

20010535

厚生科学研究研究費補助金

効果的医療技術の確立推進臨床研究推進事業研究事業

胃癌の分子診断に基づいた術前化学療法的确立に関する研究

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 前原 喜彦

平成14年(2002年)5月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

胃癌の分子診断に基づいた術前化学療法の確立に関する研究	1
前原喜彦	

## II. 分担研究報告

1. ヒト胃癌株-ヌードラット移植モデルを用いた TS-1 と Docetaxel(TXT)併用療法の有効性に関する基礎的研究	4
北野 正剛	
2. スキルス胃癌の特異的発現遺伝子 WISP1V に関する研究	5
森 正樹	
3. 消化器癌におけるマイクロサテライト不安定性とミスマッチ修復異常に関する研究	6
鴻江 俊治	
4. 消化器癌におけるマイクロサテライト不安定性とミスマッチ修復異常に関する研究	7
馬場 秀夫	
5. UFT の抗血管新生作用に関する研究	8
江見 泰徳	
6. ヒト胃癌株-ヌードラット移植モデルを用いた TS-1 と Docetaxel(TXT)併用療法の有効性に関する基礎的研究	9
掛地 吉弘	
7. スキルス胃癌の特異的発現遺伝子 WISP1V に関する研究	10
田中 真二	
8. 消化器癌におけるマイクロサテライト不安定性とミスマッチ修復異常に関する研究	11
織田 信弥	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	12
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	13
-----------------	----

胃癌の分子診断に基づいた術前化学療法の確立に関する研究

主任研究者 前原喜彦 九州大学大学院 消化器・総合外科

研究要旨

- I 我々は targeted differential display 法を用いたクローニングにより、新しい癌関連遺伝子を発表している (Tanaka et al. PNAS1998, JCI1998, JCI1999)。スキルス胃癌は早期に浸潤・転移をおこすため予後が極めて悪く、新しい診断法、そして治療法の確立が急務である。今回、targeted differential display 法を用いてスキルス胃癌の特異的発現遺伝子 WISP1v を発見し (GenBank 登録: AB034725)、WISP1v 分子が分泌蛋白質であること、細胞浸潤機能を持つことを解明した (Tanaka et al. Oncogene 2001)。この新しい遺伝子の発見により、スキルス胃癌の早期診断や再発診断が可能となるばかりか、WISP1v レセプターの解析に基づく WISP1v 標的治療の開発へと発展できる。このように本課題は基礎解析のみならず、臨床治療への応用をめざした画期的な研究である。
- II DNA ミスマッチ修復活性は多様な抗癌剤の感受性規定因子として知られ、その異常はマイクロサテライト不安定性により検索される。我々は従来の手法の問題点を解決した新しい解析系を確立し、胃癌を含めた多様な悪性腫瘍において網羅的に解析を行った。その結果、マイクロサテライト不安定性には A,B の 2 つのサブタイプが存在し、A タイプがミスマッチ修復異常に直接起因する変化であることを同定した。
- III 胃癌に対する TS-1 と TXT 併用療法の有用性を検証するため、ヒト胃腺癌由来 SC-2, St-40, 及び SC-4 を移植したヌードラットを用い、併用による抗腫瘍効果及び毒性増強の有無を検討した。TS-1 と TXT の併用により各々単独投与に比べ抗腫瘍効果の増強が認められ、特に TXT を Day1 に併用するスケジュールでは 3 株とも併用効果が得られた。Day1 投与では Day 8 投与に比較し体重減少は軽度であった。TS-1 と TXT 併用療法は、臨床において有用性を検証する意義があると考えられた。
- IV 胃癌術後症例の UFT 内服後のヒト血漿中 GBL(GHB) 濃度の推移を測定したところ、in vitro において血管新生抑制作用を発現する GBL 25 ng/mg 以上を 4 時間にわたり維持しており、ヒト生体内においても UFT の抗腫瘍効果発現に GBL の血管新生抑制作用が関与している可能性が示唆された。

分担研究者：

北野正剛 (大分医科大学第一外科), 森 正樹 (九州大学生体防御医学研究所腫瘍外科学), 鴻江俊治 (国立病院九州がんセンター消化器外科), 馬場秀夫 (国立病院九州がんセンター消化器外科), 江見泰徳 (九州大学大学院医学研究院消化器外科学), 掛地吉弘 (九州大学大学院医学研究院消化器外科学), 田中真二 (九州大学大学院医学研究院消化器外科学), 織田信弥 (国立病院九州がんセンター臨床研究部病理研究室)

A. 研究目的

- I スキルス胃癌は早期に浸潤・転移をおこすため予後が極めて悪く、新しい診断法、そして治療法の確立が急務である。スキルス胃癌は著しい線維性間質を特徴とする低分化型腺癌であり、転移・浸潤能が高く予後は極めて悪いことが知られているが、その転移・浸潤に関する分子生物学的機序は不明な点が多い。近年、結合組織増殖因子 connective tissue growth factor (CTGF)、血管新生因子 Cyrteine-rich 61 (CYr61)、癌遺伝子 Nephroblastoma over-expressed (Nov)、Wnt 誘導遺伝子 Wnt-inducibile signaling pathway (WISP) を含む新しい増殖因子ファミリー CCN が報告され、新規癌化シグナル分子群として高い注目を集めている。CCN ファミリーの蛋白は、細胞外マトリックスの関連分子と相同性を持つ 4 つのドメインから構成されるという特徴的な分子構造を持っている。その遺伝子異常が systemic scleroderma, pseudorheumatoid dysplasia の原因であることが報告され、軟部組織の増殖、変性に機能するとされている。このように、CCN ファミリーは間質-細胞相互関係に重要と考えられているが、間質に特徴を持つスキルス胃癌との関連は不明である。本研究では、我々開発した targeted differential display 法を用いて、スキルス胃癌における CCN ファミリーの包括的遺伝子発現解析を行ない、スキルス胃癌成立における分子生物学的機序を明らかとすることを目的とした。
- II 細胞の DNA ミスマッチ修復活性は様々な抗癌剤への感受性を規定する因子としてクローズアップされている。悪性腫瘍治療において極めて重要な位置をしめる化学療法の治療ストラテジーを適正化することは急務である。しかしながら、このような重要な感受性規定

因子を正確にとらえることは難しい。我々はこのミス マッチ修復異常を正確にとらえるために、独自に開発した新しい高精度マイクロサテライト不安定性解析系を用いて、ミス マッチ修復異常を与えられた切除標品において正確に同定することを研究の目的とした。

- III 胃癌に対する TS-1 と TXT 併用療法の有用性を検証するため、ヒト胃癌株移植ヌードラットを用いて基礎的な検討を行う。
- IV 腫瘍の特性に応じた分子標的治療を実現するために、抗癌剤 (UFT) の血管新生抑制作用の機序を明らかにする。

B. 研究方法

- I CCN consensus 配列に対する targeted differential display 法を用いて、スキルス胃癌の癌部特異的発現遺伝子を同定した。さらに、細胞への遺伝子導入による蛋白解析、機能解析を行なった。
- II 腫瘍切除標本より抽出されたゲノム DNA を用いて、独立した染色体上に存在する 2 塩基繰り返し置換マイクロサテライト配列を蛍光プライマーを用いた PCR により増幅、産物を自動シーケンサーに泳動・解析、正常組織より得られたプロファイルと比較し、マイクロサテライト不安定性の有無を同定する。
- III ヒト胃腺癌由来の SC-2, St-40, 及び SC-4 腫瘍を皮下に移植したヌードラットを用い、Control, TS-1 単独、TXT 単独、及び TS-1+ TXT 併用群を比較した。TS-1 は群分け翌日 (Day 1) より 14 日間連日経口投与 (12 mg/kg/day)、TXT は Day1 又は Day8 に静脈内投与した (2 mg/kg)。抗腫瘍効果は腫瘍体積比 (投与前の腫瘍体積に対する比) 及び腫瘍増殖抑制率、毒性は体重変化率を指標として Day15 に評価した。
- IV UFT は 5-FU の pro-drug である tegafur と uracil を 1 : 4 モル比で配合した経口抗癌剤であるが、最近、tegafur から 5-FU への変換時に生じる代謝産物 GHB ( $\gamma$ -hydroxybutyric acid) および GBL ( $\gamma$ -butyrolactone) が in vitro において血管新生抑制作用を有することが報告されており、UFT の新たな作用として注目されている。UFT (te

gafur) ヒト臨床容量投与後のGBL (GHB) 体内動態について検討する。

UFT投与が臨床的に妥当と判断された胃癌術後症例で十分なICが得られた症例に対し、UFT投与後のヒト血漿中GBL動態を測定した。UFT 1日400 mg分25日間以上投与し定常状態に達した後、朝UFT 200 mg服薬前(0分)、服薬後30、60、120、240分に採血し、血漿分離して凍結保存した。GBLの定量はGC-MS法を用いた。胃癌10症例について測定した。

(倫理面への配慮)

UFTの投与が臨床的に妥当と判断される胃癌症例を選択しており、UFTの投与には何ら問題はない。合計6回の採血がこの臨床研究に関する新たな侵襲であるが、研究の趣旨を十分に説明し、同意を頂いた症例にのみ施行したので、倫理面に置いては問題ないと考えられる。

C. 研究結果

- I ICCNファミリーに対するtargeted differential display法により、スキルス胃癌特異的発現遺伝子としてvon Willebrand type Cドメインが欠損したWISP1 variant遺伝子を同定し、WISP1vと名付けた(GenBank登録: AB034725)。ヒトゲノムデータベースを用いたコンピューター解析によりWISP1翻訳領域は5つのexonから成立することが判明したが、第2ドメインであるvon Willebrand type C配列は第3 exonに全て含まれており、WISP1vはそのsplicing variantであることが明らかとなった。スキルス胃癌組織の解析ではsplicing donor site, acceptor siteにも明らかな遺伝子変異は認められなかった。またNIH3T3細胞を用いた遺伝子導入解析により、WISP1vは強い細胞形質変換能を持つ30kDaの分泌蛋白質であることが示された。さらにWISP1vは胃癌細胞Kato-IIIに対し細胞浸潤増強作用を示すことが明らかとなった。
- II 消化器癌を中心として多様な悪性腫瘍で網羅的にマイクロサテライト不安定性を解析したところ、興味深いことに、ヒト悪性腫瘍でみられるマイクロサテライト不安定性には2種類のカテゴリーが存在することがあきらかになった。ひとつは、変化の幅が6-bp以内にとどまるAタイプであり、今ひとつは8-bp以上に達するBタイプである。
- III Day 1でのTXT投与では、胃癌腫瘍株3株に対する腫瘍増殖抑制率はS-1単独群38.6~55.1%、TXT単独投与群(2 mg/kg) 42.1~51.7%、TS-1 + TXT併用群68.4~72.5%と、3株全てにTS-1とTXTの併用により単独投与に比べ有意な抗腫瘍効果の増強が認められた。Day 8でのTXT投与ではSC-2においてTS-1 + TXT併用は各々の単独投与より有意な抗腫瘍効果増強であった。一方毒性に関してはDay 8投与した群では併用による体重減少の増強が見られたが、Day 1投与では体重減少は比較的軽度であった。
- IV UFT投与後のGBLの濃度は30分、60分、120分、240分において、118.3 ng/ml、121.8、103.6、78.8であった。

D. 考察

- I CCNファミリーの分子構造は、典型的にはIGF-binding proteinドメイン、von Willebrand type Cドメイン、thrombo-spondin type 1ドメイン、cysteine knotドメインの4つのドメインから構成されている。しかし、Nov蛋白のoncogenic formでは第1ドメインが欠損しており、また、最近乳癌での発現が注目されているWISP2では、もともと第4ドメインが欠損した形をとっている。我々がスキルス胃癌で同定したWISP1vは第2ドメインが欠損しており、その作用機序のさらなる解析は、新たな癌化シグナル伝達の解明へと発展できる。WISP1v遺伝子の発見によりスキルス胃癌の早期診断や再発診断が可能となるばかりか、WISP1vレセプターの解析に基づくWISP1v標的治療の開発へと発展できる。このように本課題は基礎解析

のみならず、臨床治療への応用をめざした画期的な研究である。

- II これまで、マイクロサテライト不安定性は単純にミスマッチ修復異常に結び付けられていた。しかし、実際にはマイクロサテライト不安定性は2つのカテゴリーが存在し、ミスマッチ修復異常との関係も、これまで考えてこられたようには単純でないことが明らかになった。我々の研究グループによる諸解析によりAタイプのマイクロサテライト不安定性がミスマッチ修復異常を直接反映していることが明らかになりつつある。
- III Taxane系薬剤と5-FUとの併用に関するin vitroでの研究は、taxane → 5-FUのschedule dependencyがあるものの相加及び相乗効果が報告されている。今回のvivoの実験でday 1におけるTXT投与での併用が3腫瘍株いずれも単独に比較し有意に抗腫瘍効果が増強しており、TXT day 1投与の有用性が示された。Day 8投与でもSC-2腫瘍に於いてのみ併用療法における有意差が認められた。Day 8投与はschedule dependencyに関しては相反する結果であるが、5-FUの接触時間が長時間であった場合schedule dependencyが解消されるという別の報告を考慮すると、TS-1投与による5-FU有効血中濃度持続が、併用に関して有利に働いた可能性がある。
- IV GBLはVEGFで誘導されるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の管腔形成をIC50=25 ng/mlで阻害することが知られている。UFTの臨床用量の投与により、in vitroにおいて血管新生抑制作用を発現するGBL濃度を4時間以上にわたり維持しており、ヒト臨床においても血管新生抑制作用を発揮しうる可能性が示唆された。

E. 結論

- I スキルス胃癌からWnt誘導遺伝子に属するWISP1vをクローニングし、癌転移・浸潤に関与することを見出した。WISP1vは分泌蛋白質であり、診断のみならず分子標的としての可能性を持つことが示唆された。
- II 化学療法ストラテジーを適正化するためには、抗癌剤への感受性を事前に予測可能にする感受性規定因子の同定が不可欠である。多様な抗癌剤感受性を規定するとされるミスマッチ修復活性は、最も重要な感受性規定因子の一つと考えられる。しかしながら、腫瘍におけるミスマッチ修復異常を正確に同定するためには、正確なマイクロサテライト不安定性解析が必要となる。我々の研究が進捗することで、高精度なマイクロサテライト不安定性解析系が確立され、また観察されたマイクロサテライト不安定性の正確な意義が明らかになると結論される。
- III TS-1とTXT併用療法は、特にDay 1にTXTを併用することで毒性の上昇が軽度な範囲で抗腫瘍効果の増強が認められた。臨床において有用性を検証する意義があるものと考えられた。
- IV ヒト生体内においてもUFTの抗腫瘍効果発現にGBLの血管新生抑制作用が関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

- I WISP1vの発現解析により、スキルス胃癌の早期発見に貢献できる可能性がある。

G. 研究発表

I 発表論文

- 1) Mori M, et al. Absence of Msh2 protein expression is associated with alteration in the FHT1 locus and Fhit protein expression in colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 61(20): 7379-82, 2001
- 2) Tanaka S, Ueo H, Mafune K, Mori M, Wands JR, Sugimachi K. A novel isoform of human FGF 8 is induced by androgens and associated with progression of esophageal carcinoma. *Dig Dis Sci*, 46(5): 1016-21, 2001
- 3) Tanaka S, et al. A novel variant of WISP1 lacking a Von Willebrand type C module overexpressed in scirrhous

- gastric carcinoma. *Oncogene*, 20(39): 5525-32, 2001
- 4) Tanaka S., et al. A novel isoform of human FGF 8 is induced by androgens and associated with progression of esophageal carcinoma. *Dig Dis Sci*, 46(5): 1016-21, 2001

#### 学会発表

- 1) 第55回日本消化器外科学会、平成13年7月26日、秋田  
田中真二 他「シンポジウム：肝内胆管細胞癌の遺伝子発現解析と新規アポトーシス誘導因子 TRAIL の治療応用」
- 2) 第39回日本癌治療学会総会、平成13年11月9日、広島  
田中真二 他「シンポジウム：新しい肝癌血管新生因子 Angiopoietin-2 の同定と機能抑制分子の開発」

#### II

##### 発表論文

- 1) Endo K., Maehara Y., Baba H., Ikeda Y., Tokunaga E., Koga T., Toh Y., Kohnoe S., Okamura T., Nakajima M., Sugimachi K.  
Heparanase gene expression and metastatic potential in human gastric cancer.  
*(Anticancer Research 21 : 3365-3370,2001)*
- 2) Maehara Y, Oda S., Sugimachi K:  
The instability within: problems in current analyses of microsatellite instability.  
*Mutation Res 461: 249-263, 2001*
- 3) Ikeda Y, Oda S., Abe T, Ohno S, Maehara Y, Sugimachi K:  
Features of microsatellite instability in colorectal cancer: comparison between colon and rectum.  
*Oncology 61: 168-174, 2001*
- 4) Oda S., Maehara Y, Sugimachi K:  
Microsatellite instability in cancer: what problems remain unanswered?  
*Surgery 131: S55-S62, 2002*

#### 学会発表

第60回日本癌学会総会(平成12年9月26-28日、横浜)  
ヒト癌にみられる2つのマイクロサテライト不安定性：  
ミスマッチ修復異常との異なる関係  
織田 信弥、前原 喜彦、杉町 圭蔵

##### 発表論文

- 1) Maruyama A, Miyamoto S, Saito T, Kondo H, Baba H., Tsukamoto N  
Clinicopathological and familial characteristics of endometrial cancer with multiple primary cancers in relation to the loss of protein expression of MSH2 and MLH1.  
*Cancer 2001;91:2056-64.*
- 2) Miyamoto S, maruyama A, okugawa K, Akazawa K, Baba H., Wada S, Maehara Y, Mekada E, Nakano H, Tsukamoto N, Saito T:  
Loss of motility-related protein (MRP-1/CD9) and integrin  $\alpha$  expression in endometrial cancers.  
*Cancer 2001;92: 542-8.*
- 3) Hamatake M, Ishida T, Yamazaki K, Baba H., Maehara Y, Sugio K, Sugimachi K:  
Lung cancer with p53 expression and a solitary metastasis to the stomach: A case report.  
*Ann Thorac Cardiovasc Surg 2001;7:162-5.*
- 4) Maehara Y, Kakeji Y, Oda S, Baba H., Sugimachi K:  
Tumor growth patterns and biological characteristics of early gastric carcinoma.  
*Oncology 2001;61:102-112.*
- 5) Endo K., Maehara Y., Baba H., Ikeda Y., Tokunaga E., Koga T., Toh Y., Kohnoe S., Okamura T., Nakajima M., Sugimachi K.  
Heparanase gene expression and metastatic potential in human gastric cancer.

(*Anticancer Research 21 : 3365-3370,2001*)

- 6) Maehara Y, Baba H., Sugimachi K:  
Adjuvant chemotherapy for gastric cancer:  
A comprehensive review  
*Gastric Cancer 2001;4:175-184.*

#### III

##### 発表論文

- 1) Kakeji Y., Maehara Y, Koga S, Shibahara K, Kabashima A, Tokunaga E, Sugimachi K:  
Gastric cancer with high telomerase activity shows rapid development and invasiveness.  
*Oncology Reports 8:107-110, 2001.*
- 2) Takeuchi H, Maehara Y, Tokunaga E, Koga T, Kakeji Y., Sugimachi K:  
Prognostic significance of natural killer cell activity in patients with gastric carcinoma: a multivariate analysis.  
*Am J Gastroentel 96:574-578, 2001.*
- 3) Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y., Sugimachi K:  
Overexpression of vascular endothelial growth factor C is related to lymphogenous metastasis in early gastric carcinoma.  
*Oncology 60: 146-150, 2001.*
- 4) Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y., Yonemura T, Sugimachi K:  
Growth pattern and expressions of cell cycle regulator proteins p53 and p21WAF1/CIP1 in early gastric carcinoma.  
*Cancer 92:1828-1835, 2001.*

#### 学会発表

- 1) 第39回日本癌治療学会(平成13年10月、広島)  
ヒト胃癌株-ヌードラット移植モデルを用いた TS-1 と Docetaxel(TXT) 併用療法の有効性に関する基礎的研究
- 2) 第74回日本胃癌学会(平成14年2月、東京)  
ヒト胃癌株-ヌードラット移植モデルを用いた TS-1 と Docetaxel(TXT) 併用療法の有効性に関する基礎的研究

##### 発表論文

- 1) 北野正剛、安田一弘、白石憲男、安達洋祐  
胃癌治療の最近の進歩と今後の問題点  
4.早期胃癌に対する腹腔鏡下手術の適応と限界：  
根治性をいかにして確保するか  
*日本外科学会雑誌 102(10):749-752, 2001*

#### IV

##### 発表論文

- (1) Utsunomiya T., Emi Y., Ikejiri K., Suzuki M., Saito H., Yakabe S., Nonaka M., Saku M., Yoshida K., Shimada M., Sugimachi K.  
Retrospective study on the effects of lipiodolization before a potentially curative hepatectomy for colorectal liver metastases: Long-term results of a pilot study.  
*Hepato-Gastroenterology. 48(39): 790-793, 2001*

#### 学会発表

- (1) 11th World congress of the International Association of Surgeons & Gastroenterologists. (November 1-4,2001, Heraklion, Greece) Current chemotherapy for gastric cancer. Emi Y., Sumiyoshi Y., Kimura Y., Kakeji Y., Baba H., Kohnoe S., Maehara Y., Okamura T., Sugimachi K.
- (2) 第39回日本癌治療学会総会  
(平成13年11月7-9日、広島)  
乳癌術後再発時期、形式と HER2/new 発現  
江見泰徳、住吉康史、掛地吉弘、北村薫、筒井信一、前原喜彦、杉町圭蔵

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### I

1. 特許取得 なし  
2. 実用新案登録 なし  
3. その他 GenBank 登録: AB034725

ヒト胃癌株-ヌードラット移植モデルを用いた TS-1 と Docetaxel(TXT) 併用療法の有効性に関する基礎的研究  
(主任) 研究者 前原喜彦 九州大学大学院消化器・総合外科(第二外科)

## 研究要旨

胃癌に対する TS-1 と TXT 併用療法の有用性を検証するため、ヒト胃腺癌由来 SC-2, St-40, 及び SC-4 を移植したヌードラットを用い、併用による抗腫瘍効果及び毒性増強の有無を検討した。TS-1 と TXT の併用により各々単独投与に比べ抗腫瘍効果の増強が認められ、特に TXT を Day1 に併用するスケジュールでは 3 株とも併用効果が得られた。Day1 投与では Day 8 投与に比較し体重減少は軽度であった。TS-1 と TXT 併用療法は、臨床において有用性を検証する意義があると考えられた。

## 分担研究者

北野 正剛

(大分医科大学・第一外科)

分担研究者 掛地吉弘との共同研究

## A. 研究目的

胃癌に対する TS-1 と TXT 併用療法の有用性を検証するため、ヒト胃癌株移植ヌードラットを用いて基礎的な検討を行う。

## B. 研究方法

ヒト胃腺癌由来の SC-2, St-40, 及び SC-4 腫瘍を皮下に移植したヌードラットを用い、Control, TS-1 単独、TXT 単独、及び TS-1+ TXT 併用群を比較した。TS-1 は群分け翌日 (Day 1) より 14 日間連日経口投与 (12 mg/kg/day)、TXT は Day1 又は Day8 に静脈内投与した (2 mg/kg)。抗腫瘍効果は腫瘍体積比 (投与前の腫瘍体積に対する比) 及び腫瘍増殖抑制率、毒性は体重変化率を指標として Day15 に評価した。

## C. 研究結果

Day 1 での TXT 投与では、胃癌腫瘍株 3 株に対する腫瘍増殖抑制率は S-1 単独群 38.6~55.1%、TXT 単独投与群 (2 mg/kg) 42.1~51.7%、TS-1 + TXT 併用群 68.4~72.5% と、3 株全てに TS-1 と TXT の併用により単独投与に比べ有意な抗腫瘍効果の増強が認められた。Day 8 での TXT 投与では SC-2 において TS-1 + TXT 併用は各々の単独投与より有意な抗腫瘍効果増強であった。一方毒性に関しては Day8 投与した群では併用による体重減少の増強が見られたが、Day1 投与では体重減少は比較的軽度であった。

## D. 考察

Taxane 系薬剤と 5-FU との併用に関する *in vitro* での研究は、taxane → 5-FU の schedule dependency があるものの相加及び相乗効果が報告されている。今回の *vivo* の実験で day 1 における TXT 投与での併用が 3 腫瘍株いずれも単独に比較し有意に抗腫瘍効果が増強しており、TXT day 1 投与の有用性が示された。Day 8 投与でも SC-2 腫瘍に於いてのみ併用療法における有意差が認められた。Day 8 投与は schedule dependency に関しては相反する結果であるが、5-FU の接触時間が長時間であった場合 schedule dependency が解消されるという別の報告を考慮すると、TS-1 投与による 5-FU 有効血中濃度持続が、併用に関して有利に働いた可能性がある。

## E. 結論

TS-1 と TXT 併用療法は、特に Day1 に TXT を併用することで毒性の上昇が軽度な範囲で抗腫瘍効果の増強が認められた。臨床において有用性を検証する意義があるものと考えられた。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

## G. 研究発表

### 発表論文

1) 北野正剛、安田一弘、白石憲男、安達洋祐

胃癌治療の最近の進歩と今後の問題点

4. 早期胃癌に対する腹腔鏡下手術の適応と限界:

根治性をいかにして確保するか

日本外科学会雑誌 102(10):749-752, 2001

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項なし

スキルス胃癌の特異的発現遺伝子 WISP1V に関する研究

主任研究者 前原喜彦 九州大学大学院 消化器・総合外科

研究要旨

我々は targeted differential display 法を用いたクローニングにより、新しい癌関連遺伝子を発表している (Tanaka et al. *PNAS* 1998, *JCI* 1998, *JCI* 1999)。スキルス胃癌は早期に浸潤・転移をおこすため予後が極めて悪く、新しい診断法、そして治療法の確立が急務である。今回、targeted differential display 法を用いてスキルス胃癌の特異的発現遺伝子 WISP1v を発見し (GenBank 登録: AB034725)、WISP1v 分子が分泌蛋白質であること、細胞浸潤機能を持つことを解明した (Tanaka et al. *Oncogene* 2001)。この新しい遺伝子の発見により、スキルス胃癌の早期診断や再発診断が可能となるばかりか、WISP1v レセプターの解析に基づく WISP1v 標的治療の開発へと発展できる。このように本課題は基礎解析のみならず、臨床治療への応用をめざした画期的な研究である。

分担研究者:

森 正樹

生体防御医学研究所腫瘍外科 教授

分担研究者 田中真二との共同研究

A. 研究目的

スキルス胃癌は早期に浸潤・転移をおこすため予後が極めて悪く、新しい診断法、そして治療法の確立が急務である。スキルス胃癌は著しい線維性間質を特徴とする低分化型腺癌であり、転移・浸潤能が高く予後は極めて悪いことが知られているが、その転移・浸潤に関する分子生物学的機序は不明な点が多い。近年、結合組織増殖因子 connective tissue growth factor (CTGF)、血管新生因子 Cyrteine-rich 61 (CYR61)、癌遺伝子 Nephroblastoma over-expressed (Nov)、Wnt 誘導遺伝子 Wnt-inducible signaling pathway (WISP) を含む新しい増殖因子ファミリー CCN が報告され、新規癌化シグナル分子群として高い注目を集めている。CCN ファミリーの蛋白は、細胞外マトリックスの関連分子と相同性を持つ 4 つのドメインから構成されるという特徴的な分子構造を持っている。その遺伝子異常が systemic scleroderma、pseudorheumatoid dysplasia の原因であることが報告され、軟部組織の増殖、変性に機能するとされている。このように、CCN ファミリーは間質-細胞相互関係に重要と考えられているが、間質に特徴を持つスキルス胃癌との関連は不明である。本研究では、我々開発した targeted differential display 法を用いて、スキルス胃癌における CCN ファミリーの包括的遺伝子発現解析を行ない、スキルス胃癌成立における分子生物学的機序を明らかとすることを目的とした。

B. 研究方法

CCN consensus 配列に対する targeted differential display 法を用いて、スキルス胃癌の癌部特異的発現遺伝子を同定した。さらに、細胞への遺伝子導入による蛋白解析、機能解析を行なった。

C. 研究結果

CCN ファミリーに対する targeted differential display 法により、スキルス胃癌特異的発現遺伝子として von Willebrand type C ドメインが欠損した WISP1 variant 遺伝子を同定し、WISP1v と名付けた (GenBank 登録: AB034725)。ヒトゲノムデータベースを用いたコンピューター解析により WISP1 翻訳領域は 5 つの exon から成立することが判明したが、第 2 ドメインである von Willebrand type C 配列は第 3 exon に全て含まれており、WISP1v はその splicing variant であることが明らかとなった。スキルス胃癌組織の解析では splicing donor site, acceptor site にも明らかない遺伝子変異は認められなかった。また NIH3T3 細胞を用いた遺伝子導入

解析により、WISP1v は強い細胞形質変換能を持つ 30kDa の分泌蛋白質であることが示された。さらに WISP1v は胃癌細胞 Kato-III に対し細胞浸潤増強作用を示すことが明らかとなった。

D. 考察

CCN ファミリーの分子構造は、典型的には IGF-binding protein ドメイン、von Willebrand type C ドメイン、thrombo-spondin type 1 ドメイン、cysteine knot ドメインの 4 つのドメインから構成されている。しかし、Nov 蛋白の oncogenic form では第 1 ドメインが欠損しており、また、最近乳癌での発現が注目されている WISP2 では、もともと第 4 ドメインが欠損した形をとっている。我々がスキルス胃癌で同定した WISP1v は第 2 ドメインが欠損しており、その作用機序のさらなる解析は、新たな癌化シグナル伝達の解明へと発展できる。WISP1v 遺伝子の発見によりスキルス胃癌の早期診断や再発診断が可能となるばかりか、WISP1v レセプターの解析に基づく WISP1v 標的治療の開発へと発展できる。このように本課題は基礎解析のみならず、臨床治療への応用をめざした画期的な研究である。

E. 結論

スキルス胃癌から Wnt 誘導遺伝子に属する WISP1v をクローニングし、癌転移・浸潤に関与することを見出した。WISP1v は分泌蛋白質であり、診断のみならず分子標的としての可能性を持つことが示唆された。

F. 健康危険情報

WISP1v の発現解析により、スキルス胃癌の早期発見に貢献できる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori M, et al. Absence of Msh2 protein expression is associated with alteration in the FHTT locus and Fhit protein expression in colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 61(20): 7379-82, 2001
- 2) Tanaka S, Ueo H, Mafune K, Mori M, Wands JR, Sugimachi K. A novel isoform of human FGF 8 is induced by androgens and associated with progression of esophageal carcinoma. *Dig Dis Sci*, 46(5): 1016-21, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 GenBank 登録: AB034725

消化器癌におけるマイクロサテライト不安定性とミスマッチ修復異常に関する研究

主任研究者 前原喜彦 九州大学大学院 消化器・総合外科

研究要旨

DNA ミスマッチ修復活性は多様な抗癌剤の感受性規定因子として知られ、その異常はマイクロサテライト不安定性により検索される。我々は従来の手法の問題点を解決した新しい解析系を確立し、胃癌を含めた多様な悪性腫瘍において網羅的に解析を行った。その結果、マイクロサテライト不安定性にはA,Bの2つのサブタイプが存在し、Aタイプがミスマッチ修復異常に直接起因する変化であることを同定した。

分担研究者；

鴻江 俊治

(国立病院九州がんセンター・消化器外科)

分担研究者 織田信弥との共同研究

A. 研究目的

細胞のDNA ミスマッチ修復活性は様々な抗癌剤への感受性を規定する因子としてクローズアップされている。悪性腫瘍治療において極めて重要な位置をしめる化学療法の治療戦略を適正化することは急務である。しかしながら、このような重要な感受性規定因子を正確にとらえることは難しい。我々はこのミスマッチ修復異常を正確にとらえるために、独自に開発した新しい高精度マイクロサテライト不安定性解析系を用いて、ミスマッチ修復異常を与えられた切除標本において正確に同定することを研究の目的とした。

B. 研究方法

腫瘍切除標本より抽出されたゲノムDNAを用いて、独立した染色体上に存在する2塩基繰り返しミスマッチマイクロサテライト配列を蛍光プライマーを用いたPCRにより増幅、産物を自動シーケンサーに泳動・解析、正常組織より得られたプロファイルと比較し、マイクロサテライト不安定性の有無を同定する。

C. 研究結果

消化器癌を中心として多様な悪性腫瘍で網羅的にマイクロサテライト不安定性を解析したところ、興味深いことに、ヒト悪性腫瘍でみられるマイクロサテライト不安定性には2種類のカテゴリーが存在することがあきらかになった。ひとつは、変化の幅が6-bp以内にとどまるAタイプであり、今ひとつは8-bp以上に達するBタイプである。

D. 考察

これまで、マイクロサテライト不安定性は単純にミスマッチ修復異常に結び付けられていた。しかし、実際にはマイクロサテライト不安定性は2つのカテゴリーが存在し、ミスマッチ修復異常との関係も、これまで考えてこられたようには単純でないことが明らかになった。我々の研究グループによる諸解析によりAタイプのマイクロサテライト不安定性がミスマッチ修復異常を直接反映していることが明らかに

なりつつある。

E. 結論

化学療法戦略を適正化するためには、抗癌剤への感受性を事前に予測可能にする感受性規定因子の同定が不可欠である。多様な抗癌剤感受性を規定するとされるミスマッチ修復活性は、最も重要な感受性規定因子の一つと考えられる。しかしながら、腫瘍におけるミスマッチ修復異常を正確に同定するためには、正確なマイクロサテライト不安定性解析が必要となる。我々の研究が進捗することで、高精度なマイクロサテライト不安定性解析系が確立され、また観察されたマイクロサテライト不安定性の正確な意義が明らかになると結論される。

F. 健康危険情報

当該事項なし。

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Endo K., Machara Y., Baba H., Ikeda Y., Tokunaga E., Koga T., Toh Y., Kohnoe S., Okamura T., Nakajima M., Sugimachi K.  
Heparanase gene expression and metastatic potential in human gastric cancer.  
(Anticancer Research 21 : 3365-3370,2001)

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

当該事項なし。



消化器癌におけるマイクロサテライト不安定性とミスマッチ修復異常に関する研究

主任研究者 前原 喜彦 九州大学大学院 消化器・総合外科

研究要旨

DNA ミスマッチ修復活性は多様な抗癌剤の感受性規定因子として知られ、その異常はマイクロサテライト不安定性により検索される。我々は従来の手法の問題点を解決した新しい解析系を確立し、胃癌を含めた多様な悪性腫瘍において網羅的に解析を行った。その結果、マイクロサテライト不安定性にはA,Bの2つのサブタイプが存在し、Aタイプがミスマッチ修復異常に直接起因する変化であることを同定した。

分担研究者；

馬場 秀夫

(国立病院九州がんセンター・消化器外科)

分担研究者 織田信弥との共同研究

A. 研究目的

細胞のDNA ミスマッチ修復活性は様々な抗癌剤への感受性を規定する因子としてクローズアップされている。悪性腫瘍治療において極めて重要な位置をしめる化学療法の治療ストラテジーを適正化することは急務である。しかしながら、このような重要な感受性規定因子を正確にとらえることは難しい。我々はこのミスマッチ修復異常を正確にとらえるために、独自に開発した新しい高精度マイクロサテライト不安定性解析系を用いて、ミスマッチ修復異常を与えられた切除標品において正確に同定することを研究の目的とした。

B. 研究方法

腫瘍切除標本より抽出されたゲノムDNAを用いて、独立した染色体上に存在する2塩基繰り替えしマイクロサテライト配列を蛍光プライマーを用いたPCRにより増幅、産物を自動シーケンサーに泳動・解析、正常組織より得られたプロファイルと比較し、マイクロサテライト不安定性の有無を同定する。

C. 研究結果

消化器癌を中心として多様な悪性腫瘍で網羅的にマイクロサテライト不安定性を解析したところ、興味深いことに、ヒト悪性腫瘍でみられるマイクロサテライト不安定性には2種類のカテゴリーが存在することがあきらかになった。ひとつは、変化の幅が6-bp以内にとどまるAタイプであり、今ひとつは8-bp以上に達するBタイプである。

D. 考察

これまで、マイクロサテライト不安定性は単純にミスマッチ修復異常に結び付けられていた。しかし、実際にはマイクロサテライト不安定性は2つのカテゴリーが存在し、ミスマッチ修復異常との関係も、これまで考えてこられたようには単純でないことが明らかになった。我々の研究グループによる諸解析によりAタイプのマイクロサテライト不安定性がミスマッチ修復異常を直接反映していることが明らかになりつつある。

E. 結論

化学療法ストラテジーを適正化するためには、抗癌剤への感受性を事前に予測可能にする感受性規定因子の同定が不可欠である。多様な抗癌剤感受性を

規定するとされるミスマッチ修復活性は、最も重要な感受性規定因子の一つと考えられる。しかしながら、腫瘍におけるミスマッチ修復異常を正確に同定するためには、正確なマイクロサテライト不安定性解析が必要となる。我々の研究が進捗することで、高精度なマイクロサテライト不安定性解析系が確立され、また観察されたマイクロサテライト不安定性の正確な意義が明らかになると結論される。

F. 健康危険情報

当該事項なし。

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Maruyama A, Miyamoto S, Saito T, Kondo H, Baba H, Tsukamoto N  
Clinicopathological and familial characteristics of endometrial cancer with multiple primary cancers in relation to the loss of protein expression of MSH2 and MLH 1.  
Cancer 2001;91:2056-64.
- 2) Miyamoto S, maruyama A, okugawa K, Akazawa K, Baba H, Wada S, Maehara Y, Mekada E, Nakano H, Tsukamoto N, Saito T:  
Loss of motility-related protein (MRP-1/CD9) and integrin  $\alpha$  expression in endometrial cancers.  
Cancer 2001;92: 542-8.
- 3) Hamatake M, Ishida T, Yamazaki K, Baba H, Maehara Y, Sugio K, Sugimachi K:  
Lung cancer with p53 expression and a solitary metastasis to the stomach: A case report.  
Ann Thorac Cardiovasc Surg 2001;7:162-5.
- 4) Maehara Y, Kakeji Y, Oda S, Baba H, Sugimachi K:  
Tumor growth patterns and biological characteristics of early gastric carcinoma.  
Oncology 2001;61:102-112.
- 5) Endo K, Maehara Y, Baba H, Tokunaga E, Koga T, Ikeda Y, Toh Y, Kohnoe S, Okamura T, Nakajima M, Sugimachi K:  
Heparanase gene expression and metastatic potential in human gastric cancer.  
Anticancer Res 2001;21:3365-3370
- 6) Maehara Y, Baba H, Sugimachi K:  
Adjuvant chemotherapy for gastric cancer: A comprehensive review  
Gastric Cancer 2001;4:175-184.

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)  
当該事項なし。

UFTの血管新生抑制作用に関する基礎的研究  
(主任) 研究者 前原喜彦 九州大学大学院消化器・総合外科(第二外科)

研究要旨

胃癌術後症例のUFT内服後のヒト血漿中GBL(GHB)濃度の推移を測定したところ、*in vitro*において血管新生抑制作用を発現するGBL 25 ng/mg以上を4時間にわたり維持しており、ヒト生体内においてもUFTの抗腫瘍効果発現にGBLの血管新生抑制作用が関与している可能性が示唆された。

分担研究者

江見 泰徳  
(広島赤十字・原爆病院)

用を発現するGBL濃度を4時間以上にわたり維持しており、ヒト臨床においても血管新生抑制作用を発揮しうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

腫瘍の特性に応じた分子標的治療を実現するために、抗癌剤(UFT)の血管新生抑制作用の機序を明らかにする。

E. 結論

ヒト生体内においてもUFTの抗腫瘍効果発現にGBLの血管新生抑制作用が関与している可能性が示唆された。

B. 研究方法

UFTは5-FUのpro-drugであるtegafurとuracilを1:4モル比で配合した経口抗癌剤であるが、最近、tegafurから5-FUへの変換時に生じる代謝産物GHB( $\gamma$ -hydroxybutyric acid)およびGHB( $\gamma$ -butyrolactone)が*in vitro*において血管新生抑制作用を有することが報告されており、UFTの新たな作用として注目されている。UFT(tegafur)ヒト臨床容量投与後のGBL(GHB)体内動態について検討する。

UFT投与が臨床的に妥当と判断された胃癌術後症例で十分なICが得られた症例に対し、UFT投与後のヒト血漿中GBL動態を測定した。UFT1日400 mg分2-5日間以上投与し定常状態に達した後、朝UFT 200 mg服薬前(0分)、服薬後30、60、120、240分に採血し、血漿分離して凍結保存した。GBLの定量はGC-MS法を用いた。胃癌10症例について測定した。

(倫理面への配慮)

UFTの投与が臨床的に妥当と判断される胃癌症例を選択しており、UFTの投与には何ら問題はない。合計6回の採血がこの臨床研究に関する新たな侵襲であるが、研究の趣旨を十分に説明し、同意を頂いた症例にのみ施行したので、倫理面に置いては問題ないと考えられる。

C. 研究結果

UFT投与後のGBLの濃度は30分、60分、120分、240分において、118.3 ng/ml、121.8、103.6、78.8であった。

D. 考察

GBLはVEGFで誘導されるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の管腔形成をIC<sub>50</sub>=25 ng/mlで阻害することが知られている。UFTの臨床用量の投与により、*in vitro*において血管新生抑制作

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表

発表論文

- (1) Utsunomiya T., Emi Y., Ikejiri K., Suzuki M., Saitsu H., Yakabe S., Nonaka M., Saku M., Yoshida K., Shimada M., Sugimachi K.  
Retrospective study on the effects of lipiodolization before a potentially curative hepatectomy for colorectal liver metastases: Long-term results of a pilot study. *Hepato-Gastroenterology*. 48(39): 790-793, 2001

学会発表

- (1) 11th World congress of the International Association of Surgeons & Gastroenterologists. (November 1-4, 2001, Heraklion, Greece) Current chemotherapy for gastric cancer. Emi Y., Sumiyoshi Y., Kimura Y., Kakeji Y., Baba H., Kohnoe S., Maehara Y., Okamura T., Sugimachi K.  
(2) 第39回日本癌治療学会総会  
(平成13年11月7-9日、広島)  
乳癌術後再発時期、形式とHER2/new発現  
江見泰徳、住吉康史、掛地吉弘、北村薫、筒井信一、前原喜彦、杉町圭蔵

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項なし

ヒト胃癌株-ヌードラット移植モデルを用いた TS-1 と Docetaxel(TXT) 併用療法の有効性に関する基礎的研究  
(主任) 研究者 前原喜彦 九州大学大学院消化器・総合外科 (第二外科)

## 研究要旨

胃癌に対する TS-1 と TXT 併用療法の有用性を検証するため、ヒト胃腺癌由来 SC-2, St-40, 及び SC-4 を移植したヌードラットを用い、併用による抗腫瘍効果及び毒性増強の有無を検討した。TS-1 と TXT の併用により各々単独投与に比べ抗腫瘍効果の増強が認められ、特に TXT を Day1 に併用するスケジュールでは3株とも併用効果が得られた。Day1 投与では Day 8 投与に比較し体重減少は軽度であった。TS-1 と TXT 併用療法は、臨床において有用性を検証する意義があると考えられた。

## 分担研究者

掛地 吉弘

(九州大学大学院消化器・総合外科)

## A. 研究目的

胃癌に対する TS-1 と TXT 併用療法の有用性を検証するため、ヒト胃癌株移植ヌードラットを用いて基礎的な検討を行う。

## B. 研究方法

ヒト胃腺癌由来の SC-2, St-40, 及び SC-4 腫瘍を皮下に移植したヌードラットを用い、Control, TS-1 単独、TXT 単独、及び TS-1+ TXT 併用群を比較した。TS-1 は群分け翌日 (Day 1) より 14 日間連日経口投与 (12 mg/ kg/ day)、TXT は Day1 又は Day8 に静脈内投与した (2 mg/ kg)。抗腫瘍効果は腫瘍体積比 (投与前の腫瘍体積に対する比) 及び腫瘍増殖抑制率、毒性は体重変化率を指標として Day15 に評価した。

## C. 研究結果

Day 1 での TXT 投与では、胃癌腫瘍株 3 株に対する腫瘍増殖抑制率は S-1 単独群 38.6~55.1%、TXT 単独投与群 (2 mg/kg) 42.1~51.7%、TS-1 + TXT 併用群 68.4~72.5% と、3 株全てに TS-1 と TXT の併用により単独投与に比べ有意な抗腫瘍効果の増強が認められた。Day 8 での TXT 投与では SC-2 において TS-1 + TXT 併用は各々の単独投与より有意な抗腫瘍効果増強であった。一方毒性に関しては Day8 投与した群では併用による体重減少の増強が見られたが、Day1 投与では体重減少は比較的軽度であった。

## D. 考察

Taxane 系薬剤と 5-FU との併用に関する *in vitro* での研究は、taxane →5-FU の schedule dependency があるものの相加及び相乗効果が報告されている。今回の *vivo* の実験で day 1 における TXT 投与での併用が 3 腫瘍株いずれも単独に比較し有意に抗腫瘍効果が増強しており、TXT day 1 投与の有用性が示された。Day 8 投与でも SC-2 腫瘍に於いてのみ併用療法における有意差が認められた。Day 8 投与は schedule dependency に関しては相反する結果であるが、5-FU の接触時間が長時間であった場合 schedule dependency が解消されるという別の報告を考慮すると、TS-1 投与による 5-FU 有効血中濃度持続が、併用に関して有利に働いた可能性がある。

## E. 結論

TS-1 と TXT 併用療法は、特に Day1 に TXT を併用することで毒性の上昇が軽度な範囲で抗腫瘍効果の増強が認められた。臨床において有用性を検証する意義があるものと考えられた。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

## G. 研究発表

### 発表論文

- 1) Kakeji Y, Maehara Y, Koga S, Shibahara K, Kabashima A, Tokunaga E, Sugimachi K: Gastric cancer with high telomerase activity shows rapid development and invasiveness. *Oncology Reports* 8:107-110, 2001.
- 2) Takeuchi H, Maehara Y, Tokunaga E, Koga T, Kakeji Y, Sugimachi K: Prognostic significance of natural killer cell activity in patients with gastric carcinoma: a multivariate analysis. *Am J Gastroentel* 96:574-578, 2001.
- 3) Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Sugimachi K: Overexpression of vascular endothelial growth factor C is related to lymphogenous metastasis in early gastric carcinoma. *Oncology* 60: 146-150, 2001.
- 4) Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K: Growth pattern and expressions of cell cycle regulator proteins p53 and p21WAF1/CIP1 in early gastric carcinoma. *Cancer* 92:1828-1835, 2001.

### 学会発表

- 1) 第 39 回日本癌治療学会 (平成 13 年 10 月、広島) ヒト胃癌株-ヌードラット移植モデルを用いた TS-1 と Docetaxel(TXT) 併用療法の有効性に関する基礎的研究
- 2) 第 74 回日本胃癌学会 (平成 14 年 2 月、東京) ヒト胃癌株-ヌードラット移植モデルを用いた TS-1 と Docetaxel(TXT) 併用療法の有効性に関する基礎的研究

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項なし

スキルス胃癌の特異的発現遺伝子 WISP1V に関する研究

主任研究者 前原喜彦 九州大学大学院 消化器・総合外科

研究要旨

我々は targeted differential display 法を用いたクローニングにより、新しい癌関連遺伝子を発表している (Tanaka et al. PNAS1998, JCI1998, JCI1999)。スキルス胃癌は早期に浸潤・転移をおこすため予後が極めて悪く、新しい診断法、そして治療法の確立が急務である。今回、targeted differential display 法を用いてスキルス胃癌の特異的発現遺伝子 WISP1v を発見し (GenBank 登録: AB034725)、WISP1v 分子が分泌蛋白質であること、細胞浸潤機能を持つことを解明した (Tanaka et al. Oncogene 2001)。この新しい遺伝子の発見により、スキルス胃癌の早期診断や再発診断が可能となるばかりか、WISP1v レセプターの解析に基づく WISP1v 標的治療の開発へと発展できる。このように本課題は基礎解析のみならず、臨床治療への応用をめざした画期的な研究である。

分担研究者:

田中 真二  
九州大学大学院医学研究院助手

A. 研究目的

スキルス胃癌は早期に浸潤・転移をおこすため予後が極めて悪く、新しい診断法、そして治療法の確立が急務である。スキルス胃癌は著しい線維性間質を特徴とする低分化型腺癌であり、転移・浸潤能が高く予後は極めて悪いことが知られているが、その転移・浸潤に関する分子生物学的機序は不明な点が多い。近年、結合組織増殖因子 connective tissue growth factor (CTGF)、血管新生因子 Cyrteine-rich 61 (Cyr61)、癌遺伝子 Nephroblastoma over-expressed (Nov)、Wnt 誘導遺伝子 Wnt-inducible signaling pathway (WISP) を含む新しい増殖因子ファミリー CCN が報告され、新規癌化シグナル分子群として高い注目を集めている。CCN ファミリーの蛋白は、細胞外マトリックスの関連分子と相同性を持つ4つのドメインから構成されるという特徴的な分子構造を持っている。その遺伝子異常が systemic scleroderma、pseudorheumatoid dysplasia の原因であることが報告され、軟部組織の増殖、変性に機能するとされている。このように、CCN ファミリーは間質-細胞相互関係に重要と考えられているが、間質に特徴を持つスキルス胃癌との関連は不明である。本研究では、我々開発した targeted differential display 法を用いて、スキルス胃癌における CCN ファミリーの包括的遺伝子発現解析を行ない、スキルス胃癌成立における分子生物学的機序を明らかとすることを目的とした。

B. 研究方法

CCN consensus 配列に対する targeted differential display 法を用いて、スキルス胃癌の癌部特異的発現遺伝子を同定した。さらに、細胞への遺伝子導入による蛋白解析、機能解析を行なった。

C. 研究結果

CCN ファミリーに対する targeted differential display 法により、スキルス胃癌特異的発現遺伝子として von Willebrand type C ドメインが欠損した WISP1 variant 遺伝子を同定し、WISP1v と名付けた (GenBank 登録: AB034725)。ヒトゲノムデータベースを用いたコンピューター解析により WISP1 翻訳領域は5つの exon から成立することが判明したが、第2ドメインである von Willebrand type C 配列は第3 exon に全て含まれており、WISP1v はその splicing variant であることが明らかとなった。スキルス胃癌組織の解析では splicing donor site, acceptor site にも明らかな遺伝子変異は認められなかった。また NIH3T3 細胞を用いた遺伝子導入解析により、WISP1v は強い細胞形質変換能を持つ 30kDa の分泌蛋白質であることが示された。さらに WISP1v は胃癌細胞 Kato-III に対し細胞浸潤増強作用を示すことが明らかとなった。

D. 考察

CCN ファミリーの分子構造は、典型的には IGF-binding protein ドメイン、von Willebrand type C ドメイン、thrombo-spondin type 1 ドメイン、cysteine knot ドメインの4つのドメインから構成されている。しかし、Nov 蛋白の oncogenic form では第1ドメインが欠損しており、また、最近乳癌での発現が注目されている WISP2 では、もともと第4ドメインが欠損した形をとっている。我々がスキルス胃癌で同定した WISP1v は第2ドメインが欠損しており、その作用機序のさらなる解析は、新たな癌化シグナル伝達の解明へと発展できる。WISP1v 遺伝子の発見によりスキルス胃癌の早期診断や再発診断が可能となるばかりか、WISP1v レセプターの解析に基づく WISP1v 標的治療の開発へと発展できる。このように本課題は基礎解析のみならず、臨床治療への応用をめざした画期的な研究である。

E. 結論

スキルス胃癌から Wnt 誘導遺伝子に属する WISP1v をクローニングし、癌転移・浸潤に関与することを見出した。WISP1v は分泌蛋白質であり、診断のみならず分子標的としての可能性を持つことが示唆された。

F. 健康危険情報

WISP1v の発現解析により、スキルス胃癌の早期発見に貢献できる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka S, et al. A novel variant of WISP1 lacking a Von Willebrand type C module overexpressed in scirrhous gastric carcinoma. *Oncogene*, 20(39): 5525-32, 2001
- 2) Tanaka S, et al. A novel isoform of human FGF 8 is induced by androgens and associated with progression of esophageal carcinoma. *Dig Dis Sci*, 46(5): 1016-21, 2001

2. 学会発表

- 1) 第55回日本消化器外科学会、平成13年7月26日、秋田  
田中真二 他「シンポジウム：肝内胆管細胞癌の遺伝子発現解析と新規アポトーシス誘導因子 TRAIL の治療応用」
- 2) 第39回日本癌治療学会総会、平成13年11月9日、広島  
田中真二 他「シンポジウム：新しい肝癌血管新生因子 Angiopoietin-2 の同定と機能抑制分子の開発」

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 GenBank 登録: AB034725

消化器癌におけるマイクロサテライト不安定性とミスマッチ修復異常に関する研究

主任研究者 前原 喜彦 九州大学大学院 消化器・総合外科

研究要旨

DNA ミスマッチ修復活性は多様な抗癌剤の感受性規定因子として知られ、その異常はマイクロサテライト不安定性により検索される。我々は従来の手法の問題点を解決した新しい解析系を確立し、胃癌を含めた多様な悪性腫瘍において網羅的に解析を行った。その結果、マイクロサテライト不安定性にはA,Bの2つのサブタイプが存在し、Aタイプがミスマッチ修復異常に直接起因する変化であることを同定した。

分担研究者；

織田 信弥

(国立病院九州がんセンター

・臨床研究部・病理学研究室室長)

A. 研究目的

細胞のDNA ミスマッチ修復活性は様々な抗癌剤への感受性を規定する因子としてクローズアップされている。悪性腫瘍治療において極めて重要な位置をしめる化学療法の治療ストラテジーを適正化することは急務である。しかしながら、このような重要な感受性規定因子を正確にとらえることは難しい。我々はこのミスマッチ修復異常を正確にとらえるために、独自に開発した新しい高精度マイクロサテライト不安定性解析系を用いて、ミスマッチ修復異常を与えられた切除標品において正確に同定することを研究の目的とした。

B. 研究方法

腫瘍切除標本より抽出されたゲノムDNAを用いて、独立した染色体上に存在する2塩基繰り返し替えしマイクロサテライト配列を蛍光プライマーを用いたPCRにより増幅、産物を自動シーケンサーに泳動・解析、正常組織より得られたプロファイルと比較し、マイクロサテライト不安定性の有無を同定する。

C. 研究結果

消化器癌を中心として多様な悪性腫瘍で網羅的にマイクロサテライト不安定性を解析したところ、興味深いことに、ヒト悪性腫瘍でみられるマイクロサテライト不安定性には2種類のカテゴリーが存在することがあきらかになった。ひとつは、変化の幅が6-bp以内にとどまるAタイプであり、今ひとつは8-bp以上に達するBタイプである。

D. 考察

これまで、マイクロサテライト不安定性は単純にミスマッチ修復異常に結び付けられていた。しかし、実際にはマイクロサテライト不安定性は2つのカテゴリーが存在し、ミスマッチ修復異常との関係も、これまで考えてこられたようには単純でないことが明らかになった。我々の研究グループによる諸解析によりAタイプのマイクロサテライト不安定性がミスマッチ修復異常を直接反映していることが明らかになりつつある。

E. 結論

化学療法ストラテジーを適正化するためには、抗癌剤への感受性を事前に予測可能にする感受性規定

因子の同定が不可欠である。多様な抗癌剤感受性を規定するとされるミスマッチ修復活性は、最も重要な感受性規定因子の一つと考えられる。しかしながら、腫瘍におけるミスマッチ修復異常を正確に同定するためには、正確なマイクロサテライト不安定性解析が必要となる。我々の研究が進捗することで、高精度なマイクロサテライト不安定性解析系が確立され、また観察されたマイクロサテライト不安定性の正確な意義が明らかになると結論される。

F. 健康危険情報

当該事項なし。

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Maehara Y, Oda S, Sugimachi K:  
The instability within: problems in current analyses of microsatellite instability.  
Mutation Res 461: 249-263, 2001
- 2) Ikeda Y, Oda S, Abe T, Ohno S, Maehara Y, Sugimachi K:  
Features of microsatellite instability in colorectal cancer: comparison between colon and rectum.  
Oncology 61: 168-174, 2001
- 3) Oda S, Maehara Y, Sugimachi K:  
Microsatellite instability in cancer: what problems remain unanswered?  
Surgery 131: S55-S62, 2002

2. 学会発表

第60回日本癌学会総会(平成12年9月26-28日、横浜)  
ヒト癌にみられる2つのマイクロサテライト不安定性：  
ミスマッチ修復異常との異なる関係  
織田 信弥、前原 喜彦、杉町 圭蔵

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

当該事項なし。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

#### 英文

- 1) Mori M, et al. Absence of Msh2 protein expression is associated with alteration in the FHIT locus and Fhit protein expression in colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 61(20): 7379-82, 2001
- 2) Tanaka S, Ueo H, Mafune K, Mori M, Wands JR, Sugimachi K. A novel isoform of human FGF 8 is induced by androgens and associated with progression of esophageal carcinoma. *Dig Dis Sci*, 46(5): 1016-21, 2001
- 3) Tanaka S, et al. A novel variant of WISP1 lacking a Von Willebrand type C module overexpressed in scirrhous gastric carcinoma. *Oncogene*, 20(39): 5525-32, 2001
- 4) Endo K., Maehara Y., Baba H., Ikeda Y., Tokunaga E., Koga T., Toh Y., Kohnoe S., Okamura T., Nakajima M., Sugimachi K.  
Heparanase gene expression and metastatic potential in human gastric cancer. (*Anticancer Research* 21 : 3365-3370,2001)
- 5) Maehara Y, Oda S, Sugimachi K: The instability within: problems in current analyses of microsatellite instability. *Mutation Res* 461: 249-263, 2001
- 6) Ikeda Y, Oda S, Abe T, Ohno S, Maehara Y, Sugimachi K:  
Features of microsatellite instability in colorectal cancer: comparison between colon and rectum. *Oncology* 61: 168-174, 2001
- 7) Oda S, Maehara Y, Sugimachi K: Microsatellite instability in cancer: what problems remain unanswered? *Surgery* 131: S55-S62, 2002
- 8) Maruyama A, Miyamoto S, Saito T, Kondo H, Baba H, Tsukamoto N Clinicopathological and familial characteristics of endometrial cancer with multiple primary cancers in relation to the loss of protein expression of MSH2 and MLH 1. *Cancer* 2001;91:2056-64.
- 9) Miyamoto S, maruyama A, okugawa K, Akazawa K, Baba H, Wada S, Maehara Y, Mekada E, Nakano H, Tsukamoto N, Saito T: Loss of motility-related protein (MRP-1/CD9) and integrin  $\alpha$  expression in endometrial cancers. *Cancer* 2001;92: 542-8.
- 10) Hamatake M, Ishida T, Yamazaki K, Baba H, Maehara Y, Sugio K, Sugimachi K:  
Lung cancer with p53 expression and a solitary metastasis to the stomach: A case report. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2001;7:162-5.
- 11) Maehara Y, Kakeji Y, Oda S, Baba H, Sugimachi K:  
Tumor growth patterns and biological characteristics of early gastric carcinoma. *Oncology* 2001;61:102-112.
- 12) Maehara Y, Baba H, Sugimachi K: Adjuvant chemotherapy for gastric cancer: A comprehensive review *Gastric Cancer* 2001;4:175-184.
- 13) Kakeji Y, Maehara Y, Koga S, Shibahara K, Kabashima A, Tokunaga E, Sugimachi K:  
Gastric cancer with high telomerase activity shows rapid development and invasiveness. *Oncology Reports* 8:107-110, 2001.
- 14) Takeuchi H, Maehara Y, Tokunaga E, Koga T, Kakeji Y, Sugimachi K: Prognostic significance of natural killer cell activity in patients with gastric carcinoma: a multivariate analysis. *Am J Gastroenterol* 96:574-578, 2001.
- 15) Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Sugimachi K:  
Overexpression of vascular endothelial growth factor C is related to lymphogenous metastasis in early gastric carcinoma. *Oncology* 60: 146-150, 2001.
- 16) Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K:  
Growth pattern and expressions of cell cycle regulator proteins p53 and p21WAF1/CIP1 in early gastric carcinoma. *Cancer* 92:1828-1835, 2001.
- 17) Utsunomiya T., Emi Y., Ikejiri K., Suzuki M., Saito H., Yakabe S., Nonaka M., Saku M., Yoshida K., Shimada M., Sugimachi K. Retrospective study on the effects of lipiodolization before a potentially curative hepatectomy for colorectal liver metastases: Long-term results of a pilot study. *Hepato-Gastroenterology*. 48(39): 790-793, 2001

#### 和文

- 1) 北野正剛、安田一弘、白石憲男、安達洋祐 胃癌治療の最近の進歩と今後の問題点  
4. 早期胃癌に対する腹腔鏡下手術の適応と限界：根治性をいかにして確保するか  
*日本外科学会雑誌* 102(10):749-752, 2001

20010535

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。