

学位論文の要約

氏名

吉永 拓真

学位論文題目

消化器がんの新たな診断技術に関する基礎的研究

第 1 章 序論

1.1 緒言

日本は 1981 年にがんが死亡原因の 1 位となり、その後は第 1 位の座を譲ることなく増え続け、現在はがん罹患する生涯リスクは約 50% となり、2012 年にがんで死亡した人は 360,963 人となっている。年齢別で見ると男性では 40 歳以上で消化器系のがん（胃、大腸、肝臓）の死亡が多くを占める。女性では 40 歳代の乳がん、子宮がん、卵巣がんの死亡が多くを占めるが高齢になるほどその割合は減少し、消化器系（胃、大腸、肝臓）と肺がんの割合が増加する。また 2010 年に新たに診断されたがん（罹患全国推計値）は 805,236 例（男性 468,048 例、女性 337,188 例）で、がんの部位ごとに集計したデータによると男性の罹患部位の第 1 位が胃、2 位が肺、3 位が大腸、女性の罹患部位の第 1 位が乳房、2 位が大腸、3 位が胃である。男女計での罹患部位の第 1 位は胃、2 位が大腸、3 位が肺である¹⁾。

2003 年から 2005 年にがんと診断された人の 5 年相対生存率^{*1} は男性 55.4%、女性 62.9% であった。罹患数の多い胃がんに関しては、男性 64.2%、女性 61.5%、大腸がんは男性で 70.3%、女性で 67.9% という結果であった²⁾。これらの統計からも消化器がんは日本人にとって今も重要な疾患である。本研究では、消化器がんについて着目している。消化器がんは食道、胃、大腸、肝臓、胆嚢、膵臓などから発生するがんである。今回、消化器がんの中でも胃がん、大腸がんに関する研究に取り組んだ。胃がん、大腸がんは局所に限局している時期に発見できれば、がんを完全に除去して治すことができる。胃がん、大腸がんを治療する基本的な治療法は外科的手術であるが、より早期に発見されると苦痛の少ない内視鏡治療でがんを完全に切除することが可能である。このことから胃がん、大腸がんを早期に発見することは重要で、かつ身体的苦痛の少ない方法で、かつ安価にて測定可能な診断法の確立が世界中で挑戦されている。その中の一つに血液や尿などを用いたバイオマーカーによる評価がある。一般的にバイオマーカーは生体内の変化、外部からの刺激などによる変化を反映する生体マーカーであり³⁾、がんも臨床症状を鋭敏に反映するようなバイオマーカーの開発が今後期待されている。

*1 がん診断されてからの生存率（5 年相対生存率）は、治療でどのくらい生命を救えるかを示す指標である。がん診断された人のうち 5 年後に生存している人の割合が、日本人全体で 5 年後に生存している人の割合に比べてどのくらい低いかで表す。100% に近いほど治療で生命を救えるがん、0% に近いほど治療で生命を救い難いがんであることを意味する。

1.2 消化器がんの治療法について

1.2.1 胃がんの治療方法

胃がんの治療法は、病期分類より決定される。日本胃がん学会の『胃がん治療ガイドライン』は図 1-1 の通りであり、胃がんにおいては手術により、がん部を摘出することが標準的な治療である。また、胃の切除と同時に、決まった範囲の周辺のリンパ節切除を行い（リンパ節郭清）、リンパ節に転移している可能性がほとんどない場合には、手術ではなく内視鏡的切除術が行われる。腹腔鏡手術は、腹部に小さい穴を数カ所開けて専用のカメラや器具で手術を行う方法で、通常の開腹手術に比べて非侵襲な手技であり、手術後の回復が早いいため手術件数は近年増加傾向にある。

がんの浸潤が少なく、リンパ節に転移している可能性が少ない場合、内視鏡を用いた胃がん切除術である内視鏡的粘膜切除術 (EMR) や、内視鏡的粘膜剥離術 (ESD) などの方法がある。EMR は、病変の下層部に生理食塩水などを注入して病変を浮き上がらせてからスネアで病変を含む粘膜を切除する方法である。ESD は病変の下層部にヒアルロン酸ナトリウムなどの薬剤を注入しながら病変を電気メスで剥離する方法で、大きな病変も一括して切除することが可能である。内視鏡手術は侵襲性の低い手術であり、患者の予後も一般的によく、手術後の回復も早い傾向にある。これらの治療では、内視鏡治療後、病理診断検査で病変の組織を確認し、診断結果によっては胃の外科的切除が必要となる場合がある。根治切除可能であった胃がんに対しては、術後にテガフル・ギメラシル・オラシルカルシウム配合剤 (TS-1) 内服が生存率向上に寄与することが示され、標準治療として提唱されている⁵⁾。

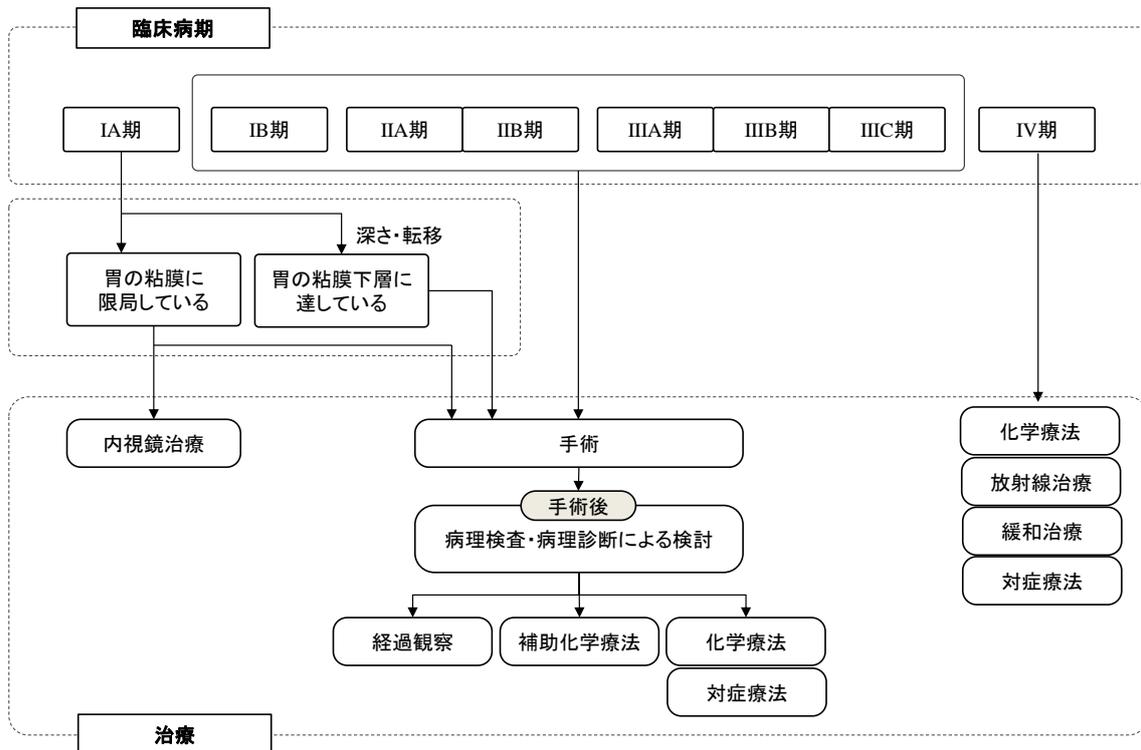


図 1-1 胃がん治療ガイドライン⁴⁾

1.2.2 大腸がんの治療方法

大腸がんの治療法は病期分類より決定される。大腸がん研究会の「大腸がん治療ガイドライン」は図 1-2 の通りであり、胃がん同様、手術によりがん部を摘出することが標準的な治療である。大腸の場合の内視鏡治療とは内視鏡を使って大腸の内側からがんを切除する方法で、胃がんと同様に病変の状態により EMR と ESD が施行される。内視鏡治療後、病理診断検査で病変の組織を確認し、診断結果によっては大腸の外科的切除が必要となる場合がある。

大腸がんの治療は、外科的切除が基本であり、早期でも手術が必要な場合がある。がんのある腸管を切除すると同時にリンパ節郭清を行う。がんが周囲の臓器に浸潤している場合には、それらの臓器も一緒に切除する。病状や手術の方法によっては人工肛門の造設を必要とする場合がある。また胃がん同様、大腸がんでも腹腔鏡手術が行われており、通常の開腹手術に比べて非侵襲の治療法であることから、手術後の回復が早いため手術件数は近年増加傾向にある。

大腸がんの治療には、放射線治療も行われ、高エネルギーの X 線を体の外からがん照射する。手術前にがんを小さくする効果があり、治癒率の向上や肛門を温存する目的、あるいは再発予防のために行われる。

大腸がんの抗がん剤治療は、主としてがん再発を予防するための補助的な治療として施行される。また、進行がん、再発がんに対しては、根治目的の外科的な治療を選択することが困難な場合もあり、その場合、延命および生活の質の向上を目的に抗がん剤治療が施行される。最近の抗がん剤の現状としては、患者の症状に合わせて数種類の薬剤を組み合わせる使用することもある。また、体内の特定の分子だけを狙い撃ちにしてその働きを抑える「分子標的薬」という抗がん剤が開発され近年広く用いられている。ほかの抗がん剤と併用することで効果を高めることが期待されている。

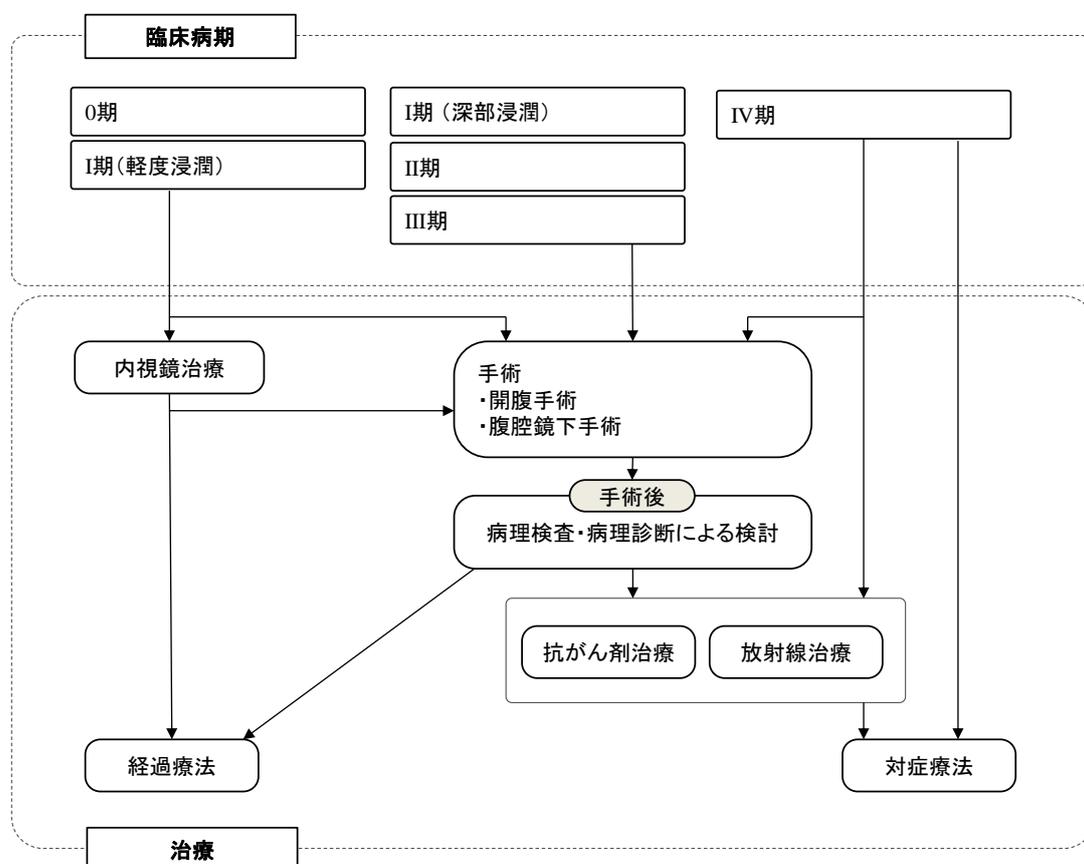


図 1-2 大腸がん治療ガイドライン⁶⁾

1.3 消化器がんの診断法について

1.3.1 胃がんの診断方法

胃がんが疑われると胃の内視鏡検査や胃透視検査を行う。内視鏡検査では胃粘膜を直接観察することができる。病変の大きさや形状、色や出血の有無も確認できる。また、がんと疑われる組織の一部を採って、がん細胞の有無を調べる病理診断検査も行うことが可能である。胃がんの場合では、胃の形が変化することから胃透視検査で胃の形や粘膜の状態を確認し、精密検査が必要であるかどうかを判定する。治療前に病変の広がり調べるために CT 検査や MRI 検査も行われる。

胃がんのバイオマーカーとして、日常診療で最も使用されているものは血清中の C-reactive protein (CRP), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) などである。これら血清におけるがんバイオマーカーの胃がんにおける病期別陽性率を示す⁷⁾ (表 1-1)。

表 1-1 胃がんのバイオマーカー CA19-9, CEA, CA72-4 の病期別陽性率⁷⁾

	CA19-9 陽性率 (%)	CEA 陽性率 (%)	CA72-4 陽性率 (%)
I期	~5	~5	~5
II期	~5	5~10	5~10
III期	30~40	15~20	20~25
IV期	60~70	50~60	60~70

CA19-9 はがん胎児性抗原であり、NS19-9 抗体により認識される糖鎖構造物である。その担体タンパクに関しては O-グリカン、N-グリカン等があるが特に O-グリカンであるムチンの側鎖構造体であることが知られている。したがって血清の CA19-9 はそれを発現する血清ムチンの量を示している。一方、CEA は、がん胎児性抗原として知られているが細胞接着因子の 1 つと考えられており、血清にはプロテアーゼによる分断で放出されている。肝臓のクッパー細胞に取り込まれて細胞を活性化し、がんの着床転移に積極的に関わっていると考えられている⁸⁾。

1.3.2 大腸がんの診断方法

大腸がんが疑われると、がんのある部位や広がりを調べるために直腸指診や注腸造影検査、内視鏡検査、CT 検査や MRI 検査、腹部超音波 (エコー) 検査などを行う。直腸指診は、指を肛門から直腸内に入れて、しこりや異常の有無を指の感触により判定する。注腸造影検査ではがんの位置や大きさ、腸の狭窄の度合いがわかる。内視鏡検査では、まず腸内を洗浄後、内視鏡を肛門部より挿入、直腸から盲腸までの全大腸を内視鏡により直接観察することができる。がんが疑われる組織の一部を採取し、がん細胞の有無を調べる病理診断検査を行う。病変の表面構造を拡大して観察できる拡大内視鏡を用いてより精密な検査も行われるようになってきた。大腸がんのバイオマーカーとしては CEA と CA19-9 が一般的である。しかしこれらのバイオマーカーで大腸がんを早期に発見することは難しく、進行大腸がんでも異常値が認められない場合もある。大腸がん周囲の臓器の位置関係、がん転移の有無の確認、治療前に周囲の臓器へのがんの広がりを調べるために CT 検査、MRI 検査を行う。また放射性同位元素であるフッ素 18 をフルオロデオキシグルコースに標識したものを注射し、臓器ごとにその取り込みの分布を撮影することで全身のがん細胞を検出する PET/CT 検査がある。超音波検査、CT 検査、MRI 検査で診断が難しい場合、バイオマーカーなどの異常から転移や再発が疑われる場合などには PET/CT 検査をすることもある。

1.4 アンジオポエチン様タンパク質 2 (ANGPTL2) とは

1.4.1 アンジオポエチン様タンパク質 (ANGPTL) ファミリー

アンジオポエチン (angiopoietin1-4) は構造上 N 末端側にコイルドコイルドメインと C 末端側にフィブリノーゲン様ドメインを有する分泌タンパク質で血管新生や幹細胞の維持に重要な機能を有する⁹⁾。その後、構造上アンジオポエチンに類似するが、アンジオポエチンの特異的受容体である Tie 1 および Tie 2 には結合できない分子が 7 種同定され、アンジオポエチン様タンパク質 (ANGPTL1-7) と命名されている。ANGPTL ファミリー分子の生物学的機能としてはその多くが血管新生制御に何らかの作用を示すことが明らかとなっている¹⁰⁾。ANGPTL ファミリーの樹形図を図 1-3 に示す。ANGPTL2 は代謝作用として全身のインスリン抵抗性の誘導、慢性炎症および慢性炎症誘導関連疾患の発症や進展に関与していることが報告されている¹¹⁻¹⁵⁾。ANGPTL2 は、特に内臓脂肪組織に強く発現している¹¹⁾。脂肪組織から分泌される ANGPTL2 は、血管新生促進やマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) の発現、活性を増加し¹⁶⁾、細胞外マトリックスの分解を促進することで脂肪組織の可逆的リモデリングにおいて大事な役割を果たしている。また、近年ではがんとの関連性が多く報告されており、詳細は「1.4.2 ANGPTL2 とがんとの関連性」に示す。一方で ANGPTL3, ANGPTL4, ANGPTL6 は、糖・脂質代謝やエネルギー代謝に関与するなど多様な機能を有することが明らかとなっている¹⁷⁾。

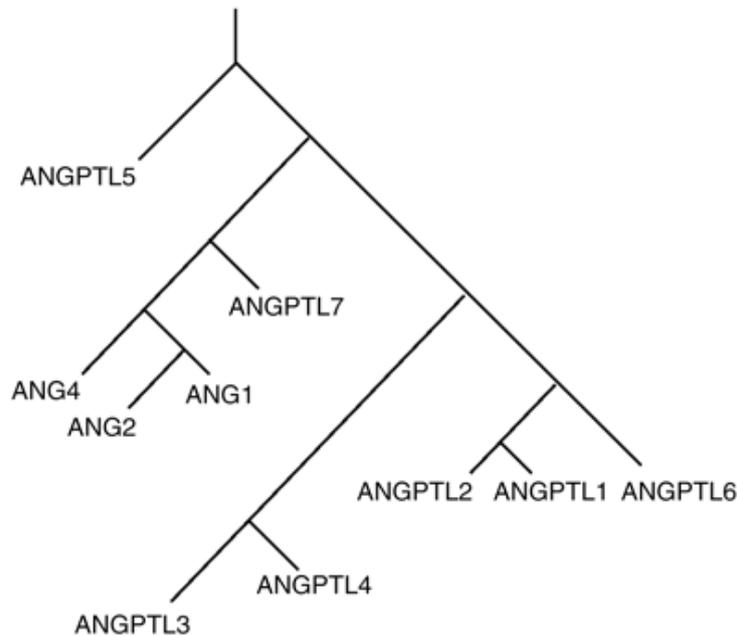


図 1-3 ANGPTL ファミリー樹形図¹⁸⁾

1.4.2 ANGPTL2 とがんとの関連性

低酸素状態や低栄養状態などのがんの微小環境を模倣した負荷によってがん細胞における ANGPTL2 発現が誘導されることが明らかとなっている¹⁴⁾。

慢性炎症は発がん、腫瘍の浸潤、転移を含むがん進行の異なる段階で重要な役割をする。しかし、炎症をがんの進行と関連づける分子メカニズムは完全には明確になっていない。ここに慢性炎症伝達物質であると最近知られている ANGPTL2 の発現が、化学的に誘導された皮膚扁平上皮がん (SCC) マウスモデルでの発がんの頻度と高い相関性があることが報告されている¹³⁾。

がんの微小環境の変化、具体的には低酸素状態や低栄養状態による細胞環境の微小な変化により、ANGPTL2 発現誘導が生じる。ANGPTL2 は、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンを介して血管内皮細胞に作用し、Rhoファミリー低分子量 G タンパク質 (Rho GTPase) である Rac を活性化することで細胞の運動能を促進するだけでなく、Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) の抑制因子である Inhibitor of Nuclear Factor- κ B (I κ B) の分解とそれに続く NF- κ B の核内移行を促進する¹¹⁾。

これらに示されたように ANGPTL2 は NF- κ B 経路活性化による炎症関連遺伝子や MMPs の発現を活性化することで細胞外マトリックスの分解や血管新生を誘導する。ANGPTL2 は、Rac 活性を通じて腫瘍細胞自身に作用し、血管新生を促進する。また、腫瘍細胞の遊走能を直接促進する。さらに ANGPTL2 は肺がん細胞、乳がん細胞にて上皮間葉転換 (EMT) を生じることが報告されている。EMT は、細胞間の接着因子が減少し細胞の遊走能を高める。がん浸潤、がん転移において重要な現象である^{14), 19)} (図 1-4, 図 1-5)。このことから ANGPTL2 はがんにおいて重要なタンパク質であり、本研究では ANGPTL2 の臨床応用について焦点を絞り研究に取り組んだ。

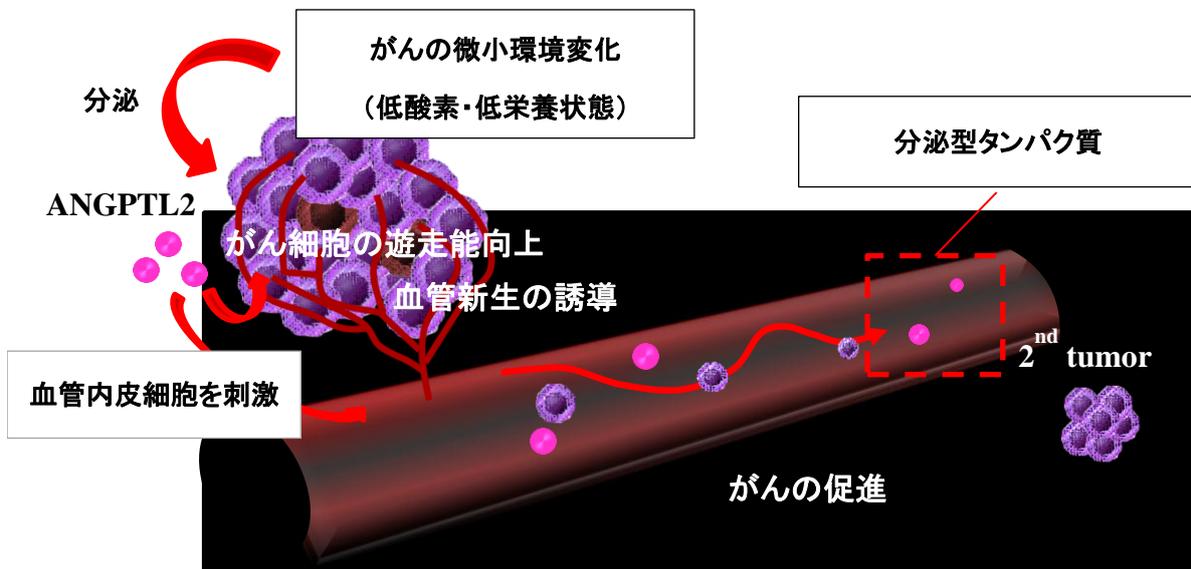


図 1-4 がん と ANGPTL2 との関連性についての概略図^{14), 19)}

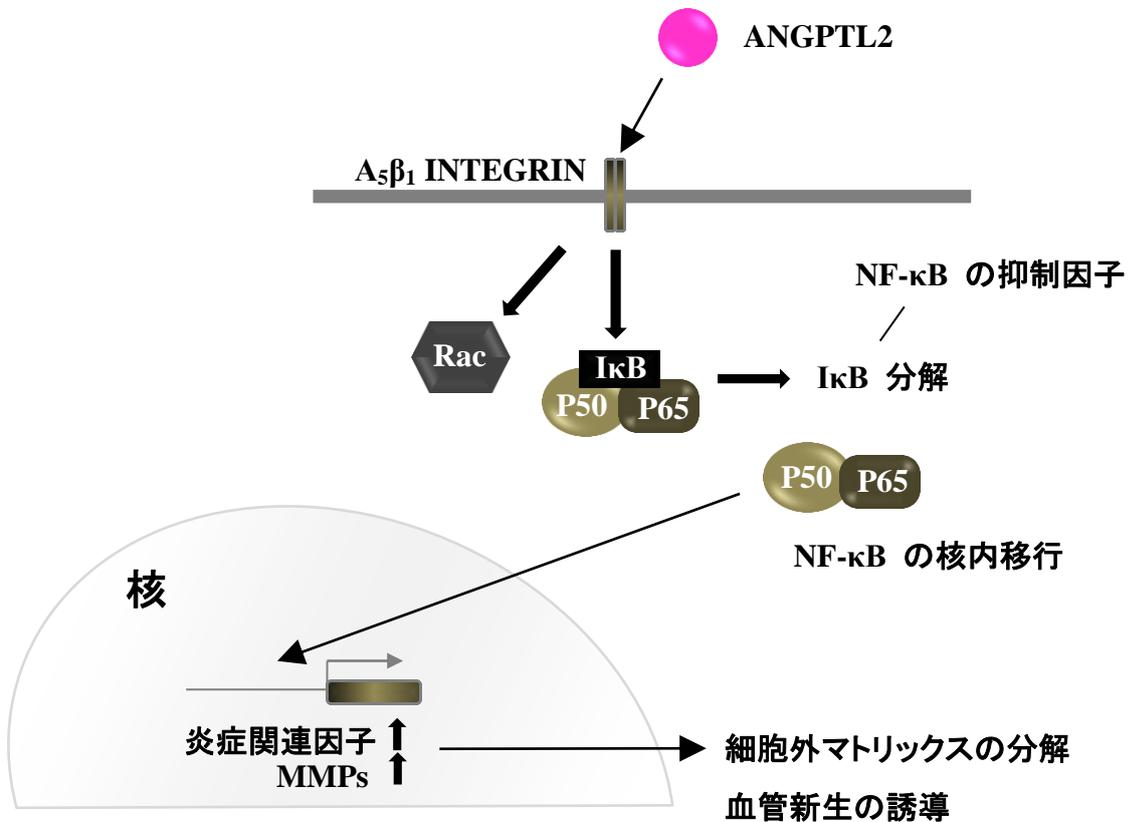


図 1-5 ANGPTL2 の作用機序^{14), 19)}

1.5 本研究に用いた統計解析手法

1.5.1 独立な 2 群の差のノンパラメトリック検定 (Mann-Whitney U の検定)

分析する対象が連続変数であり、さらに正規分布に従わない場合には、ノンパラメトリック法が採用される。その中で t 検定に相当する方法が Mann-Whitney U の検定であり、正規分布に従わないので平均値ではなく、中央値が 2 群で異なるかどうかを調べる解析方法である。元の値そのものではなく、それらの値が全症例の中で占める順位値を解析対象としている。順位に変換することによって元の値の分布に拘束されなくなる。検定統計値は順位値の和、すなわち順位和による統計手法である²⁰⁾。

1.5.2 スピアマンの順位相関係数

分析する対象が順位変数の相関の解析を行う場合には、スピアマンの順位相関係数を算出する。副作用のグレードを 1, 2, 3, 4 の 4 段階に分け、腫瘍の大きさを 1, 2, 3 の 3 段階に分けて集めたデータについて、これら 2 つの順位変数の間に相関があるかどうかを知りたい場合に適用される。また、連続変数であっても、正規分布に従わない変数や、はずれ値のあるデータの場合には、ノンパラメトリック法が適用されるが、相関の解析にはスピアマン順位相関係数を算出する²⁰⁾。

1.5.3 受動者動作特性曲線 (ROC) 分析

疾患の診断に用いる検査の結果が数値データで連続変数である際は、感度と特異度は陽性と陰性の境界値であるカットオフ値をいくつに設定するかによって変化する。カットオフ値を変更すると、それに応じて感度と特異度が変化する。その変化するカットオフ値における感度と偽陽性率を 2 次元でプロットしたものが ROC 曲線である。また、結果が順序変数で表される診断法にも適用される。連続変数として結果が得られる検査の場合には、感度 (真の陽性率) と偽陽性率 (1 - 特異度) を散布図としてプロットした ROC 曲線を描くことによって、その診断能を判定することができ、また比較検討することができる。ROC 分析で診断能を比較する場合には、ROC 曲線下の面積 Area under curve (AUC) を比較する。元の測定値を比較するわけではないので、ROC 分析は正規分布に従う変数でも、正規分布に従わない (ノンパラメトリック) 変数でも取り扱うことができる。ROC 分析によって算出される漸近有意確率は ROC 曲線が傾き 45 度の直線の場合、すなわち 2 群で差がない場合の面積 (0.5 となる) と比較した場合の p 値である。すなわち比較する 2 群が同じ母集団からの標本 (サンプル) であるという帰無仮説が正しい場合に、そのようなデータを得る確率を示している。この値が 0.05 以下であれば診断に有用であることがわかる。もし 0.05 より大きな値であれば診断に用いることは難しいという解釈となる²⁰⁾。疾患有無群と検査陽性陰性群におけるクロス表を表 1-2 に示す。

表 1-2 疾患有無群と検査陽性陰性群におけるクロス表

	検査値 (陽性)	検査値 (陰性)	計
疾患あり	a (真陽性)	c (偽陰性)	a+c (有病者)
疾患なし	b (偽陽性)	d (真陰性)	b+d (無病者)
計	a+b (全陽性者)	c+d (全陰性者)	a+b+c+d (総数=N)

$$\text{感度} = a/(a + c), \text{特異度} = d/(b + d)$$

1.6 がんの診断・治療における課題と本研究の目的、ならびに本論文の構成

胃がんは、胃透視検査や症状に関連して施行される内視鏡検査で発見されることが一般的であり、がんバイオマーカーの上昇で発見されることは少ない。また、早期の胃がん (ステージ I) においては、がんバイオマーカー上昇はほとんどみられることがなく、その陽性頻度は健常人のバイオマーカーの値とほぼ同様であり、胃がんスクリーニングにがんバイオマーカーを使用することの臨床的な意義は少ない⁸⁾。一方で、全国がん (成人病) センター協議会加盟施設における 5 年生存率 (2000~2004 年診断例) における統計値によると、胃がんのステージ I での 5 年生存率は 97.6%、ステージ II での胃がんの 5 年生存率は 69.6% と高い生存率を示すことが報告されている^{2), 21)}。ステージ I は小さく肉眼的にも診断が困難であり、通常の健診や内視鏡検査よりも、低侵襲的で、なお簡便な診断法が必要である。同じく早期がんであるステージ II に関しても CA19-9, CEA, CA72-4 のがんバイオマーカーの陽性頻度は約 10% 以下であり、がんバイオマーカーを使用した胃がん診断では、10 人中 9 人はがんがあるにもかかわらず、がんが陽性とは診断されないことになる。したがって、胃がんスクリーニングマーカーとしてのこれらの血清がんバイオマーカーは臨床医学において十分とはいえない。現在、プロテオミクスを用いて精力的に血清マーカーによるがんバイオマーカー研究が進められているが、既存のバイオマーカー (CEA, CA19-9 など) を超えるものはまだ発見されていない。

大腸がんに関して集団検診に免疫学的便潜血法が導入されてから、比較的早期の段階で医療機関を受診する大腸がん患者が増えてきたが、早期診断に適しているがんバイオマーカーは現在のところ存在しない。CEA は大腸がんの 80% 以上で産生が認められているが、がんが粘膜に局限する早期がん

の段階では、95%以上の患者で正常値を呈する。CA19-9に関してはステージⅠでの陽性率は7%、ステージⅡでは9%という報告がある²²⁾。全国がん(成人病)センター協議会加盟施設における5年生存率(2000~2004年診断例)における統計値によると、結腸がんのステージⅠでの5年生存率は98.4%、ステージⅡでの結腸がんの5年生存率は89.3%、直腸がんのステージⅠでの5年生存率は98.6%、ステージⅡでの直腸がんの5年生存率は86.6%と胃がん同様、高い生存率を示すことが報告されている²⁾。これらのデータより、胃がん、大腸がんともに5年生存率は高い(表1-3)。早期の段階で発見されれば、胃がん、大腸がんは治るがんといえる。図1-6で示す通り、胃がんに対して自覚症状がなかったと回答した方が49.9%、大腸がんにおいては、38.9%の方が自覚症状はなかったと回答している²⁾。これらの結果からも、スクリーニング検査の重要性が強うかがえる。

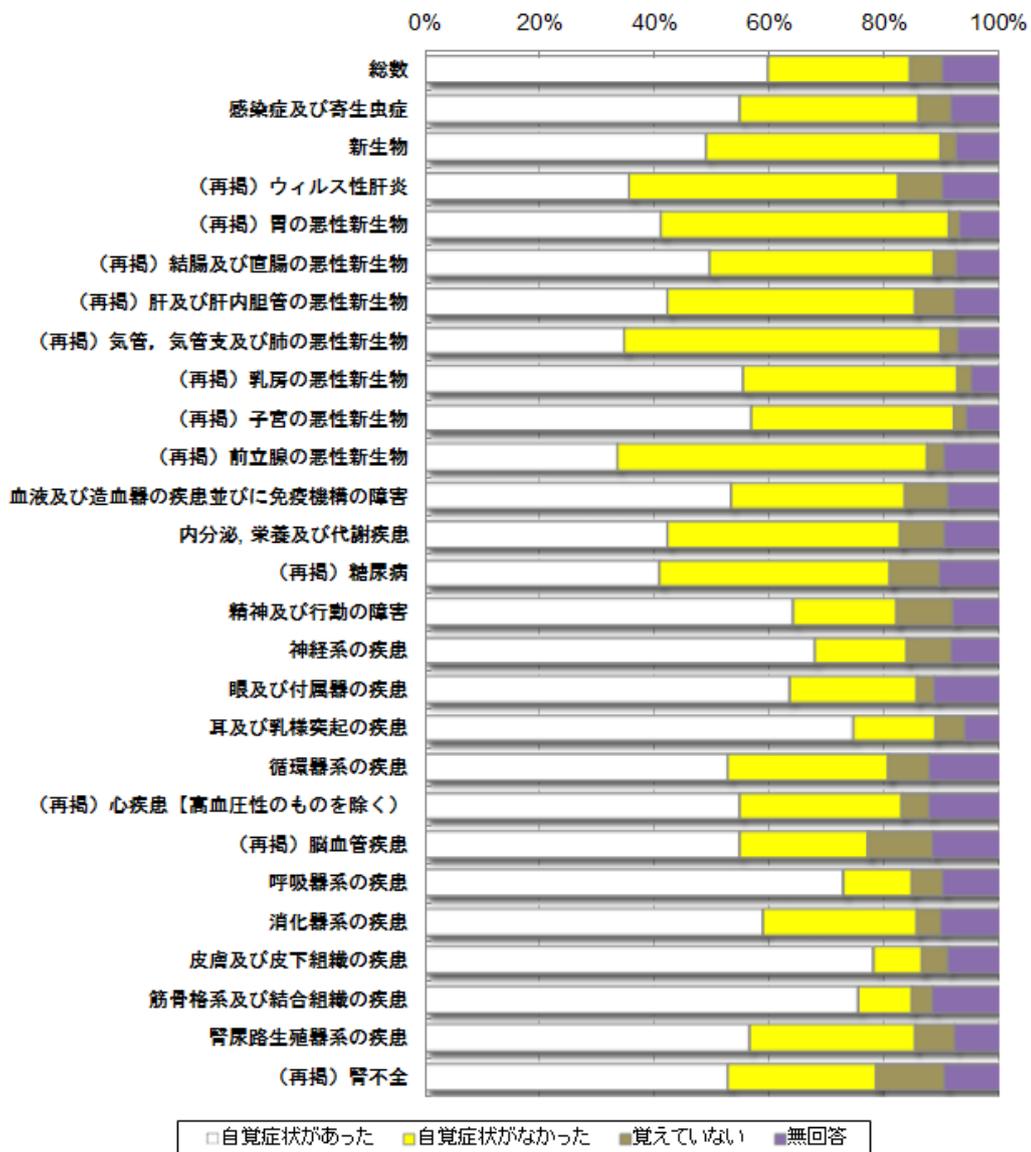


図 1-6 主な傷病分類別に見た外来患者の自覚症状の有無²³⁾

表 1-3 全国がん (成人病) センター協議会加盟施設における5年生存率 (2000~2004 年診断例) ²⁾

	臨床病期 (UICC)	症例数	割合 (%)	5年相対生存率 (%)
全がん All cancers C00-C96*	I	43,017	34.9	91.4
	II	26,299	21.3	80.7
	III	20,972	17.0	48.0
	IV	22,315	18.1	18.1
	不明	10,757	8.7	-
	計	123,360	100.0	65.7
胃 Stomach C16*	I	11,223	57.2	97.6
	II	1,615	8.2	69.6
	III	2,014	10.3	45.1
	IV	3,441	17.5	8.0
	不明	1,332	6.8	-
	計	19,625	100.0	71.3
結腸 Colon C18*	I	1,976	27.0	98.4
	II	1,621	22.2	89.3
	III	1,830	25.0	78.6
	IV	1,372	18.8	15.9
	不明	520	7.1	-
	計	7,319	100.0	73.9
直腸 Rectum C19-C20*	I	1,397	27.9	98.6
	II	1,083	21.6	86.6
	III	1,397	27.9	73.7
	IV	806	16.1	14.9
	不明	321	6.4	-
	計	5,004	100.0	73.8

* ICD10: 国際疾病分類

近年、がん治療は進歩しており、がんを早期で発見することの重要性は日に日に増している。がんバイオマーカーはがんの補助診療、治療効果判定および予後予知にはならない検査法の一つである。しかし、既存の血清がんバイオマーカーによるがん診断は感度 (がん陽性率)、特異度 (非がん陰性率) ともに十分ではない。

早期がんを発見するために安価であり、かつ侵襲性の低い検査が求められている。これらは一人でも多くの患者が受診するようにするには必要不可欠な要素であり、がんの早期発見はがん研究における最大のテーマの一つである。

本研究では、胃がん、大腸がんの臨床に役立つ血清バイオマーカーについての研究に取り組んだ。バイオマーカーとして ANGPTL2 についての評価を実施した。胃がん、大腸がんのバイオマーカーとしての ANGPTL2 の有用性を細胞株を用いて評価した。また臨床研究においては、胃がん、大腸がんの患者の血清中の ANGPTL2 の評価を行った。また、近年では一般的な組織検査に広く用いられるホルマリン固定パラフィン包埋 (以下、FFPE) 組織切片を用いたバイオマーカー研究が注目されている。FFPE 組織においては、予後情報を含む膨大な情報が含まれており利用価値は高い。これまではパラフィン包埋されている組織から特定された因子を評価することが困難とされてきた。今回、ANGPTL2 が組織中でも高発現しているか評価した。これまで病理診断は病理医により定性的な評価にてがんの

診断を行っていたが、がん組織中の *ANGPTL2* mRNA の発現量を定量的に評価できるか検討した。

本論文構成は、第 1 章が「序論」、第 2 章が「*ANGPTL2* の胃がんバイオマーカーとしての評価」、第 3 章が「*ANGPTL2* の大腸がんバイオマーカーとしての評価」、第 4 章が「ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた消化器がんの新たな診断技術の確立」、第 5 章が「結論」という構成となっている。今回、Appendix の A 章として「*ANGPTL2* タンパク質レベルの検出のための ELISA 系構築」を掲載している。

第 2 章 *ANGPTL2* の胃がんバイオマーカーとしての評価

2.1 緒言

胃がんは、さまざまながんの中においても、その罹患数は多く、世界中で多くの患者が存在する。がん関連死においても第 2 位であり、その数は年間約 800,000 人となる²⁴⁾。胃がんを早期の段階で切除できた場合は、劇的にがん死を減少させることが報告されている²⁵⁾。胃がんを早期発見するために、近年、内視鏡検査などの診断法が開発されているが、より侵襲性の低い、正確に胃がんを診断できる技術開発が世界中で求められており、それらを解決することはがん研究において喫緊の課題である²⁶⁾。

がんの診断法として、患者の血清中のがんバイオマーカーを調査する方法がある。胃がんを早期発見するためのバイオマーカーとしては、CEA, CA19-9 のような既存のバイオマーカーは存在するが、臨床現場において十分とは言えず、これら既存のバイオマーカーよりも感度、特異度ともに高いバイオマーカーが必要とされている^{27 - 29)}。本章では、胃がんの新たなバイオマーカー候補として *ANGPTL2* の潜在的診断能力を評価する。*ANGPTL2* は、アンジオポエチンファミリーに属している分泌型タンパク質である³⁰⁾。アンジオポエチン様タンパク質ファミリーは血管新生を制御している³¹⁾。腫瘍細胞によって生成された血管新生因子は、腫瘍の成長に重要な役割を担っている³²⁾。また、*ANGPTL2* が肺がん、乳がんのバイオマーカーとして有用であるという報告もある¹⁴⁾。血中の *ANGPTL2* の定量評価により、本章では胃がんのバイオマーカーとしての有用性について評価を行った³³⁾。

2.2 実験方法

2.2.1 胃がん細胞株と培養とサンプル条件

4 つのヒト胃がん細胞株 (HGC-27, MKN7, MKN74, KE-39) を理研セルバンクより購入した。HGC-27 細胞株は、Minimum Essential Medium (MEM培地) に 10% ウシ胎児血清 (FBS) を加え、抗生物質として 100 U/mL ペニシリンと 100 µg/mL ストレプトマイシンを投与する。その後、5% CO₂, 37°C の環境下で培養する。MKN7 細胞株、MKN74 細胞株と KE-39 細胞株は、RPMI1640 培地に 10% FBS を加え、抗生物質として 100 U/mL ペニシリンと 100 µg/mL ストレプトマイシンを投与する。その後、5% CO₂, 37°C の環境下で培養した。4 つのヒト胃がん細胞株 (HGC-27, MKN7, MKN74, KE-39) は、6-well プレートに細胞培養初日に 6×10^5 cells/well の密度で播種を行い、5% CO₂, 37°C の環境の中で培養した。細胞培養初日から 1 日目、2 日目、3 日目に細胞培養上清液をサンプルとして取得した。なお、細胞培養の際、培地は毎日交換した。細胞数に関しては血球計算盤を用いて計数した。

2.2.2 ELISA 法による ANGPTL2 濃度測定

ヒト血清サンプル（胃癌患者および健常人）と細胞培養上清液サンプルの中の ANGPTL2 濃度を測定するために Human ANGPTL2 Assay Kit（株式会社免疫生物研究所）を用いてサンドイッチ Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法により測定した。構成試薬を表 2-1 に示す。今回の実験は、製品プロトコルに準拠して行っている。

1 次抗体は、購入時にすでに固定された抗体プレートに、検体および標準物質（Human ANGPTL2）を加え、37 °C, 60 分間静置し、抗原抗体反応を行った（1 次抗原抗体反応）。標準物質はあらかじめ ANGPTL2 濃度が既知の物質である。本キットでは、標準物質バイアル瓶に超純水を 0.5 mL 加えて完全に溶解した際の濃度が 7 ng/mL となる。洗浄後に標識抗体を添加し、抗原抗体反応を行った（2 次抗原抗体反応）。標識抗体としては、標識抗体濃縮液を標識抗体用溶解液にて 30 倍希釈したものをを用いた。反応後、過剰の 2 次抗体を洗浄除去する。次に、Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させた。マイクロプレートリーダーにて溶液の波長 450 nm における吸光度を測定した。ELISA 工程を図 2-1 に示す。また、細胞培養上清液サンプルに関しては、細胞培養 2 日目のサンプルを用いた。

I. 1 次抗体 (抗体プレート) との反応

37 °C, 60 分間静置

II. 洗浄工程 4 回 (300 mL リン酸緩衝液にて洗浄)

III. 2 次抗体との反応 (標識抗体水溶液との反応)

4 °C, 60 分間 静置

IV. 洗浄工程 5 回 (300 mL リン酸緩衝液にて洗浄)

V. 反応工程 (100 μL TMB 基質液を添加)

遮光にて常温, 30 分間 反応

VI. 吸光度測定 (波長 450 nm における吸光度を測定)

図 2-1 ELISA 工程

表 2-1 Human ANGPTL2 Assay Kit の構成試薬

構成試薬

抗体プレート (抗Human ANGPTL2 (K2-1A1A) Mouse IgG MoAb A.P. 固相) 96Well
標識抗体濃縮液 (30 倍濃度 HRP 標識抗 Human ANGPTL2 (K1-12A4A) Mouse IgG MoAb Fab' A.P.)
標準物質 (Human ANGPTL2)
希釈用緩衝液
標識抗体用溶解液 (1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 PBS)
TMB 基質液
停止液 (1N H₂SO₄)
濃縮洗浄液 (40 倍濃度リン酸緩衝液)

2.2.3 マルチプレックスビーズテクノロジーの原理とマルチプレックスサスペンションアレイ解析

本章では、ヒト胃がん細胞株にて ANGPTL2 の他の血管新生因子の中にANGPTL2 同様に高発現する物質があるかを調査した。細胞培養上清液中のGranulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Vascular endothelial Growth Factor (VEGF), Leptin, Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB), Angiopoietin-2, Follistatin について Bio-Plex Human Angiogenesis 9-Plex Panel (バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社, アメリカ合衆国) を用いて同時に発現解析を行った。構成試薬を表 2-2、それぞれの血管新生因子の特性一覧を表 2-3 に示す。またMultiplex Suspension Array System (MSA) の実験方法の概略図を図 2-2、その原理を図 2-3 に示す。

表 2-2 Bio-Plex Pro Human Angiogenesis 9-Plex キットの構成試薬

構成試薬

Antibody-conjugated beads (25 × concentration)
Detection antibody (10 × concentration)
Angiogenesis standard (2vials, Lyophilized)
Angiogenesis control (2vials, Lyophilized)
Bio-Plex assay buffer
Bio-Plex wash buffer
Bio-Plex detection antibody diluent
Streptavidin-PE (100 ×)
Sterile filter plate

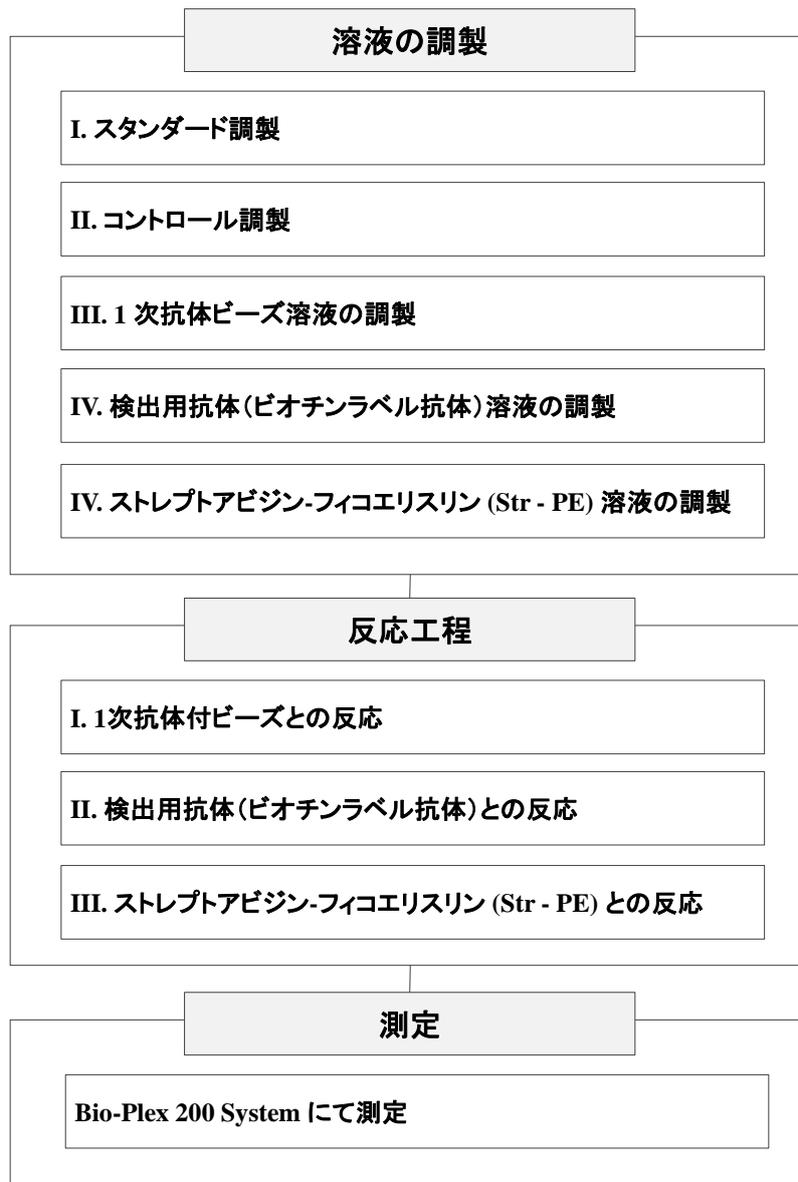


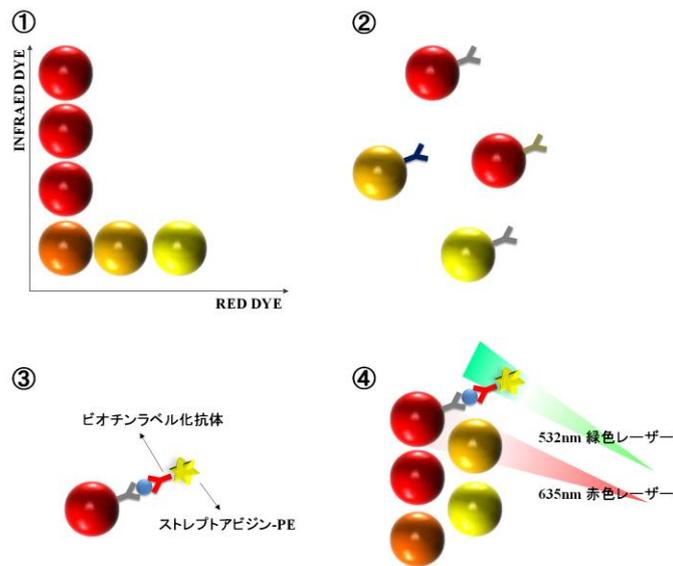
図 2-2 MSA 実験方法概略図

スタンダード調製として、Angiogenesis standard バイアルに MEM 培地を500 μL 加え、スタンダード原液とした。スタンダード原液 150 μL に対して MEM 培地 450 μL を混合し、段階希釈を行った。次にコントロール調製として、Angiogenesis control バイアルに MEM 培地を 800 μL 加え、コントロール原液とした。コントロール原液 150 μL に対して MEM 培地 300 μL を混合し、段階希釈を行った。以下、1 well あたりの反応を示す。1 次抗体付ビーズ溶液の調製として、遠心チューブに Assay buffer を 2 μL 加え、そこに Antibody-conjugated beads (25 \times concentration) バイアルから 48 μL を加え、1 次抗体付ビーズ溶液とした。検出用抗体 (ビオチンラベル抗体) 溶液の調製として、遠心チューブに Bio-Plex detection antibody diluent を 2.5 μL 加え、そこに Detection antibody (10 \times concentration) バイアルから 22.5 μL を加え、検出用抗体 (ビオチンラベル抗体) 溶液とした。ストレプトアビジン-フィコエリスリン (Str-PE) 溶液の調製として、遠心チューブに Bio-Plex assay buffer を 49.5 μL 加え、そこに Streptavidin-PE (100 \times) バイアルから 49.5 μL を加え、ストレプトアビジン-フィコエリスリン (Str-PE) 溶液とした。1 次抗体との反応として、Sterile filter plate の使用するウ

エルに Bio-Plex assay buffer を各 100 μ L ずつ加え、マルチスクリーンバキュームホールド (MultiScreen™ HTS Vacuum Manifold) にて吸引した。その後、1 次抗体付ビーズ溶液を各 50 μ L ずつ加え、Sterile filter plate に吸着させた。マルチスクリーンバキュームホールド (MultiScreen™ HTS Vacuum Manifold) にて吸引を行い、100 μ L の Bio-Plex wash buffer を各 100 μ L ずつ加え、マルチスクリーンバキュームホールド (MultiScreen™ HTS Vacuum Manifold) にて吸引した。この操作を 3 回繰り返した。各ウェルに 50 μ L のサンプル、スタンダード溶液、コントロール溶液を加えた。遮光した後、100 rpm, 30 秒間、さらに 300 rpm, 30 分間マイクロプレートシェーカー (MTS 2/4 digital) にて振盪させた。サンプル、スタンダード溶液、コントロール溶液を吸引し、100 μ L の Bio-Plex wash buffer を加えて吸引し、この操作を 3 回繰り返した。検出用抗体 (ビオチンラベル抗体) との反応工程として、ビオチンラベル抗体溶液を各ウェルに 25 μ L ずつ加え、1100 rpm、30 秒間、さらに 300rpm、30 分間、マイクロプレートシェーカー (MTS 2/4 digital) にて振盪させた。ビオチンラベル抗体溶液を吸引し、100 μ L の Bio-Plex wash buffer を加えて吸引し、この操作を 3 回繰り返した。Str-PE との反応として、Str-PE 溶液を懸濁し、各ウェルに 50 μ L ずつ加え、1100 rpm, 30 秒間、さらに 300 rpm, 30 分間マイクロプレートシェーカー (MTS 2/4 digital) にて振盪させた。Str-PE 溶液を吸引し、100 μ L の Bio-Plex wash buffer を加えて吸引し、この操作を 3 回繰り返した。各ウェルに 125 μ L の Bio-Plex assay buffer を加え、1100 rpm で 30 秒間振盪し、サスペンションアレイシステム Bio-Plex 200 System (バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社, アメリカ合衆国) にて溶液中の吸光度を測定した。

表 2-3 血管新生因子の特性一覧

血管新生因子	特性
Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF)	顆粒球コロニー刺激因子、サイトカインの一種で顆粒球産出の促進、好中球の機能を高める作用がある
Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1)	血管内皮細胞に発現している PECAM-1 は、細胞間接着部位に集積し、細胞外ドメインのホモフィリックな結合により内皮細胞間をつないでいる接着分子 ³⁴⁾
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	HGF は初代培養肝細胞の増殖を強く促進する因子として精製されたサイトカインであり、肝臓の旺盛な再生力を支える肝再生因子の有効な候補 ³⁵⁾
Vascular endothelial Growth Factor (VEGF)	VEGFは培養血管内皮細胞に対する増殖因子、および血管透過性亢進因子の2つの性質を持つ糖タンパク質 ³⁶⁾
Leptin	脂肪細胞によって作り出され、強力な飽食シグナルを伝達し、交感神経活動亢進によるエネルギー消費増大をもたらす、肥満の抑制や体重増加の制御の役割を果たすペプチドホルモン
PDGF-BB	間葉系細胞 (線維芽細胞、平滑筋細胞、グリア細胞等) の遊走および増殖などの調節に関与する増殖因子
Angiopoietin-2	血管新生の制御因子に重要な役割をもつ ³⁷⁾
Follistatin	アクチビンに結合するタンパク質として知られている糖たんぱく質 ³⁸⁾



- ① ビーズを 2 種類の蛍光色素の量比を変え色分けし調製を行った。
- ② 1 種類のビーズに 1 種類の 1 次抗体を結合する。今回は 7 種類のビーズにそれぞれ抗体を固定した。
- ③ 抗原をキャプチャーさせた後、ビオチン化 2 次抗体と反応させストレプトアビジン-PE で蛍光ラベリングを行った。
- ④ フローサイトメトリーの技術を利用しビーズを 1 つずつ検出し定量評価を行った。

図 2-3 MSA の原理

2.2.4 リアルタイム PCR 法

ANGPTL2 の mRNA レベルを解析する目的にて、ヒト胃がん細胞株 (HGC-27, MKN7, MKN74, KE-39) を用いリアルタイム PCR を行った。細胞を 6 well プレートに播種、細胞毎に 3 well ずつの細胞計数を行い、細胞密度を 4.5×10^5 cells/mL に調製したサンプルを 3 つずつ準備した。細胞懸濁液を遠心分離 (1200 rpm, 4 分間) し、細胞培養上清液を取り除いた。PBS (-) (pH 7.4) を 200 μ L 加え、再懸濁した。High Pure RNA Tissue kit (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社, ドイツ) を用いてヒト胃がん細胞株より RNA を抽出した。NanoDrop 分光光度計 (NanoDrop-8000) にて測定 (波長: 260 nm) し、抽出した溶液中の RNA 濃度を 200 ng に調製した。相補的 DNA (cDNA) 合成のために random hexamer primers (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社, アメリカ合衆国) と ReverTra Ace® (東洋紡エンジニアリング株式会社) を用いて反応液を調製し、サーマルサイクラーにて逆転写反応を実施した。リアルタイム PCR のための反応液を調製し、StepOnePlus Real-Time PCR System (ライフテクノロジーズジャパン株式会社, アメリカ合衆国) にて PCR を実施し、蛍光度 (蛍光波長/励起波長: 521/494 nm) を測定した。今回の研究では反応液の調製に SYBR Green qPCR Mix kit (東洋紡エンジニアリング株式会社) を用いた。また、ANGPTL2 と β -アクトチンのプライマーの塩基配列を下記する。

Human ANGPTL2 primers:

Forward Primer: 5-GCCACCAAGTGTGTCAGCCTCA-3¹⁵⁾

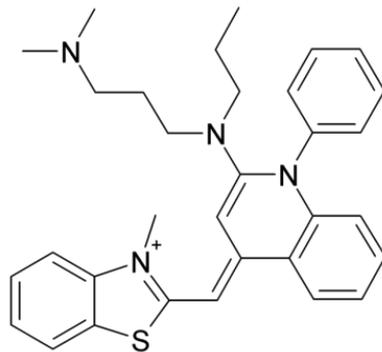
Reverse Primer: 5-TGGTTCTGAACTGCATTCTGCTG-3¹⁵⁾

Human β -actin primers:

Forward Primer:5-TGGCACCCAGCACAATGAA-3¹⁵⁾

Reverse Primer:5-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3¹⁵⁾

SYBR[®] Green の構造と原理を 図 2-4 と 図 2-5 にそれぞれ示す。cDNA の合成に必要な反応液の調製条件を表 2-4 と 表 2-5 に示す。また、リアルタイム PCR の実験概略図を図 2-6 に示す。



化学式：C₃₂H₃₇N₄S⁺

蛍光波長 / 励起波長：521nm / 494nm

図 2-4 SYBR[®] Green I 色素化学構造

I. 反応セットアップ

SYBR[®] Green I 色素は、二本鎖DNAに結合すると蛍光を発光



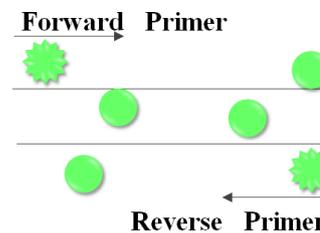
II. 熱変性

DNAが一本鎖DNAに変性するとSYBR[®] Green I 色素は解離し、蛍光が大幅に減少



III. 伸長反応

Forward Primer, Reverse Primerによりアニーリングを生じさせ、PCR産物が生成



IV. 反応完了

SYBR[®] Green I 色素は生成された二本鎖に結合し、その結果、装置で検出される蛍光の総量が増加

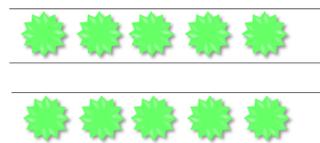


図 2-5 SYBR[®] Green 法の原理

表 2-4 cDNA の合成に必要な反応液の調製条件

構成試薬	容量 (μL)
Total RNA	X μL
Random Primer (25 pmol/μL)	1 μL
5 × Buffer	4 μL
2.5mM dNTPs	8 μL
ReverTra Ace (100 units/μL)	1 μL
milliQ水	Y μL
Total Volume	20 μL

表 2-5 リアルタイム PCR に必要な反応液の調製条件

構成試薬	容量 (μL)
milliQ水	6.4 μL
THUNDERBIRD SYBER qPCR MIX	10 μL
Forward Primer (10 pmol/μL)	0.6 μL
Reverse Primer (10 pmol/μL)	0.6 μL
50X ROX reference dye	0.4 μL
DNA溶液 (cDNA)	2 μL
Total Volume	20 μL

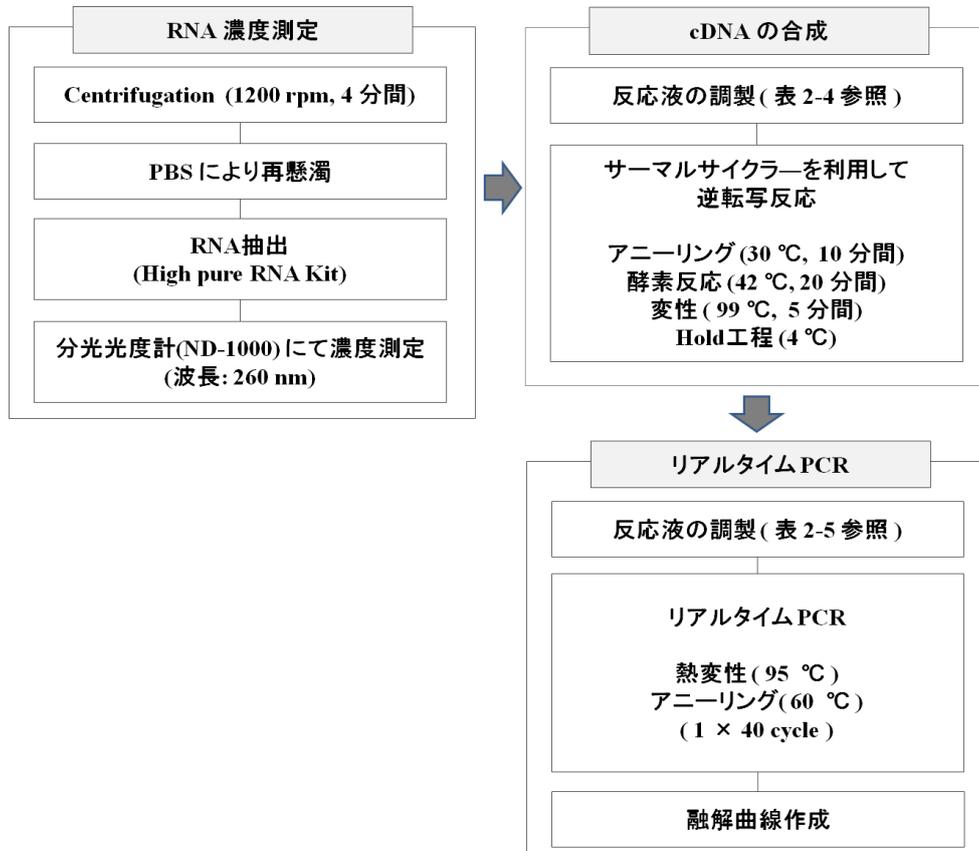


図 2-6 リアルタイム PCR 実験概略図

今回 mRNA の発現解析の方法として、比較 Threshold Cycle (Ct) 法 ($\Delta\Delta Ct$ 法) による相対定量法を用いた。

基準としたサンプルとの Ct 値の差から相対値を求める定量法であり、ターゲットの値を内在性コントロールの値で補正を行い、さらに基準とするサンプル (キャリブレーター) との相対値を算出する。Ct 値は蛍光強度が増幅プロットの閾値と一致する PCR サイクル数のことである。また、内在性コントロールは、多様な細胞で遺伝子の発現量が一定している遺伝子を用いる。

今回は多くの細胞で恒常的に転写されていると言われるハウスピーキング遺伝子である β -アクチンを使用した。以下、計算方法を示す。

【 相対定量法 】

$$\text{相対量} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

内在性コントロールでの標準化：

$$\begin{aligned} & \text{標的 mRNA 量} / \text{内在性コントロール mRNA} \\ & = \Delta Ct = Ct \text{【標的 mRNA】} - Ct \text{【内在性コントロール mRNA】} \end{aligned}$$

基準とするサンプルに対する相対値化：

$$\begin{aligned} & \text{標準化した検体の標的 mRNA 量} / \\ & \text{標準化した基準とするサンプルの mRNA 量} \\ & = \Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{【標準化した検体の標的 mRNA 量】} - \\ & \quad \Delta Ct \text{【標準化した基準とするサンプルの mRNA 量】} \end{aligned}$$

以上の方法より $\Delta\Delta Ct$ から相対量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) を求める。

2.2.5 ヒト血清サンプルの条件

本章の臨床研究は、公益社団法人鹿児島共済会南風病院の臨床研究倫理審査委員会の承認を得ている。またヘルシンキ宣言に基づいて行われている。血清サンプルは、南風病院より 2013 年 1 月から 2013 年 9 月までに取得した 50 例に関して解析を行った。研究対象としては、胃癌患者 12 症例 (年齢: 66.9 ± 11.9 歳、平均 \pm 標準偏差 (SD))、健常と診断された方 (以下、健常人) 38 症例 (年齢: 47.3 ± 9.9 歳) である。胃癌の 12 症例は、いずれも病理学的組織タイプは腺がんであった。また 12 症例のうち 9 症例が病期分類ステージ I で、3 症例がステージ II であった。がんのステージングに関しては、Tumor-Nodulus-Metastases (TNM) 分類によって病理学的に分類を行った。これらは、5th International Union Against Cancer に準じている³⁹⁾。研究対象に関しては、表 2-6 にまとめて示した。なお、今回の研究に関しては全症例インフォームドコンセントを実施している。

表 2-6 研究対象者の背景因子

背景因子	胃癌患者 (n = 12)	健常人 (n = 38)	合計 (n = 50)
年齢 (歳)			
平均 \pm SD	66.9 ± 11.9	47.3 ± 9.9	52.0 ± 13.3
範囲	43 - 88	35 - 75	35 - 88
性別			
男性	11	22	33
女性	1	16	17
BMI (kg/m ²) ^a			
平均 \pm SD	24.0 ± 4.5	22.0 ± 2.8	22.5 ± 3.3
範囲	17.9 - 31.9	17.4 - 29.5	17.4 - 31.9
ステージ分類			
I	9	-	9
II	3	-	3
深達度			
M ^b 、SM ^c	8	-	8
MP ^d	3	-	3
SS ^e	1	-	1

^aBody mass index; ^bmucosa; ^csubmucosa; ^dTunica muscularis procia; ^esubserosa

2.3 胃がんバイオマーカーとしての ANGTL2 評価系における実験結果と考察

2.3.1 胃がん細胞株の増殖速度評価

ヒト胃がん細胞 (HGC-27, MKN7, MKN74, KE-39) の細胞計数結果から細胞増殖曲線を図 2-7 に示す。

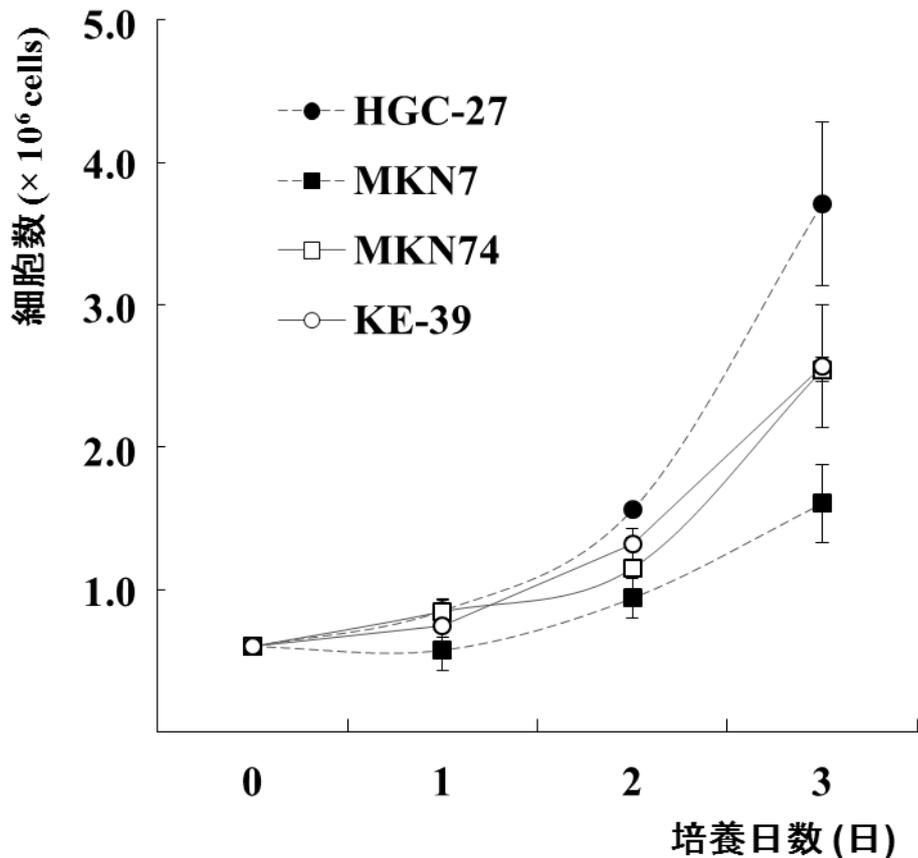


図 2-7 ヒト胃がん細胞株 (HGC-27, MKN7, MKN74, KE-39) 細胞増殖曲線

2.3.2 ヒト胃がん細胞株における培養上清液中に放出される ANGPTL2 タンパク質の定量評価

図 2-7 の結果を元に、各細胞の 1 日当たりの ANGPTL2 産生速度を求めた。HGC-27, MKN7, MKN74 および KE-39 の 1 日当たりの ANGPTL2 産生速度は、 $2.77 \times 10^{-6} \pm 2.02 \times 10^{-7}$ ng/cells/day, $1.03 \times 10^{-7} \pm 6.53 \times 10^{-8}$ ng/cells/day, $8.27 \times 10^{-25} \pm 2.86 \times 10^{-8}$ ng/cells/day であった。MKN74 ではその産生が認められなかった。これらの結果を図 2-8 に示す。

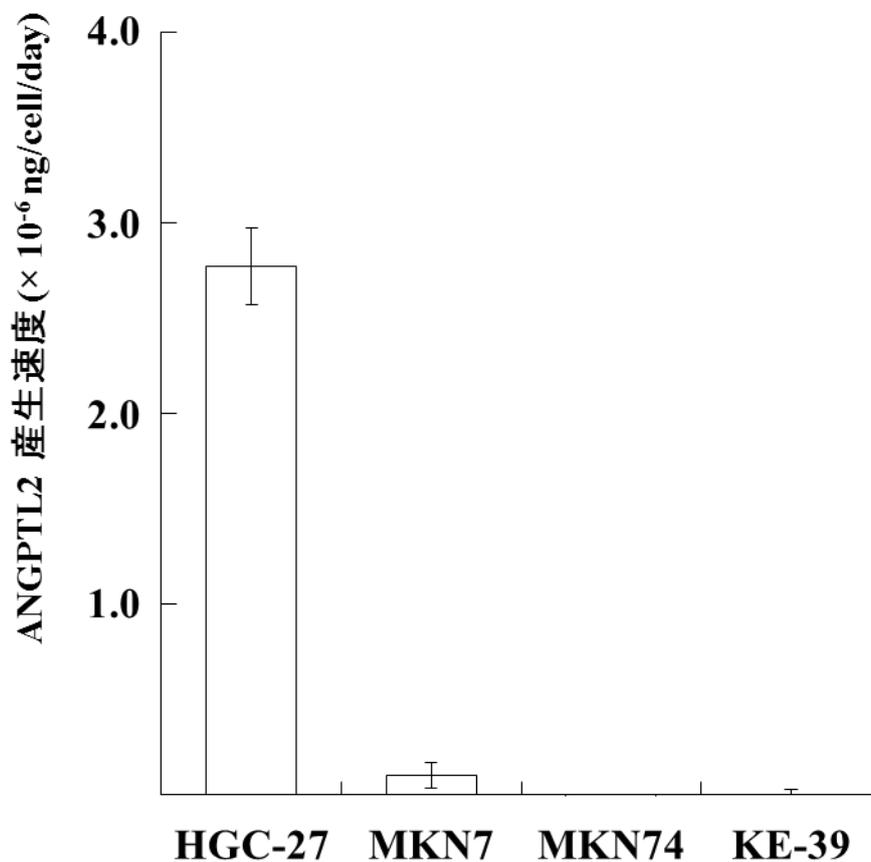


図 2-8 ヒト胃がん細胞株における細胞培養 3 日目の ANGPTL2 産生速度

2.3.3 ヒト胃がん細胞株における培養上清液中に放出される他の血管新生タンパク質の定量評価

本研究では、血管新生因子である G-CSF, PECAM-1, HGF, VEGF, Leptin, PDGF-BB, Angiopoietin-2, Follistatin について ANGPTL2 同様、細胞培養上清液に放出されるタンパク質濃度を測定した。測定に際しては HGC-27 細胞株と MKN7 細胞株を用いて実験を行った。結果を図 2-9 に示す。

HGC-27 細胞株と MKN7 細胞株ともに、VEGF のみ発現した。VEGF は血管新生因子の中でも特にがんとの関連性が多く報告されている。

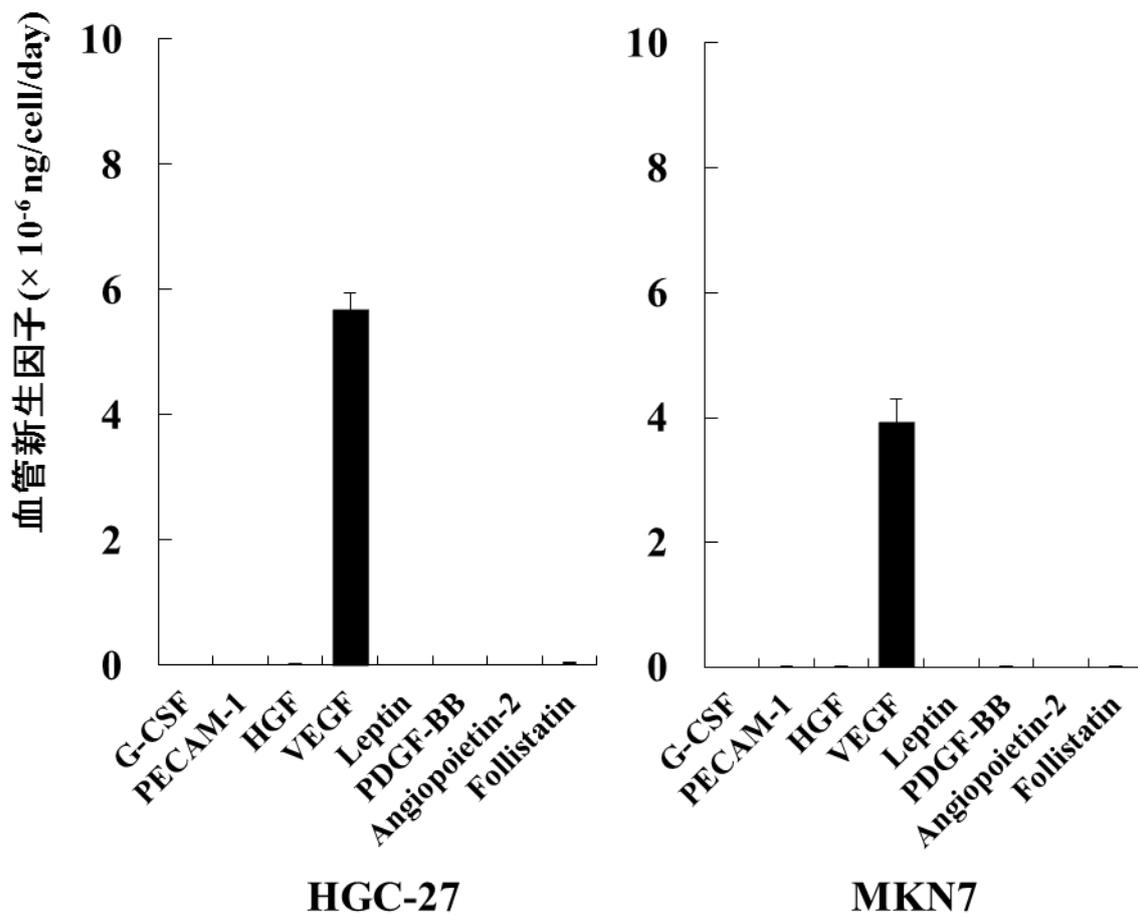


図 2-9 ヒト胃癌細胞株における細胞培養 2 日目の G-CSF, PECAM-1, HGF, VEGF, Leptin, PDGF-BB, Angiopoietin-2, Follistatin 発現量

2.3.4 ヒト胃癌細胞株の ANGPTL2 の mRNA 発現の定量評価

ヒト胃癌細胞 (HGC-27, MKN7, MKN74, KE-39) の ANGPTL2 の mRNA 発現量を測定した。測定結果を図 2-10 に示す。

ANGPTL2 のタンパク質濃度同様に mRNA 量も HGC-27 細胞株が高発現していることを示した。

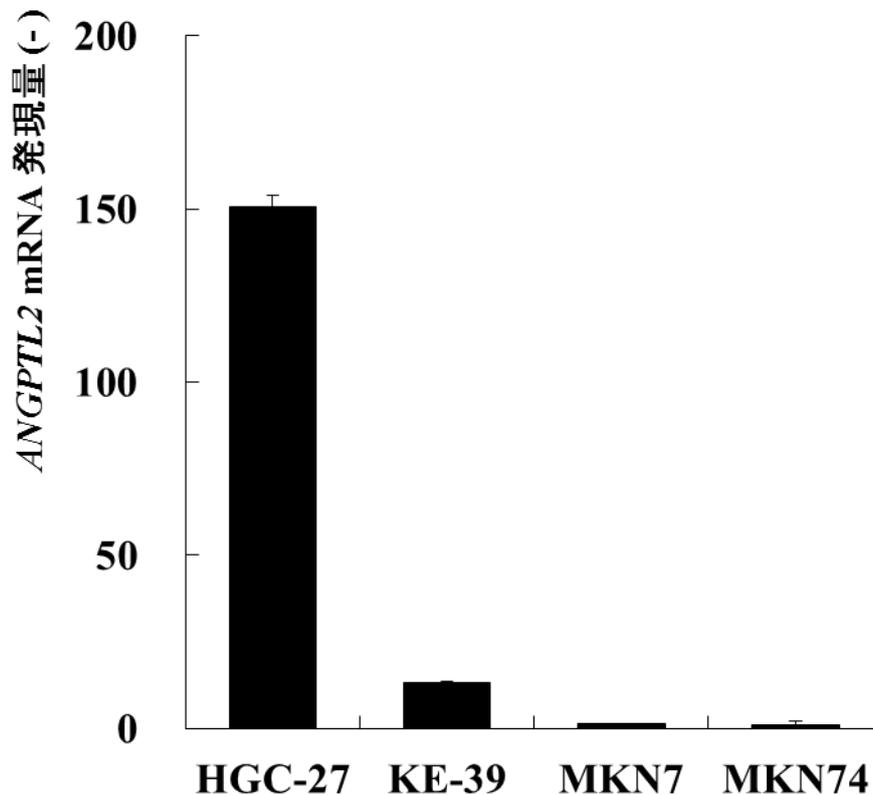


図 2-10 ヒト胃がん細胞株の ANGPTL2 mRNA の発現量

2.3.5 胃がん患者と健常人の血清 ANGPTL2 濃度の定量評価

胃がん患者の血清 ANGPTL2 濃度は、 4.59 ± 2.91 ng/mL、健常人の血清 ANGPTL2 濃度は 2.68 ± 0.60 ng/mL で、胃がん患者の血清 ANGPTL2 濃度が健常人よりも高い値を示した ($p < 0.01$) (図 2-11)。胃がん患者の血清 ANGPTL2 濃度と年齢, BMI, 血清 CRP 濃度, 血清 CEA濃度および血清 CA19-9 濃度の間での相関係数 (r) は、それぞれ -0.323 ($p = 0.307$), 0.541 ($p = 0.070$), 0.178 ($p = 0.579$), -0.083 ($p = 0.798$), -0.312 ($p = 0.324$) であった。健常人ではそれぞれ 0.302 ($p = 0.065$), 0.233 ($p = 0.160$), 0.123 ($p = 0.463$), 0.050 ($p = 0.767$), 0.193 ($p = 0.246$) であった。結果を表 2-7 にまとめた。

これらの結果より、血清 ANGPTL2 濃度は、それぞれの因子との関連性が認められず、胃がん患者にて高発現していることが確認できた。

また、血清 ANGPTL2 濃度により、胃がんを診断可能であるかを評価する目的で ROC 分析を行った。血清 ANGPTL2 濃度, 血清 CRP 濃度, 血清 CEA 濃度および血清 CA19-9 濃度の AUC は、それぞれ 0.774 ($p = 0.005$) (95% 信頼区間 (CI) : $0.615 - 0.933$), 0.669 ($p = 0.080$) (95% CI : $0.484 - 0.853$), 0.529 ($p = 0.768$) (95% CI : $0.326 - 0.731$), 0.570 ($p = 0.467$) (95% CI : $0.396 - 0.744$) であった。結果を図 2-12、表 2-8 に示した。

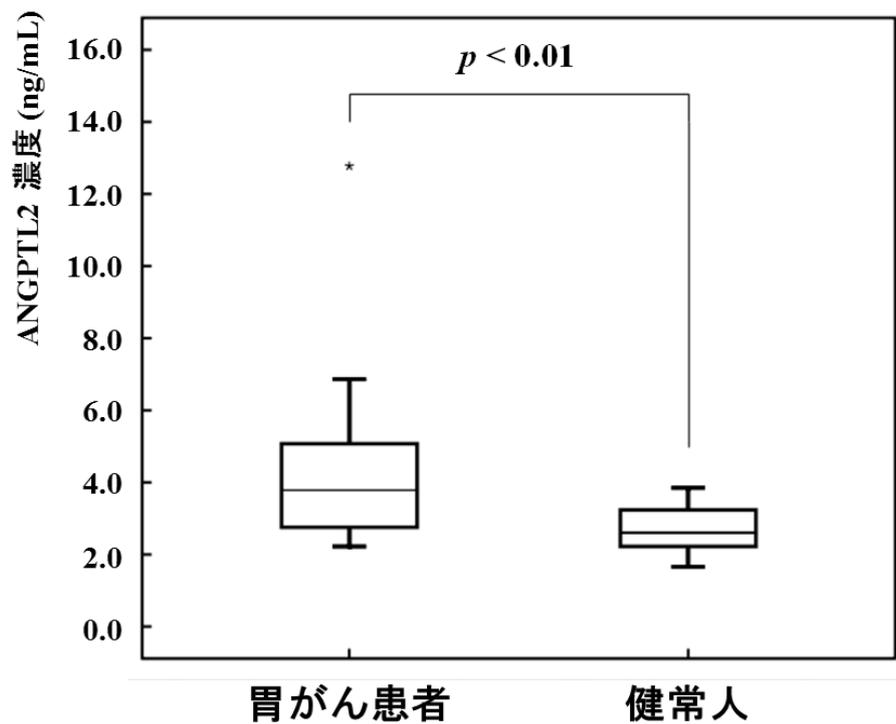


図 2-11 胃がん患者 (n = 12) と健常人 (n = 38) の血清中 ANGPTL2 濃度

表 2-7 ANGPTL2 と各因子間における相関

	ピアソンの 相関係数	p 値
胃がん患者 (n = 12)		
年齢	-0.323	0.307
BMI	0.541	0.070
CRP	0.178	0.579
CEA	-0.083	0.798
CA19-9	-0.312	0.324
健常人 (n = 38)		
年齢	0.302	0.065
BMI	0.233	0.160
CRP	0.123	0.463
CEA	0.050	0.767
CA19-9	0.193	0.246

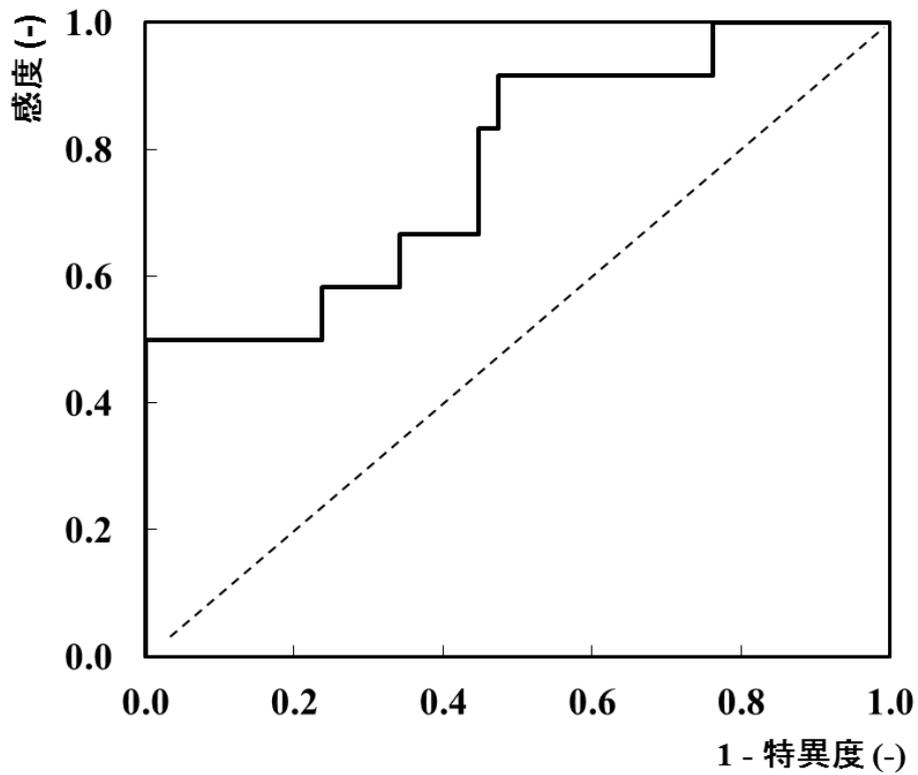


図 2-12 血清 ANGPTL2 濃度を用いた ROC 分析

表 2-8 ANGPTL2, CRP, CEA, CA19-9 における AUC 結果

バイオマーカー	AUC	標準偏差	<i>p</i> 値	95% CI
ANGPTL2	0.774	0.081	0.005**	0.615 - 0.933
CRP	0.669	0.094	0.080	0.484 - 0.853
CEA	0.529	0.103	0.768	0.326 - 0.731
CA19-9	0.570	0.089	0.467	0.396 - 0.744

** $p < 0.01$

これらの結果より血清 ANGPTL2 濃度を用いた AUC の値は、血清 CRP 濃度、血清 CEA 濃度、血清 CA19-9 濃度を用いた診断結果よりも高い値を示すことがわかった。

2.3.6 考察

本章は、胃がんにおける ANGPTL2 発現に関する調査を行った。結果として、HGC-27 細胞株にて高発現が確認された。HGC-27 細胞株は、未分化性胃がん細胞株である。さらに、HGC-27 細胞株と MKN7 細胞株にて他の血管新生因子 (G-CSF, PECAM-1, HGF, VEGF, Leptin, PDGF-BB, angiopoietin-2, follistatin) に関しても胃がんのバイオマーカーの可能性について調査を行った結果では、VEGF において HGC-27 細胞株、MKN7 細胞株の両方で発現が確認された。VEGF は腫瘍の成長と関連する血管新生因子である。また腫瘍の進展を予測するバイオマーカーとして報告されている^{40),41)}。このことから ANGPTL2 も VEGF 同様に有用なバイオマーカーとなり得ることを示した。

さらに、新しい胃がんバイオマーカーとしての潜在能力を評価するために、胃がん患者の血清 ANGPTL2 濃度と健常人の血清 ANGPTL2 濃度を評価した。結果として、胃がん患者の血清 ANGPTL2 濃度が健常人の血清 ANGPTL2 濃度よりも高いことが示された。また ROC 分析の結果より、ANGPTL2 は、既存のバイオマーカーである CRP、CEA および CA19-9 よりも高い診断能を示した。これらの結果より ANGPTL2 は、胃がんを診断するためのバイオマーカーとして有用であることがわかった。

ANGPTL2 は、炎症と関連していることが報告されている^{11),42)}。本研究では、血清 ANGPTL2 濃度と血清 CRP 濃度、また BMI との相関関係について調査したが、これらの間に相関関係は認められなかった。このことから ANGPTL2 は、胃がんにおける特別な因子であることが示された。

2.4 結言

本章では ANGPTL2 が、未分化性胃がん細胞株および胃がん患者で高発現しており、ANGPTL2 は胃がんのための臨床に役立つバイオマーカーであることを示した。

第 3 章は、ANGPTL2 の大腸がんバイオマーカーとしての可能性を評価した。7 種類の大腸がん細胞株 (Caco-2, Lovo, WiDr, Colo320, Colo205, CW-2, NCC-CoC-K115P) を培養し実験を行った。臨床研究として、大腸がん患者および健常人の血清中の ANGPTL2 濃度を測定した。

第 4 章は、一般的な組織検査に広く用いられる FFPE 組織切片を用いた研究である。FFPE 組織切片は、その保存性の良さから、患者の疾病情報を過去に遡って調査できるという利点を有する。FFPE 組織切片中の ANGPTL2 の mRNA 量が定量可能であり診断に利用できるか評価した。

第 5 章は、本論文に記載した消化器がんにおける新たな診断技術についての評価結果を総括した。

現在、日本では 2 人に 1 人はがんに罹患する時代である。ただし、がんを発見し治療を行えば治る時代になりつつある。消化器がんに関しても、がん治療は日々進歩している。本研究により ANGPTL2 は血中バイオマーカーとなりうる可能性を示している。また他のがんバイオマーカーとの組み合わせにより、苦痛の少ないがん診断が実現することを期待している。近年ではがん組織を利用した診断は病理医による定性的な診断が主流であるが、定量評価においてはまだ検討の余地がある。肉眼的に判断のつきにくいがんも存在する。今後の展望として、本技術により、摘出した組織から将来のがん再発のリスクを評価することができれば、治療後の患者のフォローアップに大いに貢献できると期待している。本研究は FFPE 組織を用いた発現解析であり、過去の試料から振り返りにより評価できることが大きなメリットである。これまでの治療成績や疾病情報もふまえ、さらなる有益な情報の発掘につながるであろうと期待する。

参考文献

- 1) Matsuda, A., Matsuda, T., Shibata, A., Katanoda, K., Sobue, T., Nishimoto, H., Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2008: A study of 25 population-based cancer registries for the monitoring of cancer incidence in Japan (MCIJ) project, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 44, pp.388-396 (2013).
- 2) Matsuda, T., Ajiki, W., Marugame, T., Ioka, A., Tsukuma, H., Sobue, T., Population-based survival of cancer patients diagnosed between 1993 and 1999 in Japan: a chronological and international comparative study, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 41, pp.40-51 (2011).
- 3) 小泉史明, がん臨床バイオマーカー研究の最近の展開, *日本薬理学雑誌*, 132, pp. 105-110 (2008).
- 4) 独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター編, がんの冊子 各種がんシリーズ 胃がん, 図書印刷株式会社, p.9 (2010).
- 5) Sakuramoto, S., Sasako, M., Yamaguchi, T., Kinoshita, T., Fujii, M., Nashimoto, A., Furukawa, H., Nakajima, T., Ohashi, Y., Imamura, H., Higashino, M., Yamamura, Y., Kurita, A., Arai, K., Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine., *N. Engl. J. Med.*, 357, pp.1810-1820 (2007).
- 6) 独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター編, がんの冊子 各種がんシリーズ 大腸がん, 図書印刷株式会社, p. 10 (2010).
- 7) 大倉久直, 胃がん手術症例における血清腫瘍マーカーの意義, *日本消化器外科学会雑誌*, 18, pp.25-28 (1998).
- 8) 石井 勝, 腫瘍マーカーハンドブック改定版., 株式会社 医薬ジャーナル社, p.165 (2009).
- 9) Morisada, T., Kubota, Y., Urano, T., Suda, T., Oike, Y., Angiopoietins and angiopoietin-like proteins in angiogenesis, *Endothelium.*, 13, pp.71-79 (2006).
- 10) Hato, T., Tabata, M., Oike, Y., The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism, *Trends Cardiovasc. Med.*, 18, pp.6-14 (2008).
- 11) Tabata, M., Kadomatsu, T., Fukuhara, S., Miyata, K., Ito, Y., Endo, M., Urano, T., Zhu, H.J., Tsukano, H., Tazume, H., Kaikita, K., Miyashita, K., Iwawaki, T., Shimabukuro, M., Sakaguchi, K., Ito, T., Nakagata, N., Yamada, T., Katagiri, H., Kasuga, M., Ando, Y., Ogawa, H., Mochizuki, N., Itoh, H., Suda, T., Oike, Y., Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance, *Cell Metab.*, 10, pp.178-188 (2009).
- 12) Kadomatsu, T., Tabata, M., Oike, Y., Angiopoietin-like proteins: emerging targets for treatment of obesity and related metabolic diseases, *FEBS J.*, 278, pp.559-564 (2011).
- 13) Aoi, J., Endo, M., Kadomatsu, T., Miyata, K., Nakano, M., Horiguchi, H., Ogata, A., Odagiri, H., Yano, M., Araki, K., Jinnin, M., Ito, T., Hirakawa, S., Ihn, H., Oike, Y., Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis, *Cancer Res.*, 71, pp.7502-7512 (2011).
- 14) Endo, M., Nakano, M., Kadomatsu, T., Fukuhara, S., Kuroda, H., Mikami, S., Hato T., Aoi, J., Horiguchi, H., Miyata, K., Odagiri, H., Masuda, T., Harada, M., Horio, H., Hishima, T., Nomori, H., Ito, T., Yamamoto, Y., Minami, T., Okada, S., Takahashi, T., Mochizuki, N., Iwase, H., Oike, Y., Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis, *Cancer Res.*, 72, pp.1784-1794 (2012).
- 15) Okada, T., Tsukano, H., Endo, M., Tabata, M., Miyata, K., Kadomatsu, T., Miyashita, K., Semba, K., Nakamura, E., Tsukano, M., Mizuta, H., Oike, Y., Synovial cell-derived angiopoietin-like protein 2 contributes to synovial chronic inflammation in rheumatoid arthritis, *Am. J. Pathol.*, 176, pp.2309-2319 (2010).

- 16) Tian, Z., Miyata, K., Tazume, H., Sakaguchi, H., Kadomatsu, T., Horio, E., Takahashi, O., Komohara, Y., Araki, K., Hirata, Y., Tabata, M., Takanashi, S., Takeya, M., Hao, H., Shimabukuro, M., Sata, M., Kawasuji, M., Oike, Y., Perivascular adipose tissue-secreted angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) accelerates neointimal hyperplasia after endovascular injury, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 57, pp.1-12 (2013).
- 17) Oike, Y., Akao, M., Yasunaga, K., Yamauchi, T., Morisada, T., Ito, Y., Urano, T., Kimura, Y., Kubota, Y., Maekawa, H., Miyamoto, T., Miyata, K., Matsumoto, S., Sakai, J., Nakagata, N., Takeya, M., Koseki, H., Ogawa, Y., Kadowaki, T., Suda, T., Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance, *Nat. Med.*, 11, pp.400-408 (2005).
- 18) Tan, M.J., Teo, Z., Sng, M.K., Zhu, P., Tan, N.S., Emerging roles of angiopoietin-like 4 in human cancer, *Mol. Cancer Res.*, 10, pp.677-688 (2012).
- 19) 門松 毅, 尾池雄一, 組織恒常性維持応答機構におけるアンジオポエチン様因子2 (ANGPTL2) の役割とその変容による生活習慣病・がんの発症・進展, *生化学*, 85, pp.196-204 (2013).
- 20) 森實敏夫, 入門 医療統計学 Evidenceを見出すために, 東京図書株式会社, p.107 (2004).
- 21) Yamashita, K., Sakuramoto, S., Kikuchi, S., Katada, N., Kobayashi, N., Watanabe M., Validation of staging systems for gastric cancer, *Gastric Cancer*, 11, pp. 111-118 (2008).
- 22) 大倉久直, CA19-9 (KMO1, CA50, SPAN1, DUPAN2を含む), 臨床検査のABC, 医学書院, pp.338-342 (1994).
- 23) 厚生労働省統計情報・白書, 平成 23 年受療行動調査 (確定数) の概況, pp.13-15 (2013).
- 24) Loei, H., Tan, H.T., Lim, T.K., Lim, K.H., So, J.B., Yeoh, K.G., Chung, M.C., Mining the gastric cancer secretome: identification of GRN as a potential diagnostic marker for early gastric cancer, *J. Proteome Res.*, 11, pp.1759-1772 (2012).
- 25) Yu, X., Luo, L., Wu, Y., Yu, X., Liu, Y., Yu, X., Zhao, X., Zhang, X., Cui, L., Ye, G., Le, Y., Guo, J., Gastric juice miR-129 as a potential biomarker for screening gastric cancer., *Med. Oncol.*, 30, p.365 (2013).
- 26) Tan, Y.K., Fielding, J.W., Early diagnosis of early gastric cancer, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 18, pp.821-829 (2006).
- 27) Li, C., Li, J.F., Cai, Q., Qiu, Q.Q., Yan, M., Liu, B.Y., Zhu, Z.G., MiRNA-199a-3p: A potential circulating diagnostic biomarker for early gastric cancer, *J. Surg. Oncol.*, 108, pp.89-92 (2013).
- 28) Carpelan-Holmström, M., Louhimo, J., Stenman, UH., Alfthan, H., Haglund, C., CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers, *Anticancer Res.*, 22, pp.2311-2316 (2002).
- 29) Lukaszewicz-Zajac, M., Mroczo, B., Gryko, M., Kędra, B., Szmitkowski, M., Comparison between clinical significance of serum proinflammatory proteins (IL-6 and CRP) and classic tumor markers (CEA and CA 19-9) in gastric cancer, *Clin. Exp. Med.*, 11, pp.89-96 (2011).
- 30) Kikuchi, R., Tsuda, H., Kozaki, K., Kanai, Y., Kasamatsu, T., Sengoku, K., Hirohashi, S., Inazawa, J., Imoto, I., Frequent inactivation of a putative tumor suppressor, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer, *Cancer Res.*, 68, pp.5067-5075 (2008).
- 31) Oike, Y., Yasunaga, K., Suda, T., Angiopoietin-related/angiopoietin-like proteins regulate angiogenesis, *Int. J. Hematol.*, 80, pp.21-28 (2004).
- 32) Sfiligoi, C., de Luca, A., Cascone, I., Sorbello, V., Fuso, L., Ponzzone, R., Biglia, N., Audero, E., Arisio, R., Bussolino, F., Sismondi, P., De Bortoli, M., Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival, *Int. J. Cancer.*, 103, pp.466-474 (2003).
- 33) Yoshinaga, T., Shigemitsu, T., Nishimata, H., Takei, T., Yoshida, M., Angiopoietin-like protein 2 is a potential biomarker for gastric cancer, *Mol. Med. Report*, DOI: 10.3892/mmr.2014.3040 (2014).

- 34) 増田道隆, 小形尚子, 望月直樹, PECAM-1を介した血管内皮細胞のメカノセンシング, *日本薬理学雑誌*, 124, pp.311-318 (2004).
- 35) 合田榮一, 肝細胞増殖因子 (HGF) の機能と産生制御, *日本薬理学雑誌*, 119, pp.287-294 (2002).
- 36) 渋谷正史, Review Article 血管新生とその制御 -VEGF と受容体を中心に-, *日本炎症・再生医学会雑誌*, 24, pp.144-153(2004).
- 37) Felcht, M., Luck, R., Schering, A., Seidel, P., Srivastava, K., Hu, J., Bartol, A., Kienast, Y., Vettel, C., Loos, EK., Kutschera, S., Bartels, S., Appak, S., Besemfelder, E., Terhardt, D., Chavakis, E., Wieland, T., Klein, C., Thomas, M., Uemura, A., Goerd, S., Augustin, HG., Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling, *J. Clin. Invest.*, 122, pp.1991-2005 (2012).
- 38) Ueno, N., Ling, N., Ying, S.Y., Esch, F., Shimasaki, S., Guillemin, R., Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, pp.8282-8286 (1987).
- 39) Sobin, L.H., Fleming, I.D., TNM classification of malignant tumors, fifth edition (1997), *Cancer*, 80, pp.1803-1804 (1997).
- 40) Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M., Ferrara, N., Humanization of an antivascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders, *Cancer Res.*, 57, pp.4593-4599 (1997).
- 41) Wang, Q., Diao, X., Sun, J., Chen, Z., Stromal cell-derived factor-1 and vascular endothelial growth factor as biomarkers for lymph node metastasis and poor cancer-specific survival in prostate cancer patients after radical prostatectomy, *Urol. Oncol.*, 31, pp.312-317 (2013).
- 42) Doi, Y., Ninomiya, T., Hirakawa, Y., Takahashi, O., Mukai, N., Hata, J., Iwase, M., Kitazono, T., Oike, Y., Kiyohara, Y., Angiopoietin-like protein 2 and risk of type 2 diabetes in a general Japanese population: the Hisayama study, *Diabetes Care*, 36, pp.98-100 (2013).