)をもちいた。肺癌、食道癌組織アレイの判定は3名の臨床情報未知の医師の判定により行い、生存分析では StatView statistical

program (SaS)により log rank test を用いて p value 0.05 以下を有意差ありと判定した。

ELISA: 血清 DKK1 値の測定は独自に構築したサンドイッチ ELISA により施行した。固相化抗体として anti DKK1 ウサギポリクローナル抗体を、検出抗体としてビオチン化した anti DKK1 ウサギポリクローナル抗体を用いた。血清 CEA および ProGRP の測定は市販のキット(CEA ELISA kit, HOPE Laboratories; ProGRP ELISA kit, TFB) を用いた。

【結果】

マイクロアレイデータより解析候補分子として抽出した DKK1 は正常肺、正常食道で全く発現を認めず、癌組織において mRNA 及び蛋白レベルで強く発現している分子であることが肺癌、食道癌臨床検体をもついた半定量的 RT-PCR、Western blotting により示された。Multiple tissue northern 法により、この分子は正常臓器においては胎盤、前立腺においてのみ発現していた。

約 600 症例の非小細胞肺癌、食道癌組織マイクロアレイによる免疫組織化学的検討では、DKK1 は非小細胞肺癌、食道癌組織において高頻度に発現しており、さらにこの蛋白を強く発現する症例の予後は有意に不良であることが示された。また、DKK1 は非小細胞肺癌において独立予後因子であることが明らかとなった。

DKK1 を哺乳類細胞に強制発現させると Matrigel invasion assay により浸潤能の亢進が認められたことから、この蛋白が癌細胞の悪性化に重要な役割を果たしていることが考えられた。

我々の構築した ELISA を用いて癌患者血清中の DKK 値を測定したところ非小細胞肺癌患者の 70% (126/180)、小細胞肺癌患者の 69.4% (59/85)、食道癌患者の 63% (51/81) を検出可能であり、一方疑陽性率は 4.8% (10/207)であった。また、既存の腫瘍マーカーである CEA と組み合わせることにより、非小細胞肺癌患者血清において陽性率 82.2%、疑陽性率 7.7%の検出感度が得られた。さらに ProGRP と組み合わせることにより小細胞肺癌患者血清において陽性率 89.4%、疑陽性率 6.3%の検出感度が得られた。

【考察】

近年の治療技術の進歩（手術成績の向上、アジュヴァント療法など）にも関わらず、肺癌・食道癌は悪性腫瘍の中でも予後の悪い疾患であることが知られている。したがって、早期診断や個別化治療に応用可能なバイオマーカーの開発が急務となっている。

我々は新規診断マーカー、新規分子標的治療薬開発を目的として、網羅的遺伝子・蛋白発現情報解析により、癌特異的に発現上昇を認め、正常臓器では胎盤、前立腺にのみ発現を認める分泌蛋白 DKK1 を同定した。本研究では、さらに肺癌、食道癌の組織マイクロアレイと High throughput ELISA system を用いて DKK1 が肺癌・食道癌の有用な診断、予後マーカーであることを明らかにした。

DKK family には、DKK1 のほかに DKK2, DKK3, DKK4 が知られており、ともに 2つの cystein-rich domain を有している。DKK1 は大腸癌において Wnt-signaling の negative regulator として知られているが、DKK4 は胃癌での発現上昇が知られており、DKK1 は肝細胞癌、肝芽腫、ウィルムス腫瘍での発現上昇がそれぞれ報告されている。これらの知見からも肺癌、食道癌も含め、ある種の癌においては DKK1 が癌の発生や進展に関わるのでは無いかと考えられる。

本研究において DKK1 の一過性強制発現により、哺乳類細胞の浸潤能が促進されることを明らかにした。この結果は肺癌、食道癌の組織マイクロアレイ解析において示された DKK1 強陽性症例は有意にリンパ節転移が高頻度であり予後不良である臨床病理学的知見を機能的に裏付ける証拠のひとつである。DKK1 の肺癌、食道癌における癌化に関する詳細な機能は未知であるが、今回の検討により DKK1 が細胞の浸潤能を促進させることで癌の悪性化を促進することが示唆された。今後はこの蛋白に対する中和抗体や発現を阻害する化合物、核酸（デコイ、RNAi）を用いることによる癌の進行阻害を目標とした治療への応用が期待される。DKK1 は LRP5/6 及び Kremen 蛋白と結合し Wnt-Frizzled-LRP5/6 レセプター複合体の形成を阻害することが報告されている。しかしながら、肺癌・食道癌の細胞株、臨床検体を用いて DKK1 と LRP5/6 の mRNA 発現レベルを半定量的 RT-PCR で比較したところ、両者の発現パターンが一致して

いなかったことから（データ未発表）、未知の結合蛋白やレセプターの存在も考えられ今後の検討が必要である。

さらに、我々は肺癌・食道癌患者血清中のDKK1蛋白が高頻度に高値を示すことを確認した。本研究に用いた癌患者血清の約半数は根治的手術可能症例であるため、早期診断マーカーとしても有用であると考えている。また既存の腫瘍マーカーであるCEAとProGRPをDKK1と組み合わせることによって肺癌の検出感度が80-90%に上昇し、疑陽性率は6-8%程度であった。今後、臨床現場で利用可能な診断キットの開発と更なる多施設大規模試験が必要ではあるが、DKK1が肺癌、食道癌の有用な新規血清診断、予後マーカーであることが示された。

【結語】

DKK1は正常臓器では胎盤、前立腺にのみ発現を認め、肺癌及び食道癌において高頻度に高レベルの発現を示す分泌蛋白である。この蛋白は細胞の浸潤に関与しており、肺癌、食道癌の早期血清診断、予後予測バイオマーカーとして有用であると考えられた。さらに、癌の進展を阻害する新規分子標的療法への応用の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Dickkopf-1 as a Novel Serologic and Prognostic Biomarker for Lung and Esophageal Carcinomas

(肺癌、食道癌の新規血清・予後バイオマーカー Dickkopf-1)

肺癌は本邦における癌死の第1位を占めており、食道癌も消化器悪性腫瘍の中で最も悪性の高い癌種の一つである。これらの癌に対する腫瘍マーカーが臨床応用されているが早期診断に有用なものは未だ無く、個別治療に応用できるものも限られている。そこで肺癌と食道癌の新規診断バイオマーカーおよび分子標的治療薬の開発を目的として本研究を行った。我々は27,648遺伝子からなるcDNAマイクロアレイを利用して肺癌と食道癌の網羅的遺伝子発現情報解析を行い、両癌組織において高頻度に高いレベルで発現している遺伝子 Dickkopf-1(DKK 1)を抽出した。さらに、siRNAによる遺伝子発現阻害実験や、細胞増殖・浸潤に関する実験に加え、約600症例の肺癌、食道癌組織アレイを用いた免疫組織学的検討を行った。DKK1の活性化が癌細胞の進展に関わるような知見や、癌の診断・治療への応用などの報告は無いので、肺癌と食道癌の早期診断および予後マーカーとしてのDKK1分子の有用性とその治療への応用の可能性について検討した。

北海道大学病院腫瘍外科およびその関連病院においてインフォームドコンセントの得られた非小細胞肺癌患者279症例の癌組織と非癌部組織、また恵佑会札幌病院における食道癌患者280症例の癌組織と非癌部組織を対象として、免疫組織学的検討と半定量的RT-PCRを行った。血清中のDKK1を測定するために、健常者血清207例、COPD患者血清88例、肺癌患者血清265例（腺癌 112症例、扁平上皮癌 68症例、小細胞癌 85症例）、および食道癌患者血清81例を用いた。抗体は市販の抗DKK1抗体を用いた。生存分析ではStatView statistical program (SaS)によりlog rank testを用いてp value 0.05以下を優位差ありと判定した。

血清 DKK1 値の測定のためにサンドイッチ ELISA を構築した。固相化抗体として抗 DKK1 ウサギポリクローナル抗体を、検出抗体としてビオチン化した抗 DKK1 ウサギポリクローナル抗体を用いた。血清 CEA および ProGRP の測定は市販のキットを用いて行った。DKK1 は正常肺、正常食道で全く発現を認めず、癌組織において mRNA 及び蛋白レベルで強く発現している分子であることが肺癌、食道癌臨床検体をもちいた半定量的 RT-PCR、Western blotting により示された。Northern ブロット法により、この分子は正常臓器においては胎盤と前立腺においてのみ発現していることが示された。

約 600 症例の非小細胞肺癌および食道癌組織アレイによる免疫組織染色による検討では、

DKK1 は非小細胞肺癌と食道癌組織において高頻度に発現しており、さらにこの蛋白を強く発現する症例の予後は有意に不良であることが示された。また、DKK1 は非小細胞肺癌において独立予後因子であることが明らかとなった。

DKK1 を哺乳類細胞に強制発現させると Matrigel invasion assay により浸潤能の亢進が認められたことから、この蛋白が癌細胞の悪性化に重要な役割を果たしていることが考えられた。

我々の構築した ELISA を用いて癌患者血清の測定を行ったところ非小細胞肺癌患者の 70% (126/180)、小細胞肺癌患者の 69.4% (59/85)、食道癌患者の 63% (51/81) を検出することが可能であった。また、既存の腫瘍マーカーである CEA と組み合わせると、非小細胞肺癌患者血清における陽性率は 82.2% で、ProGRP と組み合わせると小細胞肺癌患者血清における陽性率は 89.4% の検出感度となった。

公開發表において、副査の秋田教授より、1) DKK1 を遺伝子導入した際の増殖能、2) DKK1 の condition medium を加えた場合の浸潤能への影響、3) DKK1 を knockdown した場合の phenotype の変化等について質問があった。続いて副査の近藤教授より食道癌と肺癌以外の癌での DKK1 の発現、および 2) 治療標的としての展望について質問があった。主査の守内教授からは p53, DKK1, Wnt signal の関係について質問があった。フロアーから、1) 前立腺肥大患者や妊婦における DKK1 の発現、2) 術後 DKK1 値が低下していない症例、3) 大腸癌の肺転移巣における発現状況について質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は主旨をよく理解し自らの研究データと文献的考察を混じえて適切に回答した。

この論文は、肺癌および食道癌で高い発現を示し、血清学的診断に有用な DKK1 蛋白質を見い出したことが高く評価され、今後の臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。