

厚生労働科学研究費補助金

がん予防等健康科学総合研究事業

医療費及び患者負担軽減をめざした新しい分子遺伝学的

診断・治療法の開発に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 森 正樹

平成16（2004）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
医療費及び患者負担軽減をめざした新しい分子遺伝学的 診断・治療法の開発に関する研究	----- 1
森 正樹	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 5
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 6

医療費および患者負担軽減をめざした新しい分子遺伝学的診断・治療法の開発

主任研究者 森 正樹 九州大学生体防御医学研究所 教授

（研究要旨）本研究では、消化器癌・乳癌患者の末梢血、骨髄およびリンパ節における微量癌細胞の存在が癌患者の予後に及ぼす影響を大規模プロスペクティブ・スタディーにて調査し、その臨床的意義の確立を最終目的とした。計画は2年計画で行い、平成14～15年度に1266例（研究開始時の予定：1000例）の患者サンプルの採取とその微量癌細胞陽性率を検討した。更に最良の至適マーカーとして、CK7（サイトケラチン7）を選択した。また平成15年度は症例数を拡大し、同様の検討を行うと共に、一部の初期症例に関して長期予後フォローアップデータを基に統計学的解析を進めたところ、リンパ節転移の無い乳癌患者については手術時末梢血における微量癌細胞陽性患者は陰性患者と比較して、有意に無再発生存期間が長いことを見いだした。予後に関しては今後3～5年の長期的フォローアップが更に必要である。また、術後ホルモン・化学療法を行っている患者についても同様のフォローアップの中で、微量癌検査の臨床的意義を今後検討していきたいと考えている。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

井上 裕・九州大学生体防御医学研究所助教授
宇都宮 徹・九州大学生体防御医学研究所講師
大野真司・国立病院九州がんセンター医長
木下句子・国立病院九州がんセンター医員
三浦重人・愛知県がんセンター乳腺外科部長
岩田広治・愛知県がんセンター乳腺外科医員
朔 元則・国立病院九州医療センター外科部長
池田陽一・国立病院九州医療センター医員

その場合診断時の微量癌陽性の程度と再発転移の有無の間に関連が認められ、診断基準が明らかにされることが期待された。以上の研究によって抗ガン剤を初めとする術後補助療法が必要な（あるいは不要な）患者の選別法が樹立できれば、医療経済上また患者負担に大きく貢献するものと考えた。

② 微量癌細胞転移情報を手術の方針決定に役立てるため分子遺伝学的迅速診断法の開発を確立したい。これまで一時間で診断が可能であったが、これを検出精度を落とすことなく45分以内で分子遺伝学的診断ができるシステムを確立したい。

A. 研究目的

微量癌細胞の臨床的意義の解明と術中迅速診断

① 微量癌細胞が血中、所属リンパ節に存在することは広く認識されるようになった。しかし現在のところその臨床的意義は明確とはいえない。血中、骨髄中の微量癌細胞存在の臨床的、意義付けおよびそのevidenceの確立のためには多数例の解析が必要であり、このため最低でも1000例の症例解析を行う予定を立てた。これらの患者のフォローアップにより、微量癌陽性患者のなかから実際に再発転移を起こす患者と逆に癌細胞が陽性であっても再発転移を起こさない患者が明らかになることが期待され、

B. 研究方法

平成14年度

1. 国立4施設からの消化器癌・乳癌症例の術前・周術期リンパ節、末梢血、骨髄液を採取 各施設年間該当症例は250～350症例あるので一年間で1000～1500症例のサンプルを採取できる。2. (1)九大生医研に集積された各サンプルからRNAを抽出し、RT-PCR法にてCEA遺伝子発現をターゲットにして微量転移の存在診断を行う。

(2) またcytokeratin 17遺伝子についても同時に検索する3. また各施設からリンパ節の凍結切片および、末梢血、骨髓液のスミア標本を集積する。抗cytokeratin 17モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色にて、微量転移を評価する。

4. 分子遺伝学的迅速診断法の開発

従来のRT-PCR法の各ステップごとに時間短縮を試み、45分程度で診断が確定するシステムを確立する。これまでの系で一時間以内のシステムは確立したが検出感度に難点があるためこれを克服する方法を考案する。具体的には(1)検体採取の工夫(2)RNA抽出の改良(3)RT法の改良(4)リアルタイムPCR法の改良を試みる。

5. データベースの作成、予後調査
(1)患者の臨床病理学的背景因子を含めたデータベースを構築する。(2)リンパ節、末梢血、骨髓液の微量癌細胞の存在の有無および存在量の半定量的評価値と術後再発・転移との相関を検討する。

平成15年度

1. 臨床応用に向けて検体症例数を増やし14年度と同様の検索を行う。
2. 予後調査を施行し、実際の患者の予後の予測因子となりうるかどうか統計学的に評価する。

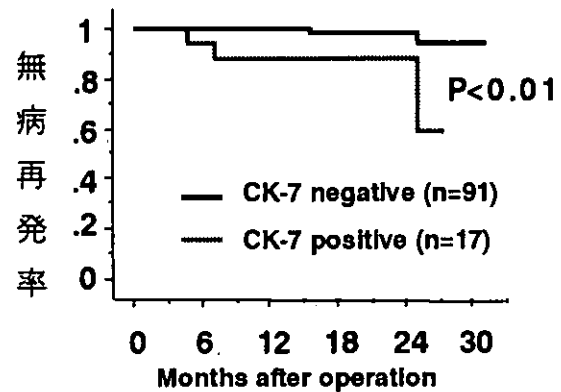
C. 研究結果

1. 15年度の研究成果

1) 平成14年度は平成15年3月現在、当施設および関連施設より、合計780症例(乳癌471例 食道癌10例 胃癌111例 大腸癌31例 その他16例 健常コントロール26例)を標本を収集したが、平成15年度も順調に収集は経過し、平成16年3月現在、当施設および関連施設より、合計1266症例(乳癌543例 食道癌10例 胃癌640例 大腸癌31例 その他16例 健常コントロール26例)を採取するに至った。-20度での低温輸送により、定期的に(約1ヶ月に一度)試料の質を損ねることなく確実に関連施設から当施設に送付されるシステムを構築した。現在まで、特に問題なく定期的かつ確実にサンプルが送付されている。当施設に送付された試料は、直ちに研究員により-80度の冷凍庫に保管された。解析のためにサンプルからRNAを抽出し、逆転写反応によりcDNA化している。また、リンパ節の薄切標本および末梢血・骨髓のスミア標本も作製した。

2) 乳癌357例に関しては微小骨髄転移が56.0%にまた末梢血では17.4%において認められた。乳癌リンパ節転移(一)症例中、術後フォローアップ期間が二年以上の108例につい

末梢血



て無再発生存率を検討したところ明らかに微量癌陽性症例の予後が悪く、これは統計学的に有意($p < 0.01$)であった。その他の癌については現在解析を進めているところである(図参照)。

3) また微小転移検出にもちいる最適のマーカーについてCEA, CK7, CK18, CK19, CK20, MMG, MUC1等々を検討したところ、CK7が検出率、偽陽性率でもっとも優れたマーカーであることが判明した。現在このCK7を用いて検索を進めている。

4) 術中迅速診断システムの開発も順調である。

以上、初年度の当該計画に従って順調に研究は進行し、14年~15年度の2カ年で目的を越える1300例弱のサンプルを蒐集し予定の計画をほぼ終了した。今後は患者の詳細なフォローアップによりその臨床的意義の解明について研究を進めたいと考えている。

D. 考察

1) 1300症例弱に及ぶ臨床検体の確実な収集により本邦初の大規模臨床研究が可能となった。微小転移の存在が指摘されて10年余になるが、依然その臨床的意義には一定の見解は得られていない。その原因として信頼するに大規模臨床研究が少ないことが挙げられる。特に本邦では対象が500症例を超えるような大規模臨床研究の報告はない。当刻研究が目標とする1000例規模の報告は、本邦における最初で最大規模の微小転移研究報告となる。

2) 途中経過ではあるが、現在までの乳癌約357症例での解析では、末梢血20%弱、骨髄50%弱の症例が微小転移陽性となっている。特に末梢血陽性症例は早期再発症例が多い傾向にあった。末梢血中の微小転移に臨床的意義があれば、この微小転移検出法は、癌検診や治療効果判定などのための簡便で低コストで高感度な検査法となることが期待される。

3) 微小転移検出システムの確立による再現性のある客観的データの集積と臨床応用 微小転移検出法には様々あるが、あくまで臨床応用可能な、つまり簡便で低コスト、客観的かつ再現性のある検出法でなければ臨床応用は不可能である。そこで我々は、それらの条件を最も良く満たす定量的RT-PCR法を微小転移検出法として採用している。

E. 結論

微量癌の臨床的意義を検討するための大規模プロスペクティブ・スタディーを開始したが、初年度にその確実な症例集積システムを確立することができ、1266例のサンプルを集めることができた。これにより微量癌の存在診断を行ったところ、特に乳癌リンパ節転移陰性例において、末梢血微量癌陽性例の再発傾向が強いことが判明した。集積症例とより長いフォローアップ期間でこの意義をより詳細に検討することで、当初の目的である術後治療の必要・不必要な患者の選別に役に立つ診断基準を確立することが可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaguchi, H., Tanaka, F., Ohta, M., Inoue, H., and Mori, M. Identification of HLA-A24-restricted CTL epitope from cancer-testis antigen, NY-ESO-1, and induction of a specific antitumor immune response. *Clin Cancer Res*, 10: 890-896, 2004.
2. Mimori, K., Tanaka, Y., Yoshinaga, K., Masuda, T., Yamashita, K., Okamoto, M., Inoue, H., and Mori, M. Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer. *Ann Oncol*, 15: 236-241, 2004.

3. Yoshinaga, K., Inoue, H., Tanaka, F., Mimori, K., Utsunomiya, T., and Mori, M. Platelet-derived endothelial cell growth factor mediates Rho-associated coiled-coil domain kinase messenger RNA expression and promotes cell motility. *Ann Surg Oncol*, 10: 582-587, 2003.
4. Yamashita, K., Upadhyay, S., Mimori, K., Inoue, H., and Mori, M. Clinical significance of secreted protein acidic and rich in cysteine in esophageal carcinoma and its relation to carcinoma progression. *Cancer*, 97: 2412-2419, 2003.
5. Yamashita, K., Mimori, K., Inoue, H., Mori, M., and Sidransky, D. A tumor-suppressive role for trypsin in human cancer progression. *Cancer Res*, 63: 6575-6578, 2003.
6. Mimori, K., Shiraishi, T., Mashino, K., Sonoda, H., Yamashita, K., Yoshinaga, K., Masuda, T., Utsunomiya, T., Alonso, M. A., Inoue, H., and Mori, M. MAL gene expression in esophageal cancer suppresses motility, invasion and tumorigenicity and enhances apoptosis through the Fas pathway. *Oncogene*, 22: 3463-3471, 2003.
7. Mimori, K., Inoue, H., Shiraishi, T., Matsuyama, A., Mafune, K., Tanaka, Y., and Mori, M. Microsatellite instability is often observed in esophageal carcinoma patients with allelic loss in the FHIT/FRA3B locus. *Oncology*, 64: 275-279, 2003.
8. Mimori, K., Inoue, H., Ishii, H., and Mori, M. INI-1, a partner gene of ALL-1, is highly conserved in human acute leukemia. *Oncol Rep*, 10: 551-553, 2003.
9. Masuda, T. A., Inoue, H., Nishida, K., Sonoda, H., Yoshikawa, Y., Kakeji, Y., Utsunomiya, T., and Mori, M. Cyclin-dependent kinase 1 gene expression is associated with poor prognosis in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*, 9: 5693-5698, 2003.

2.学会発表

- 1.宇都宮 徹ほか、肝細胞癌の治療法選択のための標準化可能な分子遺伝学的肝予備能評、日本外科学会雑誌、第104巻、217、2003
- 2.西田康二郎ほか、乳癌細胞株における放射線感受性比較とDNA マイクロアレイを用いた放射線感受性・抵抗性規定遺伝子の検索、日本外科学会雑誌、第104巻、256、2003
- 3.山下継史ほか、マイクロアレイを用いた食道癌における癌抑制遺伝子群の同定、日本外科学会雑誌、第104巻、261、2003
- 4.井上 裕ほか、胃癌における術前生検遺伝子診断法の開発とその妥当性の検討-術前生検組織と切除胃癌組織のマイクロアレイ発現プロファイルの比較、日本外科学会雑誌、第104巻、99、2003
- 5.石川健二ほか、消化器癌・乳癌における微小転移検出のための至適マーカーの検討、日本外科学会雑誌、第104巻、684、2003
- 6.宇都宮 徹ほか 肝切除術に対する生体反応としての肝再生 一分子機構の網羅的解析と制御への展開、日本消化器外科雑誌、第36巻、753、2003
- 7.宇都宮 徹ほか、多中心性発生肝細胞癌例の非癌部肝組織における分子遺伝学的特徴：cDNA マイクロアレイを用いた発現解析、日本癌学会総会記事、第94巻、281、2003
- 8.三森功士ほか、乳癌の血中微量癌細胞検出法の確立と再発早期発見への臨床応用、日本臨床外科学会雑誌、第64巻、2659、2003

3.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得
該当無し
- 2.実用新案登録
該当無し
- 3.その他
該当無し

20031414

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
P. 3の「G. 研究発表 1. 論文発表」をご参照ください。