

診療に於ける新規マーカーの探索と適用

茶野 徳宏

滋賀医科大学臨床検査医学講座

Application of novel clinicopathological biomarkers

Tokuhiro CHANO

Department of Clinical Laboratory Medicine, Shiga University of Medical Science

Abstract To contribute the order-made medicine for cancer treatments, we have originally searched several biomarkers in the last decade. Some have been used as immunohistochemically novel biomarkers for the cancer diagnosis, and the others have applied to molecular target for the cancer therapy. RB1-inducible coiled-coil 1 (RB1CC1; also known as FIP200) plays important roles in biological pathways such as cell cycle arrest and autophagy, and the nuclear expression has been established as a prognostic predictor in breast and salivary cancer patients. RECQL1 and WRN protein are RecQ DNA helicases that participate in suppression of DNA hyper-recombination and repair. We have found that both proteins are highly expressed and that siRNA-mediated silencing of either gene suppressed head and neck squamous cell carcinomas in vitro and in vivo. The data offer a preclinical proof-of-concept for RecQ proteins as novel therapeutic targets to treat aggressive head and neck squamous cell carcinomas. In testicular germ cell tumors, the fetal-specific methyltransferase-like protein DNMT3L is expressed, and has been used as a novel marker of human embryonal carcinoma. Further elucidation of the roles of DNMT3L in vivo warrants a possible significance as a therapeutic target of embryonal carcinoma. These novel biomarkers such as RB1CC1, RecQ, and DNMT3L provide new insight into cancer diagnosis and therapy; and will help to realize the order-made medicine.

Keyword biomarker, RB1CC1, RecQ, DNMT3L

分子生物学的、核酸化学的技術の進歩は目覚ましいものがあり、癌をはじめとする各種疾患に対する診断法、診断技術は、まさに分進秒歩と云うべき発展を遂げつつある。数年のうちには次 n 世代ゲノムシーケンサーの更なる飛躍的技術革新が起こり、「個」のゲノムの時代、100-1000 ドルゲノムの時代が実際に到来すると予想されている。このような時代のうねりにもまれつつ、我々はオーダーメイド医療に即した癌の診断、治療への適用が直近に可能なバイオマーカーの探索を続けてきた。全国全ての病院で、どんな時にでも、と云う“汎用性、簡便性”を第一のキーワードとして、現在まで研究を行ってきた。

我々の研究は、骨肉腫抗癌剤耐性に関連する遺伝子をスクリーニングする過程で偶然同定した RB1CC1 (RB1-inducible coiled-coil 1; 網膜芽細胞腫遺伝子 RB1 誘導蛋白質) の研究より始まる。RB1CC1 は、細胞質、核内の両方に存在するが、核内では p53 や hSNF5、そして PIASy と複合体を形成し、RB1 経路の転写に対して、正の効果をもたらし、細胞増殖を抑制する。乳

癌では、その発現のみられないものや、核内局在の極めて乏しい症例が存在し、これらについては臨床予後が悪い。RB1CC1 は RB1 経路を増強しつつ、p53 とも複合体を形成し、p53 のいくつかの細胞内機能も調整するので、RB1CC1, RB1, p53 の三者を指標として、予後との関連をみると、そのバイオマーカー的意義は顕著であった。RB1CC1, RB1 が核内に存在し、更に p53 の変異、異常発現のない場合は 5- 10 年の長期予後に関して、死亡例は全くなく、予後良好のマーカーであることが明らかになった。乳癌臨床に於いては、ER, PR, HER2 が乳癌細胞の定性診断に適用されており、補助療法選択の観点からも欠かすことはできない。これら三者の発現が乏しい症例は triple-negative cancer と分類され、予後は良くない。Triple-negative cancer の場合、悪性事象は 3- 5 年以内で生じる。しかし、triple-negative でない場合も 5-10 年の長期観察では再発、死亡が生じる。この為、医師、患者の両サイドともに、加療期間をどこまで設定し、治療後の監視をどこまで行うべきなのか、明確な目安がなく、不安とともに加療を継続するケースもあった。RB1CC1, RB1, p53 の三者を指標とし、予後マーカーとして適用した

場合、ER, PR, HER2 を指標とした現存の判定より、特に長期予後、生存を良く示唆できることが明らかとなった。RB1CC1, RB1, p53 の三者のどれかに異常がある場合、特に 5 年以上の長期 follow において、約 4 倍、再発、死亡のリスクが高い。ER, PR, HER2 を指標とした現在の病理学的判定に加えて、RB1CC1, RB1, p53 の乳癌組織に於ける定性診断を行うことで、長期予後もより正確に推測できるのである。他の癌では、唾液腺癌で同様の予後判定が可能で、臨床病理学的なバイオマーカーとして適用できるが、頭頸部癌、肺癌、骨肉腫、大腸癌では臨床上の予後との関連は乏しかった。

頭頸部癌では RB1CC1 は予後マーカーとして機能し得なかったが、その組織評価を行う過程で、下咽頭癌や舌癌に於いて RecQ family helicases の発現レベルが非常に高いことに気付いた。RecQ family helicases は、癌細胞では非常に高い発現状態であり、本ヘリカーゼ依存的な DNA 修復による癌ゲノム維持がなされ、癌細胞の性急な DNA 複製、増殖、生存は維持される。癌細胞の性急な増殖、生存の状態に於いては、RecQ helicases を抑制することによって、癌細胞に特異的な細胞死を誘導することができると考えた。実際、下咽頭癌細胞株、臨床症例に於いて、RecQ family helicases のうち RECQL1, WRN (Werner) helicases は非常に高い発現レベルを示し、RECQL1, WRN ヘリカーゼ依存的な DNA 修復、増殖、生存が行なわれていた。siRNA を用いて、RECQL1, WRN ヘリカーゼ特異的な knockdown therapy を試行してみると、非常に良好な抗腫瘍効果をもたらすことが出来た。Translational research としておこなったマウス in vivo に於ける CDDP との併用療法でも、特に強い抗腫瘍効果を示すことができた。CDDP, WRN-siRNA 併用の治療を行った場合、6 匹中 2 匹のマウスで腫瘍の完全消失を得ることができ、下咽頭癌の新規治療として非常に有望であることを証明した。現在、下咽頭癌等、頭頸部癌では、動脈注入や局所注入等、drug delivery 的な優位性が既に存在する。今後、siRNA drug delivery の改善によって、より多くの癌種にも適用拡大されることを期待している。

精巣腫瘍研究では、そのゲノム DNA の脱メチル化状態に注目し、DNA methyltransferase family; DNA メチル化転移酵素群 (DNMT) の発現スクリーニングを行った。その結果、他の DNMT1, 2, 3A, 3B では ubiquitous な発現状態を示すものの、DNMT3L 分子の transcript だけが精巣腫瘍特異的な発現パターンを示すことを見出した。一方で、正常精巣を含め、他の正常組織、体細胞由来の癌、等では DNMT3L の発現は見られないこと

も確認できた。DNMT3L は精巣腫瘍に特異的なバイオマーカーであることが分かったが、ヒト DNMT3L に特異的、且つ、formalin-paraffin 臨床病理標本の解析に耐え得る抗体は存在しなかった。我々は抗ヒト DNMT3L 特異抗体を作成し、臨床病理検体での評価解析を行った。結果、DNMT3L は胎児性癌細胞の核に特異的に発現していることが明らかとなり、臨床病理レベルに於ける胎児性癌特異的なバイオマーカーであることが分かった。現在、臨床で胎児性癌マーカーとして使用されている CD30 や SOX2 と比較しても、DNMT3L の検出は非常に高感度且つ特異的なマーカーであった。DNMT3L の発現は、正常では出生以前のごく短い胎生期、始原生殖細胞に特異的に発現するのみで、成人の生体内では精巣腫瘍、胎児性癌に発現し、成人の精巣、他の組織、臓器には全く発現しない。非常に理想的な治療標的分子としても期待でき、実際、培養上は DNMT3L の knockdown は細胞死を胎児性癌細胞にもたらず。この点においても、DNMT3L は臨床予後のマーカー、次世代の治療標的として、更に期待の持てる分子と云える。

我々は、これまでオーダーメイド医療に即した癌の診断と治療適用を志向しながら、種々の癌に於ける新規のバイオマーカーを探索してきた。臨床への適用には、探索した分子を用いた診断、主に臨床病理学的、免疫組織化学的な診断が可能となることを目標に解析を続けてきた。既に日常的に臨床適用されており、技術的にも資材的にも優位性が高く、その鑑別診断も客観性を持ちつつ困難でない手法であることを第一に考えてきたからである。分子標的として可能性のある分子については、その治療適応への可否を検討してきた。ここ数年、紹介した分子、RB1CC1, RecQ, DNMT3L について、それぞれ乳癌・唾液腺癌、頭頸部癌、精巣腫瘍での成果を公表することができた。これらについての臨床適用には少し近づいたのかもしれない。分進秒歩で進む核酸・ゲノム解析診断技術の革新のうねりの中で、技術的、資材的なコストも踏まえながら、しかも、迅速に、より広く臨床現場で適用されることを念頭に置いたバイオマーカーの探索は今後も必要と考えている。一つには、病理学を基盤とした癌の臨床診断、治療の概念が、全て、新しい核酸ゲノム診断、治療に入れ替わってしまうことは想像しがたく、核酸ゲノム診断、病理診断の交差・情報交換、並立適用の時代が続くであろうと考えているからである。そして、もう一つには、大規模産業的 massive genome studies、各種-ome studies が隆盛を極め、この主旨にそった研究が high impact journals に掲載され、科学情報として発信され続ける (アメリカン) サイエンスグローバルムの中で、個人のアイデアに立脚した小規模家内手工

業的研究にもわずかな価値が存在していても良いと考えているからである。

文献

- [1] Chano T, Ikegawa S, Kontani K, Okabe H, Baldini N, Saeki Y. Identification of RB1CC1, a novel human gene that can induce RB1 in various human cells. *Oncogene*, 21(8):1295-1298, 2002.
- [2] Chano T, Kontani K, Teramoto K, Okabe H, Ikegawa S. Truncating mutations of RB1CC1 in human breast cancer. *Nature Genetics*, 31(3):285-288. 2002.
- [3] Chano T, Ikebuchi K, Ochi Y, Tameno H, Tomita Y, Jin Y, et al. RB1CC1 activates RB1 pathway and inhibits proliferation and cologenic survival in human cancer. *PLoS One*, 5(6):e11404, 2010.
- [4] Chano T, Ikebuchi K, Tomita Y, Jin Y, Inaji H, Ishitobi M, et al. RB1CC1 together with RB1 and p53 predicts long-term survival in Japanese breast cancer patients. *PLoS One*, 5(12):e15737, 2010.
- [5] Tameno H, Chano T, Ikebuchi K, Ochi Y, Arai A, Kishimoto M, et al. Prognostic significance of RB1-inducible coiled-coil 1 in salivary gland cancers. *Head Neck*, 34(5):674-680, 2012.
- [6] Arai A, Chano T, Futami K, Furuichi Y, Ikebuchi K, Inui T, et al. RECQL1 and WRN proteins are potential therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 71(13):4598-607, 2011.
- [7] Minami K, Chano T, Kawakami T, Ushida H, Kushima R, Okabe H, et al. DNMT3L is a novel marker and is essential for the growth of human embryonal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 16(10):2751-2759, 2010.