

200400453A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

医療費削減と患者負担軽減をめざした癌の新しい分子遺伝学的診断法の開発

平成16年度 統括研究報告書

主任研究者 森 正樹

平成17年4月8日

目 次

I. 総括研究報告

医療費削減と患者負担軽減をめざした癌の新しい分子遺伝学的診断法
の開発に関する研究

----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 4

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)
統合研究報告書

医療費削減と患者負担軽減をめざした癌の新しい分子遺伝学的診断法の開発
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 癌の診断・治療法の最近の進歩はめざましいが、従来のコンベンショナルな診断法では、再発転移の可能性の低い患者をあらかじめ選別することは困難である。個々の患者の転移予測が可能になれば抗癌剤治療に要する医療費の軽減と、患者にとっては副作用の回避が実現する。患者の選別法が樹立できれば、医療経費の削減とまた患者負担の軽減に大きく貢献するものと考えられる。

われわれはこのような潜在的悪性度の指標として微量癌の存在診断に注目し、最終目標 2000 例の乳癌・消化器癌における末梢血・骨髄の微量癌検出をおこなっている。平成 16 年度末で合計 1714 例(乳癌 653 例 食道癌 12 例 胃癌 965 例 大腸癌 42 例 その他 16 例 健常コントロール 26 例)に到達しており、さらに本年度で 2000 例を超える症例分のサンプルを集積することは確実である。

さらに本年度は症例集積を終え、再発および予後と微量癌細胞検出の有無との関係を明らかにすることができ、固形癌の再発・予後における新たなクリニカルエビデンスを発信できるものと期待している。また新たな標的遺伝子として、骨髄中の微量癌細胞を培養して viability を規定する遺伝子を同定、補助療法の耐性を規定する癌幹細胞に特異的な遺伝子についても全例解析を行う予定である。

分担研究者氏名・所属機関名およ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
三森功士・九州大学生体防御医学研究所助手
大野真司・国立病院九州がんセンター医長
片岡明美・国立病院九州がんセンター医員
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
増田慎三・国立病院大阪医療センター外科医員

新たに同定したい。特に、骨髄中に存在する微量癌細胞を同定培養し、新規マーカーに有機的に結びつけるを Hamburg 大学 K. Pantel 教授とともに共同研究の予定である。

④ 免疫染色法を用いた病理組織学的微量癌の診断への還元。

⑤ 以上の研究を遂行することで、患者個人に応じた適切な治療指針を確立することを目指す。

A. 研究目的

- ① 微量癌細胞の臨床的意義の解明と術中迅速診断：微量癌細胞が血中、所属リンパ節、骨髄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 2000 例規模の症例解析を行う予定である。
- ② 微量癌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
- ③ より適切な微量癌診断マーカーの探索
これまで CEA, CK を対象に検索をすすめてきたが、再発や予後を正確に反映する標的遺伝子を

B. 研究方法

特に、本年度は研究目的の①について下記の如く研究を進めた。

1) 症例収集：外科切除可能症例を対象として、適切と思われる全患者に本研究を説明し同意を十分に得た後に、骨髄、末梢血の採取に応じていただき、手術室で全身麻酔施行後、骨髄液と末梢血液をそれぞれ採取した。ISOGENE LS を用いて凍結保存。凍結標本を九州大学生体防御医学研究所へ送付し解析をおこなった。

〈標的遺伝子の決定〉

高い感受性ととともに特異性を示すマーカーが微量癌細胞検出のためのマーカーとして有用である。高い腫瘍特異性を有する RT-PCR の標的として MAGE 遺伝子があるが、普遍性に乏しく臨

床的には有用でない。われわれは、株化癌細胞 27 種、非上皮系株化細胞 8 種において定量的 real time PCR 法 (Light cycler) を用いて既知の遺伝子 (CEA, CK7, CK18, CK19, CK20, MMG, MUC1) から最適遺伝子を検索した。

<骨髄液の取り扱い>

(1) 穿刺；デイスポの骨髄穿刺針 (15G) (MDTech, BMA Needle, DBMNI 1501) および 2cc 注射器と ISOGEN-LS 4cc 予め入れてあるチューブ 1 本を使用した。

(2) 手順； 1. 手洗い前に、第 2 または第 3 肋間の胸骨正中部分にマーキング。2. 術野を消毒し、シートをかける。骨髄採取予定部位には穴あきシートをかける。3. 骨髄穿刺針のストッパーを皮下脂肪の厚さをみながら、約 1 ~ 2 センチに設定。4. 胸骨正中第 2 ~ 3 肋間に垂直に骨髄穿刺針をさす。胸骨内にはいると、針が固定される。5. 骨髄穿刺針の内筒を抜き、注射器をつけ 1cc 吸引する (廃棄)。6. RT-PCR 用 → ISOGEN-LS 4cc に 1cc ずつ混和し、激しく振る。ISOGEN-LS 混入し激しく浸透混和 (shake vigorously) 後は -80°C で保存可能。以降、通常の手術をすすめる。

<末梢血液の取り扱い>

(1) 採血；翼状針あるいはエラスト針、2. 5cc 注射器 2 本、Falcon チューブ 1 本、ISOGEN-LS (Nippon Gene 社製) 4ml

(2) 手順； 1. 末梢静脈あるいは動脈よりルートを取る。2. 2. 5cc 注射器で 1cc 血液を引き破棄。3. 別のシリンジで 1cc の血液を採取し、ISOGEN-LS 4cc の入った tube に transfer し、しっかり蓋をしてすぐに十分に混ぜる。4. tube は抽出までの間、冷凍保存が可能である。激しく振ったのち超低温冷凍庫 (マイナス 70-80 度以下) で保管。抽出までの間、冷凍保存が 2 ~ 3 ヶ月は可能である。

2) 検出と解析

1) 骨髄及び末梢血液検体到着後 RNA を抽出し、逆転写反応を施行し cDNA を作製する。

2) 検出は Hybridization 法によるリアルタイム RT-PCR 法を 2 回実施した。標準遺伝子は GAPDH、標的遺伝子は CEA, CK7, CK19 とし、CEA に関しては 2 回の解析で両者の誤差範囲が 50% 以上認められた場合は 3 回目を施行し、正しい値を求めた。

3) CEA 値を CEA コピー数と GAPDH のコピー数の比で求めた。陰性コントロール症例群により cut off 値を決定のうえ、実際の臨床検体を解析した。

(倫理面への配慮)

われわれは H12/5 (H13/3 改訂) の「厚生科学審議会先端医療技術評価部会」による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」に基づき、「遺伝子解析等に関する標本採取に関する同意書」を当研究所倫理委員会より承諾を受けた (H12/6/1)。現在 (H17/1 現在) まで、その同意書に同意を得られた症例から試料を採取し保管している。一方、H12/5 以前に収集した医学的研究に用いることは同意するが、遺伝子解析に関する同意を得ていないものに関しては封書で再度確認、同意のみ保管した。さらに医学的研究と遺伝子解析のいずれについても同意を得ていないものから採取した試料は、連結不可能匿名化された症例の試料あるいは、連結可能匿名化が可能な症例に関しては当研究所倫理委員会の承認のもと試料の保存を行っている。

C. 研究結果

【1】症例集積：平成 16 年度末までに合計 1714 例 (乳癌 653 例, 食道癌 12 例, 胃癌 965 例, 大腸癌 42 例, その他 16 例 健常コントロール 26 例) を集積した。

【2】最適マーカーの決定：微少転移検出にもちいる最適のマーカーの検討：来年度は CEA, CK7, CK18, CK19, CK20, MMG, MUC1 等々を検討した。その結果 7 つの候補遺伝子中、最も高い特異性と感受性を示したマーカーは CK7 で、従来用いられている CEA や CK18 より優れていた (Int J Oncol 2005)

【3】これまでの研究成果の臨床的意義及び今後の発展性：

[1] 乳癌に関する研究成果：乳癌における 645 例の初期解析から、微量癌細胞陰性患者は、術後再発転移を起こす可能性は低いことがわかった。

[2] 胃癌に関する研究成果：

(1) 正常コントロール；将来の臨床応用にむけて、高い感受性はもとより、高い特異性が重要

であることから、非癌症例を用いたコントロール群における CEA 値による設定すなわち cut off 値は、できるだけ多くの症例において決定されなければならない。今日までに 29 例の非癌患者（胆石症、腹壁癒痕ヘルニア症例等）の末梢血液および骨髓液を採取し、それぞれにつき各 2 回、リアルタイム RT-PCR 法を施行したが、いずれにおいても増幅がみられなかった。

(2) 集積症例数：989 例の末梢血液および 1004 例の骨髓液における CEA, CK7, CK19 の存在診断について解析を終えた。

(3) 解析結果：

本研究は完全な二重盲見試験で実施され、臨床病理学的因子との照合は全例集積を終えた時点で解析した。

(1) 骨髓；CEA または CK7, CK19 いずれかが陽性であったのは 1004 例中 304 例。CEA と CK7, CK19 ともに陽性の症例は 21 例であったが、臨床病期との相関はいずれも認めなかった。

(2) 末梢血液；CEA または CK7, CK19 いずれかが陽性であったのは 989 例中 448 例。CEA と CK7, CK19 ともに陽性の症例は 62 例であったが、臨床病期との相関は骨髓同様に全く相関が認められなかった。

D. 考察

将来的に症例集積を終えた時点で、5 年間の観察期間における再発および予後と微量癌細胞検出の有無との関係を明らかにすることができ、固形癌の再発・予後における新たなクリニカルエビデンスを発信できるものと期待している。

また、ごく最近、自己複製能と同時に分化能を有する癌幹細胞が、脳腫瘍の転移成立において重要であるとの報告がなされた。しかし胃癌・大腸癌をはじめとする消化器癌における幹細胞の存在を示し、さらに転移能との関連を調べた報告はない。そこで本年度では、消化器癌の幹細胞を同定し、その検出のための分子マーカーを明らかにし、さらにその幹細胞の転移形成能を明らかにしたい。これにより今回集積をおえる約 2000 例の骨髓・末梢血で検出される遊離癌細胞の中で、癌幹細胞を検出する方法論を確立したい。

E. 結論

2000 症例を集積中であるが、乳癌症例に関しては、末梢血液中における微量癌細胞の存在診断が臨床的に有意義である可能性が示されている。胃癌に関しては、末梢血液および骨髓ともに、個々の症例の臨床病理学的因子・悪性度とは無関係であり、転移能を規定する、真の癌細胞を同定し、規定する諸条件の構築が今後の最重要な課題であると考えている。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Masuda TA, Mori M, et al. Detection of Occult Cancer Cells in Peripheral Blood and Bone Marrow by Quantitative RT-PCR Assay for Cytokeratin-7 in Breast Cancer Patients with Curative Operation. *Int J Oncol* 26, 721-730: 2005

2) Nishida K, Mori M, et al. Global analysis of altered gene expressions during the process of esophageal squamous cell carcinogenesis in the rat: a study combined with a laser microdissection and a cDNA microarray. *Cancer Res*, 65:401-409, 2005.

3) Mimori K, Mori M et al. Coexpression of MMP-7 and EGF receptor in colorectal cancer; an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor is effective against MMP-7 expressing cancer cells. *Clin Cancer Res*, 10: 8243-8249, 2004.

4) 三森功士, 森 正樹 乳癌微量癌細胞検出の現状と実用化への課題. 乳癌診断のコツと落とし穴 中山書店刊 :233-233, 2004

5) 三森功士, 森 正樹 微量癌細胞検出の臨床的意義. 外科 66: 497-501, 2004

2. 学会発表

全データ集積・解析後発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得、2. 実用新案登録：検討中

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
三森功士	乳癌微量癌細胞検出の現状と実用化への課題	霞 富士雄	乳癌診断のコツと落とし穴	中山書店刊		2004	233

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masuda TA	Detection of occult cancer cells in peripheral blood and bone marrow by quantitative RT-PCR assay for cytokeratin-7 in breast cancer patients with curative operation.	Int J Oncol	26	721-730	2005
Nishida K, Mori M, et al.	Global analysis of altered gene expressions during the process of esophageal squamous cell carcinogenesis in the rat: a study combined with a laser microdissection and a cDNA microarray.	Cancer Res	65	401-409	2005
Mimori K, Mori M et al.	Coexpression of MMP-7 and EGF receptor in colorectal cancer; an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor is effective against MMP-7 expressing cancer cells.	Clin Cancer Res	10	8243-8249	2004
三森功士	微量癌細胞検出の臨床的意義	外科	66	497-501	2004