

4. 今後の展望

IFN-alpha/5-FU併用療法は難治性肝細胞癌に対して、非常に有望な治療法と考えられる。今後、本療法が広く浸透するためには、randomized control studyにて有効性を立証し、肝細胞癌に対するIFN-alphaの保険の適応拡大を実現する努力が必要となる。

そして、IFN-alpha/5-FU併用療法が集学的治療の一選択枝として確立されれば、肝切除とさらには肝移植とを組み合わせることにより高度進行肝細胞癌に対する治療成績が飛躍的に向上する可能性がある。しかし、IFN-alpha/5-FU併用療法が無効となる症例が約半数存在することも事実であり、作用機序の観点からの基礎的解明も必要となろう。

文 献

- 1) Ikai I, et al: Surgical intervention for patients with stage IV-A hepatocellular carcinoma without lymph node metastasis: proposal as a standard therapy. *Ann Surg* 227:433-439, 1998.
- 2) Tazawa J, et al: Radiation therapy in combination with transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma with extensive portal vein involvement. *J gastroenterol Hepatol* 16: 660-665, 2001.
- 3) Ando E, et al: A novel chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombosis of the main trunk of the portal vein. *Cancer* 79: 1890-1896, 1997.
- 4) Itamoto T, et al: Hepatic arterial infusion of 5-fluorouracil and cisplatin for unresectable or recurrent hepatocellular carcinoma with tumor thrombus of the portal vein. *J Surg Oncol* 80: 143-148, 2002.
- 5) Chung Y.H, et al: Combined therapy consisting of intraarterial cisplatin infusion and systemic interferon-alpha for hepatocellular carcinoma patients with major portal vein thrombosis or distant metastasis. *Cancer* 88: 1986-1991, 2000.
- 6) Kaneko S, et al: Combination chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma complicated by major portal vein thrombosis. *Oncology* 62: 69-73, 2002.
- 7) Leung T.W, et al: Factors predicting response and survival in 149 patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated by combination cisplatin, interferon-alpha, doxorubicin and 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer* 94: 421-427, 2002.
- 8) Sakon M, et al: Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94: 435-442, 2002.

肝細胞癌—進行癌の IFN 併用化学療法

山本 為 義* 永野 浩 昭*
左近 賢 人* 門田 守 人*

索引用語：hepatocellular carcinoma, portal vein thrombus, interferon-alpha, interferon receptor, 5-fluorouracil

1. はじめに

肝細胞癌はその特性により、仮に局所の腫瘍に対する治療が十分であっても、高率に残肝再発をきたし再度局所治療が必要となる。これら肝内再発巣に対する治療を繰り返していくと、最終的には門脈や肝静脈に腫瘍栓を伴う病態、あるいはびまん性結節や塊状の癌腫となり難治性となる¹⁻³⁾。この段階での治療法は化学療法が中心となるが、元来肝細胞癌は抗癌剤に感受性が低く⁴⁾、その効果は限られている。このため多剤併用化学療法や⁵⁾、化学療法に塞栓療法や放射線療法を加えた治療が試みられている^{6,7)}。われわれは Interferon-alpha (IFN-alpha) が 5-fluorouracil (5-FU) の効果を増強する点に注目し、門脈内腫瘍栓 (VP) を伴う進行肝細胞癌に対し IFN-alpha/5-FU 併用療法を施行し極めて良好な結果を得ており報告してきた⁸⁾。本稿においては、IFN-alpha/5-FU 併用療法の実際と

成績および作用機序について、概説する。

2. 肝細胞癌に対する IFN 併用化学療法

肝細胞癌に対する IFN-alpha 単独投与の効果は、多くは 0～7% と報告されており、その効果は乏しい⁹⁻¹²⁾。Lai らは 35 例の切除不能肝細胞癌に対し IFN-alpha (5 MU/m²) を週 3 回×1 週投与し 31% の奏効率を得たと報告し、IFN-alpha 単独投与の有効性を指摘しているが、HB 陽性患者が多くを占めており、HCV 陽性患者が多くを占める肝細胞癌全体に対する効果は判断できない¹³⁾。このため IFN-alpha と種々の抗癌剤の併用療法が試みられたが、IFN-alpha と systematic doxorubicin の併用療法は、奏効率が 3～17% とあまり効果は認められない¹⁴⁻¹⁷⁾。これらに対し IFN-alpha と 5-FU や CDDP を用いた肝動注の併用療法はある程度の効果があると考えられる^{8,18,19)}。Chung らは 18 例の門脈

Tameyoshi YAMAMOTO *et al*: Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma

*大阪大学大学院医学系研究科病態制御外科学教室 [〒565-0871 吹田市山田丘 2-2]

表1 肝細胞癌に対する IFN-alpha 併用化学療法 (文献8を改変)

Author	Drugs	one term	Response CR+PR /total (%)
Nair et al	IFN- α 3 MU, i.m. (daily)	2 mos	0/2 (0)
Sachs et al	IFN- α 12 and 50 MU/m ² , i.m. (3 times/week)	12 wks	0/30 (0)
Creagan et al	IFN- α 12 MU, i.m. (daily, 5days) doxorubicin 25 mg/m ² , i.v. (day 1)	4 wks	1/7 (17)
GTSG	IFN- α 5-15 MU/m ² , i.m. (3 times/week)	1-3 wks	2/30 (7)
Kardinal et al	IFN- α 12 MU, i.m. (daily, Day 1-5/week) doxorubicin 25-40 mg/m ² , i.v. (Day 1)	4 wks	1/30 (3)
Feun et al	IFN- α 20 MU, i.m. (weakly, 1st 3 weeks) doxorubicin 20 mg/m ² , i.v. (weakly, 1 st 3 weeks)	5 wks	2/21 (10)
Lai et al	IFN- α 5 MU/m ² , i.m. (3 times/week)	1 wk	11/35 (31)
Llovot et al	IFN- α 3 MU, i.m. (3 times/week)	1 yr	2/30 (7)
Chung et al	IFN- α 3 MU, i.m. (3 times/week), CDDP 2 mg/kg continuous i.a. (every 8 weeks)	8 wks	6/18 (33)
Kaneko et al	IFN- α 3 MU, i.m. (3 times/week), 5-FU 750 mg/m ² , i.a. (weekly), CDDP 75 mg/m ² , i.a. (every 2 weeks), MTX 30 mg/m ² , i.a. (every 4 weeks) leucovolin 30 mg/m ² , i.v. (every 4 weeks)	4 wks	13/29 (45)
Leung et al	IFN- α (5 MU/m ² s.c., Days 1-4) CDDP (20 mg/m ² i.v. Days 1-4, every week) doxorubicin (40 mg/m ² i.v., Day 1) 5-fluorouracil (400 mg/m ² i.v., Days 1-4)	3 wks	25/149 [†] (17)
Sakon et al	IFN- α 5 MU, i.m. (3 times/week), 5-FU 450-500 mg/day, continuous i.a. (first 2 weeks)	4 wks	5/8 (63)

IFN: interferon; 5-FU: 5-Fluorouracil; CDDP: cisplatin; MTX: methotrexate.

[†]: vascular involvement 66/149 (44.3 %)

本幹または一次分枝に門脈腫瘍栓 (Vp3-4) もしくは遠隔転移を伴う肝細胞癌に対し、CDDP の肝動注に加え IFN-alpha の全身投与を組み合わせることによって、33 % の奏効率、平均生存期間 5 カ月、1 年生存率 27 % と CDDP 単独投与群に比べ有意に良好な結果を報告している¹⁸⁾。さらに Kaneko らは 29 例の Vp3-4 もしくは遠隔転移を伴う肝細胞癌に対し IFN-alpha の全身投与と 5-FU, CDDP, methotrexate (MTX) の肝動注および leucovolin の静注を組み合わせた多剤併用療法を施行し 45 % の奏効率が得られたと報告している¹⁹⁾。しかし 34 例中 5 例 (15 %) は、重度の骨髄障害や腎障害などの副作用により治療継続ができなくなっている¹⁹⁾。われわれが行っている、IFN-alpha と 5-FU のみの肝動注を併用する治療法は、pilot study では奏効率 63 % (5/8 例) と極めて良好な結果を

得ており、また骨髄抑制、発熱、うつ状態などの副作用は認められるが、治療を中断しなければならぬ症例は極めて稀であり、外来通院のみで繰り返し治療を継続できている。以上、肝細胞癌に対する IFN 併用化学療法を表 1 に示した。

3 IFN-alpha/5-FU 併用療法の対象と方法

治療方法であるが、非手術症例においてはセルディング法にて、肝切除例では術中に、肝動脈カテーテルを挿入し、カテーテルより 5-FU を 450 ~ 500 mg / 日、2 週間投与・2 週間休薬の 4 週間を 1 クールとして持続動注を行う。同時に IFN-alpha を 500 万単位 / 回、3 回 / 週、4 週を 1 クールとして皮下投与する (図 1)⁸⁾。対象症例は門脈一次分枝または門脈本幹に肉眼的門脈腫瘍栓 (Vp3 以上)

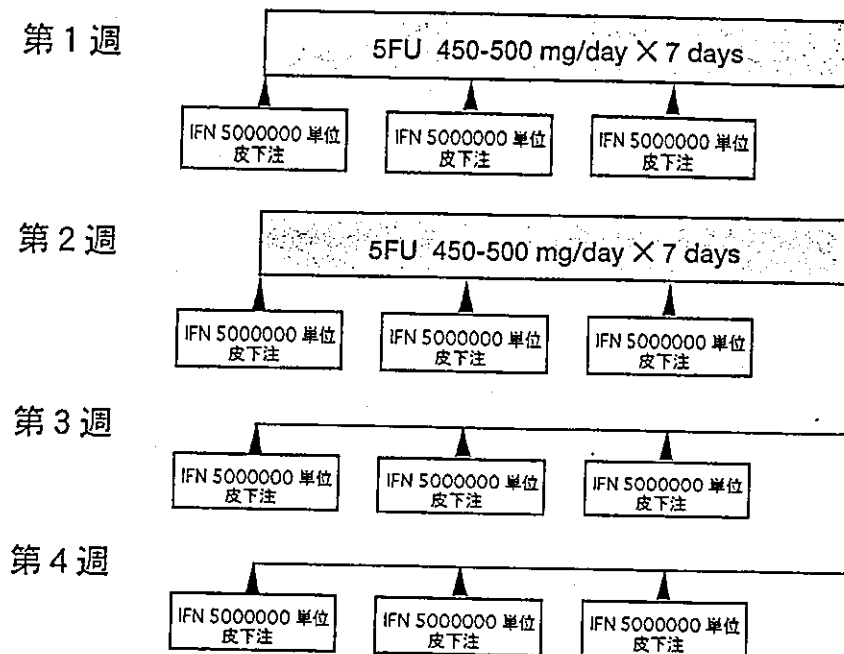


図1 IFN-alpha/5-FU併用療法のプロトコール

を伴う高度進行肝細胞癌であり、切除不能症例のみならず肝機能が良好で肝切除が可能であった症例をも術後補助療法として組み入れている。肉眼的に癌遺残のない肝切除ができた場合には、残肝内再発を抑えることを、癌遺残があり減量肝切除となった場合には、残存腫瘍の消退を目標とする。また副作用および5-FU肝動注による肝障害を考慮し、70歳未満、T.Bilが正常、GOT、GPTがともに100未満、血小板が8万以上、血清Crn < 1.5を条件とし、外来通院加療を基本としているため、PS：0、1が保たれている症例を対象としている(表2)。

4 切除不能症例に対する治療成績

全肝に広がる多発病変(IM3)と門脈内腫瘍栓を伴うため切除不能と判断された進行肝細胞癌23例に対し本療法を施行した。治療回数は2クール以上で効果のある症例には繰り返し施行した。治療の効果は肝内病巣に限り評価すると、CR：7例、PR：5例の計12例(53%)の症例において有効であった。

その一方で、11例47%については無効であり、無効例は全例6カ月以内に癌死した(表3a)。23例の1年生存率は、52%であった。これら成績は、既存の治療法がなくsupportive careのみの場合ほとんどの症例が6カ月以内に死亡することと比較すると、極めて有効であると考えられる。

5 症例呈示(切除不能症例)

症例は67歳、女性。HCV陽性。肝前区域に約6cm大の主腫瘍があり、多数の肝内転移および肝前区域枝から右門脈本幹を完全に占拠する門脈内腫瘍栓を伴っていた(図2a, b)。

肝機能不良のため手術適応外と判断しIFN-alpha/5FU併用療法を施行した。1クール終了後、腫瘍マーカーはAFPが191から17ng/mlへとPIVKA-IIが448から40mAU/mlへと著明に減少し、陰転化した。2クール終了後のCTでは、主腫瘍および門脈内腫瘍栓は消失した(図2c)。IFN-alpha/5FU併用療法に伴う副作用はいずれも認められ

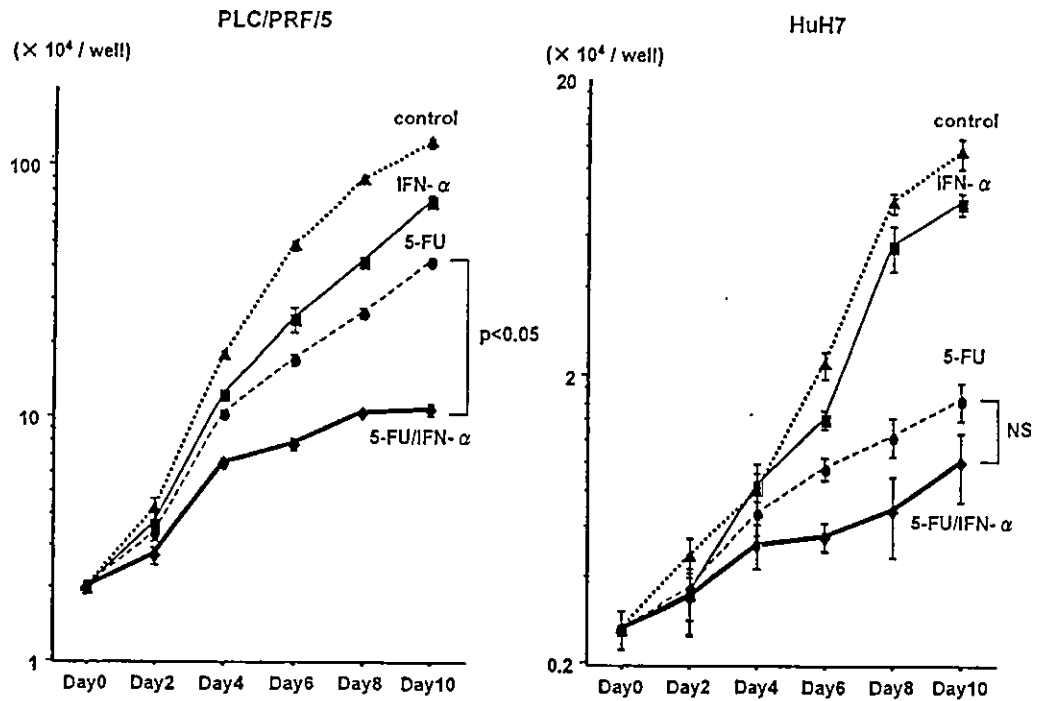


図4 肝癌細胞株におけるIFN-alpha/5-FU併用による増殖抑制効果の増強

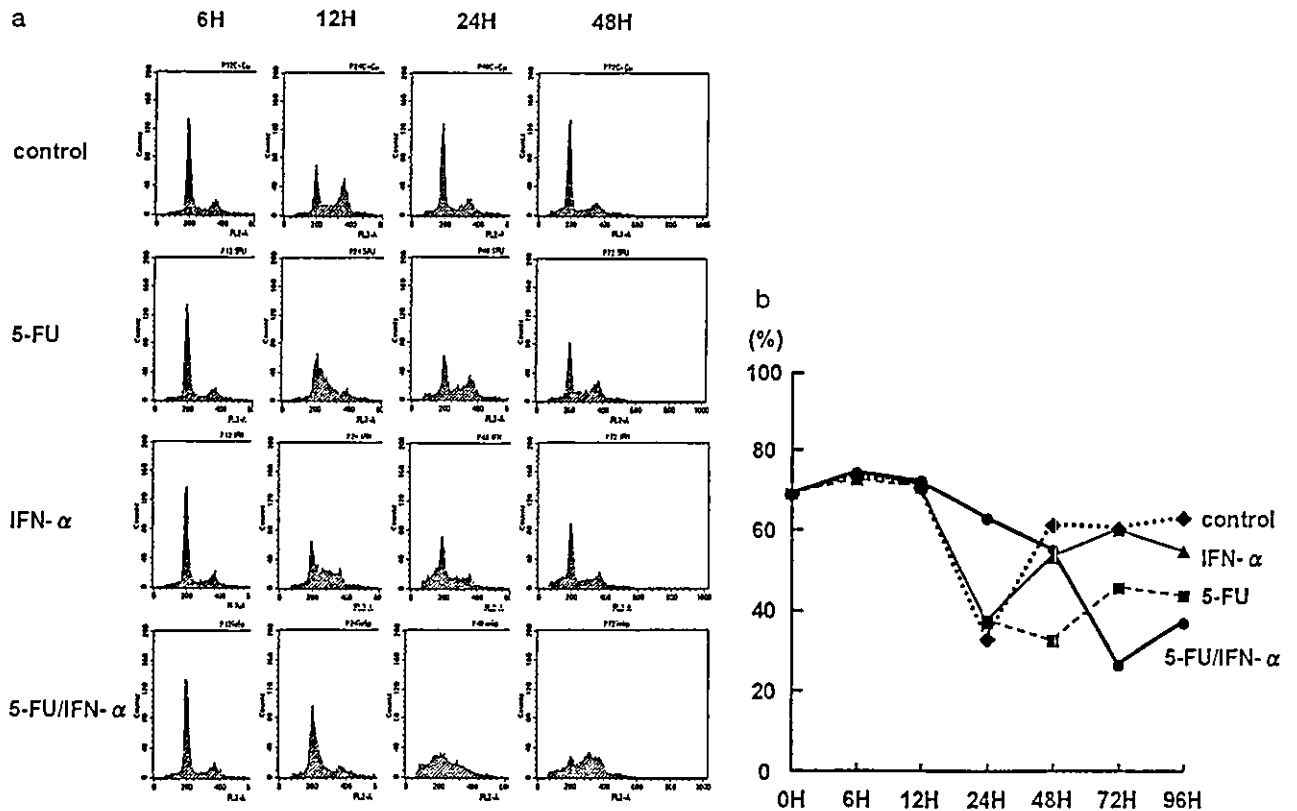


図5 肝癌細胞株のIFNAR発現 (文献26から転載)

となった(図3)。①については、肝細胞癌株を用いて検討したところ、IFN-alphaと5-FUの併用による増殖抑制効果の増強、細胞周期

の遅延作用(G0/G1期での細胞集積)があることがわかり(図4, 図5), これらに細胞周期関連蛋白であるp27kip1の発現の変化が関

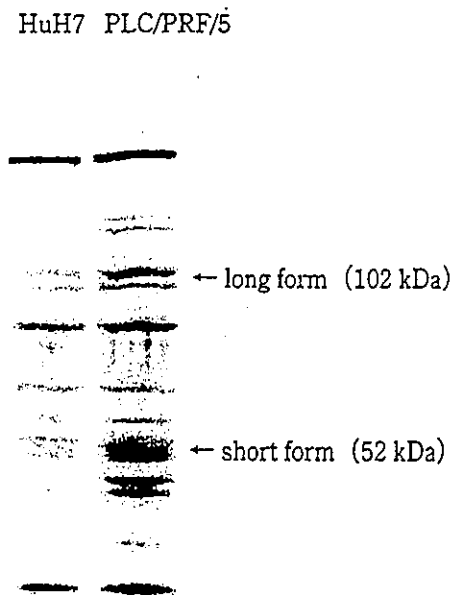


図 6

- a : IFN-alpha/5-FU 併用による細胞周期遅延作用 (PLC/PRF/5 株)
 b : G0/G1 期の細胞の割合 (文献 26 から転載)

与していることを見出した²⁶⁾。さらにこの増殖抑制効果は、肝癌細胞株の IFN-receptor (IFNAR) の発現が強い細胞株に顕著に認められ、IFNAR の発現の強弱が関与していることが明らかになった (図 6)。そして各細胞株で異なる IFNAR の発現が、signal transducer and activator of transcription (STAT 1) のリン酸化による活性化、apoptosis の頻度、および apoptosis 抑制蛋白である Bcl-xL の発現抑制とよく相関することが明らかとなった。これらより IFN-alpha/5FU 併用療法的作用機序の一つとして腫瘍細胞の IFNAR を介する経路があることが確認された。*In vivo* の検討においても、肝生検や肝切除で得られた肝癌組織を IFNAR 抗体を用いて免疫染色したところ、腫瘍部における IFNAR 発現が陰性の症例は IFN-alpha/5-FU 併用療法の治療効果を認めないことがわかり、IFNAR の発現は作用機序の重要な因子であると考えられる。次に②については Nude mouse を用い

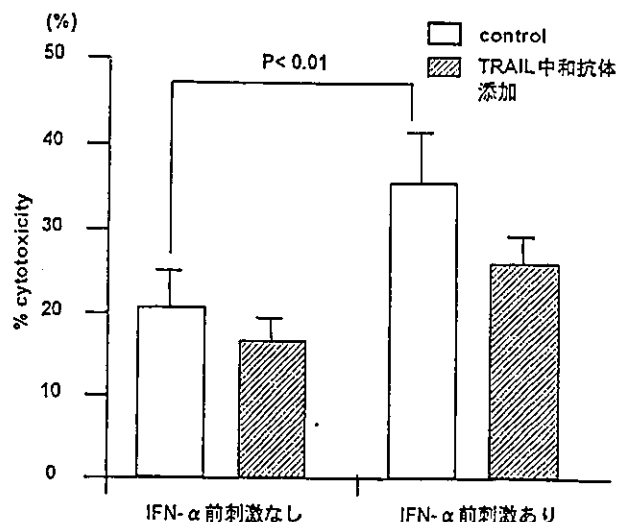


図 7 肝癌細胞株 (HLE 株) に対する末梢血単核球の細胞障害活性

た肝癌腫瘍移植モデルに対して、5-FU 単独、IFN-alpha 単独、IFN-alpha/5-FU 併用投与を行う実験を施行し検討した。移植腫瘍の大きさは IFN-alpha/5-FU 併用投与によりおのこの単剤投与に比べ有意に縮小効果が認められた。移植腫瘍は肉眼的に著名な中心壊死を示し、腫瘍内の新生血管数と血管新生に関わる因子について、現在検討中である。以上より血管新生抑制作用も作用機序の一つとして予想される。最後に③についてであるが、IFN-alpha の宿主免疫機構への作用の検討では、IFN-alpha 投与により Tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand (TRAIL) の発現が末梢血中の単核球に誘導されることを *in vitro*, *in vivo* の両方で確認した。*In vivo* の検討では、IFN-alpha/5FU 併用療法施行患者を奏効例、非奏効例に分けて末梢血単核球中の TRAIL mRNA の発現を比較検討したところ、奏効例では治療前に比べ治療後は約 1.5 ~ 2.5 倍増加しており、対照的に非奏効例では増加を認めなかった。さらに *in vitro* の検討では、肝細胞癌株に TRAIL-receptor の発現があるのを確認したうえで、末梢血単核球の肝癌細胞株に対する細胞障害

活性を検討したところ、末梢血単核球はIFN-alphaの前刺激を加えることにより有意に細胞障害活性が増加し、その一部はTRAILを介していることが明らかとなった(図7)。これらはIFN-alpha/5FU併用療法の作用機序としてTRAILを介した免疫賦活作用が関与していることを示している。

これらの結果について総括すると、本療法の抗腫瘍効果の機序については、5-FU代謝酵素の修飾やIFNARを介した細胞周期遅延作用、apoptosis誘導、血管新生抑制作用、TRAIL/TRAIL-receptorを介したapoptosis経路の修飾などが関与していると考えている。それぞれの作用機序の治療効果に対する貢献度は現時点では不明であるが、今後の検討で明らかにしIFN-alpha/5-FU併用療法の効果予測をはかりたいと考えている。

8 今後の展望

IFN-alpha/5-FU併用療法は難治性肝細胞癌に対して、非常に有望な治療法と考えられる。今後、本療法が広く浸透するためには、randomized control studyにて有効性を立証し、肝細胞癌に対するIFN-alphaの保険の適応拡大を実現する努力が必要となる。そしてIFN-alpha/5-FU併用療法が集学的治療の一選択肢として確立されれば、肝切除と、さらには肝移植とを組み合わせることにより高度進行肝細胞癌に対する治療成績が飛躍的に向上する可能性がある。しかしIFN-alpha/5-FU併用療法が無効となる症例が約半数存在することも事実であり、作用機序の観点からのさらなる基礎的解明もあわせて必要である。

文 献

- 1) Fujii T, Takayasu K, Muramatsu Y et al : Hepatocellular carcinoma with portal tumor thrombus: analysis of factors determining prognosis. *Jpn J Clin Oncol* 23 : 105-109, 1993
- 2) Ikai I, Yamaoka Y, Yamamoto Y et al : Surgical intervention for patients with stage IV-A hepatocellular carcinoma without lymph node metastasis: proposal as a standard therapy. *Ann Surg* 227 : 433-439, 1998
- 3) Fan J, Wu ZQ, Tang ZY et al : Multimodality treatment in hepatocellular carcinoma patients with tumor thrombi in portal vein. *World J Gastroenterol* 7 : 28-32, 2001
- 4) Shen DW, Lu YG, Chin KV et al : Human hepatocellular carcinoma cell lines exhibit multidrug resistance unrelated to MRD1 gene expression. *J Cell Sci* 98 : 317-322, 1991
- 5) Itamoto T, Nakahara H, Tashiro H et al : Hepatic arterial infusion of 5-fluorouracil and cisplatin for unresectable or recurrent hepatocellular carcinoma with tumor thrombus of the portal vein. *J Surg Oncol* 80 : 143-148, 2002
- 6) Lee HS, Kim JS, Choi IJ et al : The safety and efficacy of transcatheter arterial chemoembolization in the treatment of patients with hepatocellular carcinoma and main portal vein obstruction. A prospective controlled study. *Cancer* 79 : 2087-2094, 1997
- 7) Tazawa J, Maeda M, Sakai Y et al : Radiation therapy in combination with transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma with extensive portal vein involvement. *J Gastroenterol Hepatol* 16 : 660-665, 2001
- 8) Sakon M, Nagano H, Dono K et al : Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94 : 435-442, 2002
- 9) Nair PV, Tong MJ, Kempf R et al : Clinical, serologic, and immunologic effects of human leukocyte interferon in HBsAg-positive primary hepatocellular carcinoma. *Cancer* 56 : 1018-1022, 1985
- 10) Sachs E, Di Bisceglie AM, Dusheiko GM et al : Treatment of hepatocellular carcinoma with recombinant leucocyte interferon: a pilot study. *Br J Cancer* 52 : 105-109, 1985
- 11) A prospective trial of recombinant human interferon alpha 2B in previously untreated patients with hepatocellular carcinoma. The Gastrointestinal Tumor Study Group. *Cancer* 66 : 135-139, 1990
- 12) Llovet JM, Sala M, Castells L et al : Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 31

- : 54-58, 2000
- 13) Lai CL, Lau JY, Wu PC et al : Recombinant interferon-alpha in inoperable hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial. *Hepatology* 17 : 389-394, 1993
 - 14) Creagan ET, Long HJ, Frytak S et al : Recombinant leukocyte A interferon with doxorubicin. A phase I study in advanced solid neoplasms and implications for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61 : 19-22, 1988
 - 15) Kardinal CG, Moertel CG, Wieand HS et al : Combined doxorubicin and alpha-interferon therapy of advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 71 : 2187-2190, 1993
 - 16) Feun LG, Savaraj N, Hung S et al : A phase II trial of recombinant leukocyte interferon plus doxorubicin in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Oncol* 17 : 393-395, 1994
 - 17) Leung TW, Tang AM, Zee B et al : Factors predicting response and survival in 149 patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated by combination cisplatin, interferon-alpha, doxorubicin and 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer* 94 : 421-427, 2002
 - 18) Chung YH, Song IH, Song BC et al : Combined therapy consisting of intraarterial cisplatin infusion and systemic interferon-alpha for hepatocellular carcinoma patients with major portal vein thrombosis or distant metastasis. *Cancer* 88 : 1986-1991, 2000
 - 19) Kaneko S, Urabe T, Kobayashi K : Combination chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma complicated by major portal vein thrombosis. *Oncology* 62 : 69-73, 2002
 - 20) Stark GR, Kerr IM, Williams BR et al : How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67 : 227-264, 1998
 - 21) Sangfelt, Strander H : Apoptosis and cell growth inhibition as antitumor effector functions of interferons. *Med Oncol* 18 : 3-14, 2001
 - 22) Brassard DL, Grace MJ, Bordens R : Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol* 71 : 565-581, 2002
 - 23) Elias L, Sandoval JM : Interferon effects upon fluorouracil metabolism by HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 163 : 867-874, 1989
 - 24) Schwartz EL, Hoffman M, O'Connor CJ et al : Stimulation of 5-fluorouracil metabolic activation by interferon-alpha in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182 : 1232-1239, 1992
 - 25) Milano G, Fischel JL, Etienne MC et al : Inhibition of dihydropyrimidine dehydrogenase by alpha-interferon: experimental data on human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 34 : 147-152, 1994
 - 26) Eguchi H, Nagano H, Yamamoto H et al : Augmentation of antitumor activity of 5-fluorouracil by interferon alpha is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6 : 2881-2890, 2000

* * *

＜特集＞第24回日本癌局所療法研究会

経皮的マイクロターゼ凝固療法および5-FU,
Adriamycin, Cisplatin 肝動注化学療法が奏効した
胃癌術後肝転移の1例

山本 為義*¹ 永野 浩昭*¹ 左近 賢人*¹ 安田 卓司*¹
武元 浩新*¹ 辻野 督*¹ 太田 英夫*¹ 堂野 恵三*¹
梅下 浩司*¹ 中森 正二*¹ 矢野 雅彦*¹ 大須賀慶悟*²
村上 卓道*² 中村 仁信*² 門田 守人*¹

[*Jpn J Cancer Chemother* 29(12):2429-2432, November, 2002]

要旨 症例は61歳，男性。1998年9月に胃癌にて胃切除術を施行された。2000年11月，胃癌術後の多発性肝転移と診断され，2001年1月，肝血流遮断下経皮的マイクロターゼ凝固療法にて主腫瘍を壊死させた後に，FAP (5-FU, cisplatin, adriamycin) を用いた動注化学療法を施行した。3クール施行後，CRとなり，肝転移巣に対する治療開始より1年6か経過したが，無再発生存中である。FAP 動注化学療法を，本症例を含む胃癌肝転移4例に施行したが，奏効率75%と良好で有望な治療法であると考えられた。以上より，予後不良とされる胃癌肝転移ではあるが，FAP 肝動注療法と肝血流遮断下経皮的マイクロターゼ凝固療法などを組み合わせた集学的治療によって，予後の改善を得る症例が存在すると思われた。

A Case of Postoperative Multiple Hepatic Metastasis from Gastric Cancer Successfully Treated by Percutaneous Microwave Coagulation Therapy and Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy: Tameyoshi Yamamoto*¹, Hiroaki Nagano*¹, Masato Sakon*¹, Takushi Yasuda*¹, Hiroyoshi Takemoto*¹, Tadashi Tsujino*¹, Hideo Ota*¹, Keizo Dono*¹, Koji Umeshita*¹, Shoji Nakamori*¹, Masahiko Yano*¹, Keigo Osuga*², Takamichi Murakami*², Hironobu Nakamura*² and Morito Monden*¹ (*¹Dept. of Surgery and *²Radiology, Graduate School of Medicine, Osaka University)

Summary

A 61-year-old male who underwent radical resection for gastric cancer was diagnosed with multiple hepatic metastasis 2 years and 2 months after the surgery. He first underwent percutaneous microwave hepatic coagulation therapy with segmental hepatic blood flow occlusion and obtained complete coagulation of the main tumor. Consecutively, he received hepatic arterial infusion chemotherapy (FAP: 5-FU, cisplatin, adriamycin) against residual multiple hepatic tumors. These hepatic recurrent lesions disappeared completely after 3 sessions of arterial infusion chemotherapy. At present, this patient is alive with no recurrent lesions, 1 year and 6 months from the beginning of treatment for hepatic metastasis. Recently, we tried hepatic arterial infusion chemotherapy (FAP) in four cases in which the recurrence from gastric cancer was not only in the liver but elsewhere. The response rate (CR and PR) was 75% and no major side effects

*² 大阪大学大学院医学系研究科・生体情報医学

連絡先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 *¹ 大阪大学大学院医学研究科・病態制御外科学

山本 為義

0385-0684/02/¥500/論文/JCLS

were observed. In conclusion, some cases can obtain longer survival if the multimoderate therapy including hepatic arterial infusion chemotherapy (FAP) and microwave coagulation therapy are effective. Key words: Gastric cancer, Hepatic metastasis, Hepatic arterial infusion chemotherapy

はじめに

胃癌肝転移は腹膜播種やリンパ節転移などの他の再発形式を伴うことが多く大半が1年以内に死亡し予後不良である¹⁾。しかしそのような症例のなかで、肝転移巣が予後を規定すると考えられた場合には、肝切除術、肝動脈塞栓術 (TAE)、肝動注化学療法、マイクロターゼ凝固療法およびラジオ波凝固療法 (RFA) などが行われる。今回、われわれは胃癌術後多発肝転移に対し、肝血流遮断下経皮的マイクロターゼ凝固療法後、5-FU, adriamycin, cisplatin を用いた肝動注化学療法 (FAP 肝動注化学療法) を施行し1年6か月の無再発生存を得た症例を経験したので報告する。

I. 症 例

症例は61歳、男性。1998年9月に胃癌に対して、噴門側胃切除術、空腸間置術、D2 郭清を施行した。術後診断は、中分化型腺癌 (tub2), 0-IIc, sm, P0H0n0, stage Ia, 根治度 A であった。以後外来で経過観察中であったが、2000年11月、腹部超音波検査で肝転移を指摘され、精査加療のため入院した。画像検査では、肝動脈造影 CT で肝 S8 に4 cm 大、S4 に1 cm 大の濃染像を認め、同部位は門脈造影 CT で perfusion defect を示した (図 1a, b)。その他全肝にわたる微小病変を指摘されたため、胃癌術後の多発性肝転移と診断した。肝以外に転移再発病巣を認めなかったため、動注化学療法の適応と判断した。まず動注化学療法に先立って、2001年1月、腫瘍量減量を目的として S8 主腫瘍に対し肝血流遮断下経皮的マイクロターゼ凝固療法を施行した。中肝静脈をバルーンを用いて血流遮断して S8 の腫瘍を含む肝区域の血流が減弱するのを確認し (図 1c)、さらに右肝動脈より degradable starch microspheres (DSM) を200 mg 注入し肝動脈の血流を一時的に止めた状態で、経皮的マイクロターゼ凝固療法 (18 G elec-

trode needle, 60 W×1 min×4 回) を施行した。直後の CT では、腫瘍全体が凝固効果による淡い high density を示した。その後、遺残肝転移病巣の治療のため、同日左鎖骨下動脈より肝動脈内挿管術を施行し皮下にリザーバーを留置し、2001年2月より FAP (5-FU 500 mg/day day 1~5, cisplatin 5 mg/day day 1~5, adriamycin, 10 mg/day day 1 を1クール) を用いた動注化学療法を施行した。吐気および口内炎の副作用が認められたが、いずれも軽度であった。退院後、さらに外来にて FAP による動注化学療法を継続し、合計3クールを施行したところ、肝転移に対する治療開始から7か月経過した時点で、CT 上肝転移の完全消失を認めた (図 1d)。現在1年6か月経過したが、無再発生存中である。

II. 考 察

胃癌の異時性肝転移は、全身への血行性転移の一病変と考えられ極めてその予後は悪い。しかし、まれに肝転移以外予後を規定する因子がない場合には、肝切除、経皮的マイクロターゼ凝固療法、RFA, TAE, 動注療法などを組み合わせた集学的治療により長期生存を得たとの報告が散見される^{2,3)}。本症例においても、肝血流遮断下経皮的マイクロターゼ凝固療法と FAP 肝動注療法による集学的治療によって、予後の改善が得られた。

まず、治療に用いた経皮的マイクロターゼ凝固療法の適応は、一般的には3 cm 以下といわれているが、肝動静脈の血流遮断下で経皮的マイクロターゼ凝固療法を行うことにより、4 cm を超える腫瘍であっても凝固が可能となる^{4,5)}。本症例では中肝静脈と右肝動脈の血流を遮断した状態で、肝 S8 の約4 cm 大の腫瘍に対し経皮的マイクロターゼ凝固療法を施行し、良好な局所腫瘍効果を得た。

第二に本症例が長期予後を得たのは、動注化学療法が有効であったことがあげられる。肝転移遺残または切除不能肝転移に対する治療は動注化学

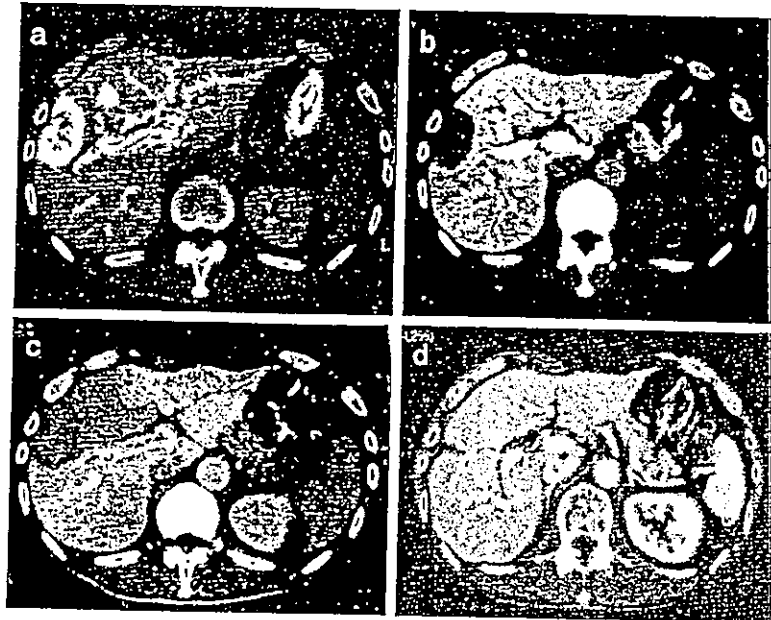


図1 CT像

- a, b: 胃癌根治術後2年2か月後の肝転移巣 (S8 4 cm大, S4 1 cm大)。
- c: 中肝静脈バルーン血流遮断下CTHAで門脈血流欠損域がS8腫瘍の全存在域を覆うことを確認。
- d: 肝転移に対する治療開始から7か月後のCTでは肝転移の消失を認める。

表1 当科における、胃癌根治術後肝転移に対するFAP動注療法

症例	原発巣	胃癌手術	肝転移巣	Cycle数	効果	肝再発後 転帰	副作用
61歳 男性	IIb, 1.2×1.2 cm tub2, sm, n0	噴門側胃切除	S8 4 cm+multiple 異時性, 術後2年3か月	3 [†]	CR	1年6か月 生存	口内炎 吐気
73歳 男性	IIc, 3×2 cm tub1, sm, n0	幽門側胃切除	1 cm大 multiple 異時性, 術後2年8か月	2	PR	6か月 生存	なし
72歳 男性	2型, 3.5×2.9 cm tub2, ss, n1	胃全摘	1 cm大 multiple 異時性, 術後6か月	8	PR	11か月 生存	なし
74歳 男性	5型 por1, ss, n0	幽門側胃切除	S7 3 cm → multiple 異時性, 術後2年2か月	4 [*]	NC	1年2か月 癌死	胸痛

[†]: 肝血流遮断下経皮的マイクロターゼ凝固療法施行, ^{*}: 肝部分切除施行

療法を施行するのが一般的であり、5-FU, adriamycin, mytomyacin C, epirubicin, CDDPなどの薬剤を組み合わせた多剤併用動注療法の奏効率は33.3~79%であり全身化学療法に比べよい傾向にある^{6,7)}。またFAP療法は進行胃癌や再発胃癌に対して、37.9~50%の奏効率があり標準的な治療法として考えられている^{8,9)}。われわれはFAP療法を動注療法に応用し、現在までに4例の異時

性肝転移にFAP動注化学療法を施行した(表1)。全例、根治度Aの胃切除後の全肝多発再発例で、肝以外に再発のない症例であった。原発巣の組織型はtub2, 2例, tub1, 1例, por1, 1例と分化型癌が多かった。動注療法を2~8 cycle行い、1例は肝血流遮断下経皮的マイクロターゼ凝固療法を、1例は肝部分切除術を併用した。治療効果はCR1例, PR2例, NC1例で、奏効率は75%と

極めて良好であった。また副作用は、吐気、口内炎、胸痛を認めたがいずれも軽度であり、胃癌肝転移に対しFAP肝動注療法は一つの有望な治療選択であると考えられた。

以上より、一般的には予後不良とされる胃癌肝転移ではあるがそのなかで、肝動注療法とマイクロターゼ凝固療法などの局所療法を組み合わせた集学的治療によって、予後の改善を得る症例が存在すると考えられる。

文 献

- 1) 磯崎博司, 岡島邦雄, 一ノ名正・他: 肝転移の危険因子と予後因子. 外科 58: 833-841, 1996.
- 2) 鈴木 玲, 柴田 高, 新居延高宏・他: 集学的治療にて長期生存した胃癌肝転移3症例の検討. 癌と化学療法 27(12): 1997-2000, 2000.
- 3) 真鍋達也, 岩下俊光, 中村義彦・他: 長期生存した胃癌肝転移の4例. 外科 62: 1307-1309, 2000.
- 4) Shibata T, Murakami T, Ogata N, *et al*: Percutaneous microwave coagulation therapy for patients with primary and metastatic hepatic tumors during interruption of hepatic blood flow. *Cancer* 88: 302-311, 2000.
- 5) Murakami T, Shibata T, Ishida T, *et al*: Percutaneous microwave hepatic tumor coagulation with segmental hepatic blood flow occlusion in seven patients. *Am J Roentgenol* 172: 637-640, 1999.
- 6) 橋本道紀, 辻 寧重, 富田一郎・他: 胃癌肝転移に対する動注化学療法の検討. 癌と化学療法 24(12): 1715-1718, 1997.
- 7) 荒井邦佳, 北村正次, 岩崎善毅: 肝動注療法による肝転移へのアプローチ. 外科 58: 847-850, 1996.
- 8) Kikuyama S, Inada T, Miyakita, *et al*: Phase II study of 5-fluorouracil, pirarubicin and low-dose consecutive administration of cisplatin for advanced and recurrent gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 28(5): 314-317, 1998.
- 9) Moertel CG, Rubin J, O'Connell MJ, *et al*: A Phase II study of combined 5-fluorouracil, doxorubicin and cisplatin in the treatment of advanced upper gastrointestinal adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 4: 1053-1057, 1986.

DNA チップ技術を用いた癌研究の現状と展望

竹政伊知朗^{1,2)}

山崎 誠^{1,3)}

門田守人¹⁾

- 1) 大阪大学大学院医学系研究科臓器制御医学専攻病態制御外科学
- 2) 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス科ゲノム機能解析
- 3) DNA チップ研究所

ポストゲノム時代の癌研究では、DNA チップの有用性が広く認識されるようになり、key 遺伝子の同定だけではなく、従来より強力な癌の特性分類・診断の可能性が示唆され大きな成果をあげている。これまでに報告されたDNA チップを用いた癌研究の論文をレビューしながら、DNA チップの現況と今後の展望について概要した。今後DNA チップの改良を重ねることにより、研究面ではゲノム、プロテオーム技術との併用による癌の体系的な分子生物学的構造の解明が期待される。またtranslational researchの必要性が唱えられるなか、臨床面では、その成果をもとにコンテンツを厳選したサブアレイを開発することによりDNA チップの臨床応用が期待される。

■ Key Words ▶ DNA chip, cancer research, individuation of cancer, expression profile, clinical applications

はじめに

1982年にはじめて*ras* 遺伝子が癌遺伝子として分離された後¹⁾、現在までに数多くの癌遺伝子や癌抑制遺伝子が同定され、癌はいくつもの遺伝子異常が多段階に蓄積されるに従って発生・進展することが明らかとなり、「癌は遺伝子の病気である」と認識されるようになった^{2,3)}。遺伝子の異常には、ゲノムの塩基配列の突然変異、転座、増幅、欠失といった異常のほか、DNAのメチル化、クロマチン構造の変化、ヒストンのアセチル化などエピジェネティックな変化も大きな影響を

及ぼし、それが癌の特性として体系的な遺伝子発現に現れることがわかってきた。

ポストゲノム時代におけるゲノム研究の重点は、遺伝子機能解析やタンパク質の構造・機能解析などを主目的とするゲノム機能科学 (functional genomics) へと移行しつつある。ゲノム機能科学とは遺伝子発現調節のネットワークを明らかにしつつ、その情報をゲノム構造のなかに読み取ろうという試みである⁴⁾。これに伴って、癌研究も新たな局面を迎え、これまでに蓄積されてきた臨床病理学的エビデンスをもとに体系的なゲノム解析を加え、癌の個性を解明する重要性が認識されるようになった⁵⁾。そのためには、単に個々の因子を追究するだけではなく、癌の発生・進展にかかわる多数の遺伝子を体系的に解析することが必須であり⁶⁾、そのツールとして近年DNA チップが広く用いられるようになり成果をあげている。本稿では、DNA チップ技術を用いた癌研究

Overview of DNA microarray technology and its application in clinical oncology

Ichiro Takemasa^{1,2)}, Makoto Yamasaki^{1,3)}, Morito Monden¹⁾

- 1) Clinical Oncology and Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University
- 2) Functional Genomics, Nara Institute of Science and Technology
- 3) DNA Chip Research Institute

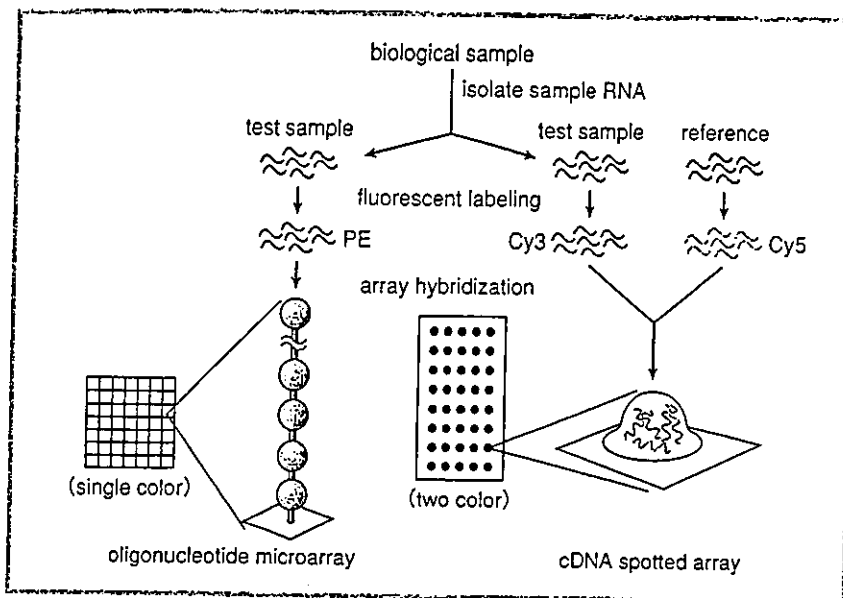


図1 oligonucleotide array と cDNA spotted array

oligonucleotide array (オリゴチップ) はプローブとなるオリゴDNAを基板上で直接合成・作製し、テストサンプルの遺伝子発現情報を一色法で検出する。cDNA spotted array (cDNA マイクロアレイ) はcDNAライブラリーなどから選んだcDNAクローンをPCRで増幅しプローブとして基板上にスポットして作製し、テストサンプルとリファレンスの遺伝子発現情報を二色法で検出する。

PE: フィコエリトリン

の現状と展望について、臨床応用という視点から概要する。

遺伝子発現プロファイル解析手法と DNAチップの種類

癌研究における遺伝子発現解析手法は、これまでノーザンブロット法など一度に数種類程度の遺伝子発現しか調べられないものが主であったが、包括的な遺伝子発現解析の重要性が認識されるようになり、大量の遺伝子数を解析できる方法としてDD (differential display) 法⁷⁾, SAGE (serial analysis gene expression) 法⁸⁾, RDA (representational different analysis) 法⁹⁾などが開発された。しかし、これらの方法も技術的な面で一度にたくさんの症例を調べるのには不向きであった。これに対してDNAチップは一度に数千種類以上の遺伝子の発現状態 (遺伝子発現プロファイル) を、大量の症例で調べることができ、その有用性が広く認識されるようになった。

現在よく用いられているDNAチップは、Affymetrix社製のGeneChip¹⁰⁾ (Affymetrix型) と、Stanford大で開発されたcDNAマイクロアレイ¹¹⁾ (Stanford型) の2つに大別される。いずれの方法も相補的な核酸同士のハイブリダイゼーシ

ョンに基づいた遺伝子発現レベルのアッセイ技術を発展させたものである (図1)。

Affymetrix型は、半導体の露光技術であるフォトリソグラフィを応用して、マスクとよばれる遮光板を用いて露光作業を繰り返し、オリゴDNAを1塩基ずつシリコン基板上で直接合成してプローブを作る方法である。特異的配列をもったオリゴDNAをデザインすることによってクロスハイブリダイゼーションが抑えられること、プローブ長が均一であること、スプライシングバリアントの検出も可能であることなどが特徴としてあげられる反面、カスタム化しにくいこと、非常に高価格であることが難点である。

Stanford型は、あらかじめ用意しておいた大量のcDNAや合成オリゴDNAをスライドガラスにスポットしてプローブを作る方法である。スポットには細いピンを用いるアタッチメント方式のほか、プリンターに用いられているマイクロセラミックポンプ技術を利用したインクジェット方式が応用されている。比較的安価で、カスタム化しやすいため多くの研究室で根強く使用されているが、当初は、cDNAをPCRで増幅させガラス基板にスポットしていただけなので、チャージ結合が不十分なことによるウォッシュ過程でのプロー

ブの剥落, プローブ長の不均一性, 類似遺伝子のクロスハイブリダイゼーションなどにより, 十分な再現性や精度が得られないことも多く, 定量性に問題があった。しかし近年, 2本鎖cDNAを1本鎖cDNAに変えてハイブリダイズしやすくする, 検出したい遺伝子に特異的な配列を選び出して合成したオリゴDNAをプローブに用いてクロスハイブリダイゼーションを抑える, 合成オリゴの一端とスライドガラスにそれぞれ官能基を付けて反応させ, 共有結合で固定することでプローブをはがれにくくする, 蛍光色素によるラベリングテクニックを改善する, など種々の改良によってデータの信頼性が高まり, 再現性のよいチップが手に入るようになってきた。

取得情報と解析

発現プロファイル解析とは, DNAチップなど解析ツールで得られた遺伝子側の発現情報と生物学的な特徴の関係を比較検討し, 有意義な情報を検索することである。解析する際に重要なのは, 発現情報はもちろん, 解析基盤となるサンプル側の臨床病理学的情報のデータクオリティーを高めることである。たとえ, いかにも高品質のDNAチップを用い, 高度の解析技術を駆使しても, サンプル側の情報の質が低ければ, 発現解析結果と臨床情報の間には不確かな乖離が生じ, 臨床応用に有意義な答えには決して到達できない。サンプルがもつ臨床病理学的情報の信頼性には, 臨床経過による時間的変遷, 病理学的診断における不均一性など限界があるため, 質の高い情報を得るためには, 統一された病理診断と治療方針, および十分な予後調査が必要である。

DNAチップを用いて得られる遺伝子側の発現情報は膨大であるため, 適切なデータ前処理と解析方法を選択することが重要である。データ前処理とは, チップのロット間に生じる誤差など実験ごとのアーチファクトをできる限り取り除き, データの質を均一化するためのデータフィルタリン

グ処理のことで, 発現強度の低い遺伝子情報のカットオフや, 実験間のバイアスを最小限に抑えるための標準化は, 信頼度の高い解析のために不可欠である¹²⁾。また, この処理を通して生じる欠損値の補填方法にも種々なものがあり, どの方法を用いるかで結果が異なる可能性があるので注意が必要である¹³⁾。現在, 発現プロファイルを解析するために用いられている方法は, 教師なし学習 (unsupervised learning) と教師あり学習 (supervised learning) に大別される (図2)。

クラスター解析¹⁴⁾に代表される unsupervised learning は, 遺伝子発現情報だけで, サンプルを似たものの集合体 (クラスター) としてとらえ, 異なる特徴に基づくクラスターに区分していく分類方法である。この方法は生物学的特徴に関する情報をもたずに発現情報だけでサンプル間の特徴構造を認識できるので, これまでの臨床病理学的な情報ではとらえられていないサブクラスをみつけられる可能性をもつ反面 (class discovery), ノイズの多い遺伝子情報を一緒に解析してしまうと, 非常に複雑な関連性をもつ臨床生物学的な特徴を反映しきれず, クラスターによる分類が, 生物学的, 臨床的意味合いの薄い不明瞭なものになってしまうことがある。これに対して supervised learning はあらかじめ臨床病理学的にクラス分けされたモデルサンプルを利用して, ANN (artificial neural network)¹⁵⁾ や, SVM (support vector machine)¹⁶⁾ などの識別基による判別関数を設計し, クラス分けされていない別のテストサンプルにこの判別関数を当てはめ, その分類を予測するものである (class prediction)。分類予測結果を繰り返しフィードバックさせて識別基の性能を向上させることで, 高い予測能力が得られる反面, その予測は現存する臨床病理学的事項に基づくため, 新しいサブクラスをみつけたりするには不向きである¹⁷⁾。

また多くの場合, 遺伝子発現データはサンプル数が限られる (数十~百例程度) 一方で, 解析遺

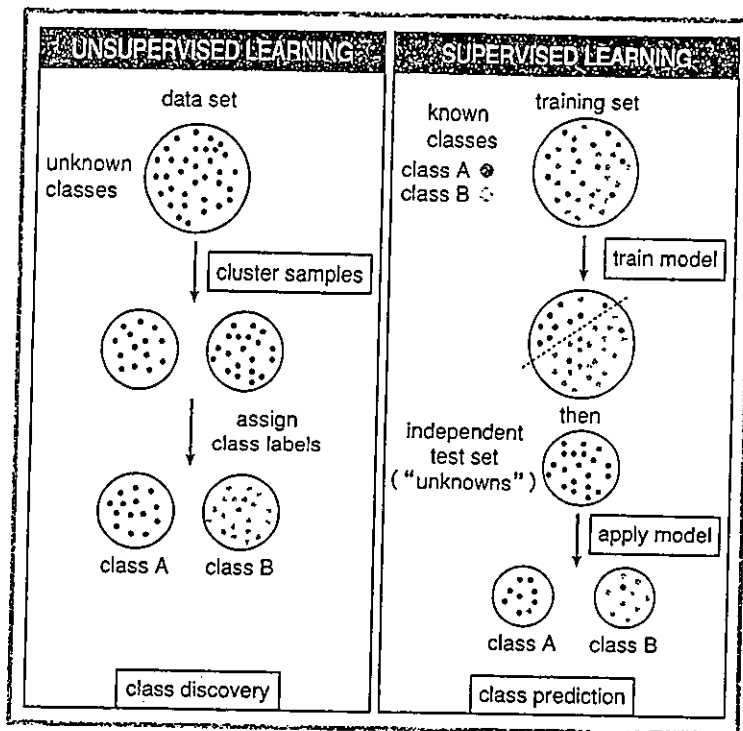


図2 遺伝子発現プロファイルの解析手法：
unsupervised learning と supervised
learning について

unsupervised learning は、臨床サンプルを遺伝子発現プロファイルの類似性に基づいたクラスターに分類する方法である。このアプローチは従来の臨床病理学的分類では認識しえなかった subclass をみつけられる可能性がある (class discovery)。これに対して supervised learning は、あらかじめ生物学的特徴に分けられた臨床サンプルを、train model として得られた遺伝子発現情報をテストセットに当てはめてその分類を決定する方法である。このアプローチによりプロスペクティブに収集されたサンプルの分類の予測が可能である (class prediction)。

(Ramaswamy S et al. *J Clin Oncol* 20, 1932, 2002¹⁷⁾ より)

伝子数は数千以上と圧倒的に多い。こうした統計学的にアンバランスなデータの解析結果は、たまたま偶然に起こったものととらえられる可能性があり、いずれの方法を用いても有意義な情報を導き出すことは容易ではない。サンプル数を解析遺伝子数と同等量まで増加することができれば問題ないが、実際には非常に困難である。解析結果の信頼性を得るためには、イニシャルデータで解析した結果を、まったく別の独立したテストセットで validation することや、偶然性を除外するための permutation test¹⁸⁾ などを行い、統計学的な有意性を検証することが望ましい¹⁹⁾。

DNAチップを用いたヒト癌の 遺伝子発現プロファイル解析

癌遺伝子、癌抑制遺伝子をはじめ、細胞周期調節、増殖、接着、血管新生、タンパク質分解など癌の発育・進展に関連する多くの既知遺伝子群、さらには EST (expression sequenced tag)、未知遺伝子群も含め、DNAチップを用いた包括的な遺伝子発現プロファイル解析によって、ヒト癌に

おける新たな知見が報告されるようになった。これらの研究には、癌細胞と対照細胞 (正常細胞) の発現プロファイルを比較し異なる発現を示す遺伝子群を同定する単純なものから、多数の癌の生物学的特徴の解析と発現プロファイルによる分類の対応をつけようというより総合的な試み、あるいは遺伝子変化的観察による遺伝子の機能解析やシグナル伝達経路の解明を含むものまで多岐にわたっている。DNAチップを用いたヒト癌研究は、1996年にStanford大のグループが悪性黒色腫の cell line での発現を調べたのが最初で²⁰⁾、その後数多くの報告がみられるようになった。

ここで1996年から2002年4月までに報告されたDNAチップと癌研究の論文を整理し、これまでの研究をレビューしてみたい。

Medline上、これまでに報告されたDNAチップ関連技術を用いた論文は約4,000にのぼり、そのうちヒト癌を扱ったものだけでも約700になる。ここではDNAチップ技術が中心的役割を果たしているヒト癌の発現プロファイル解析に関する285論文についてまとめてみた。図3AはDNA

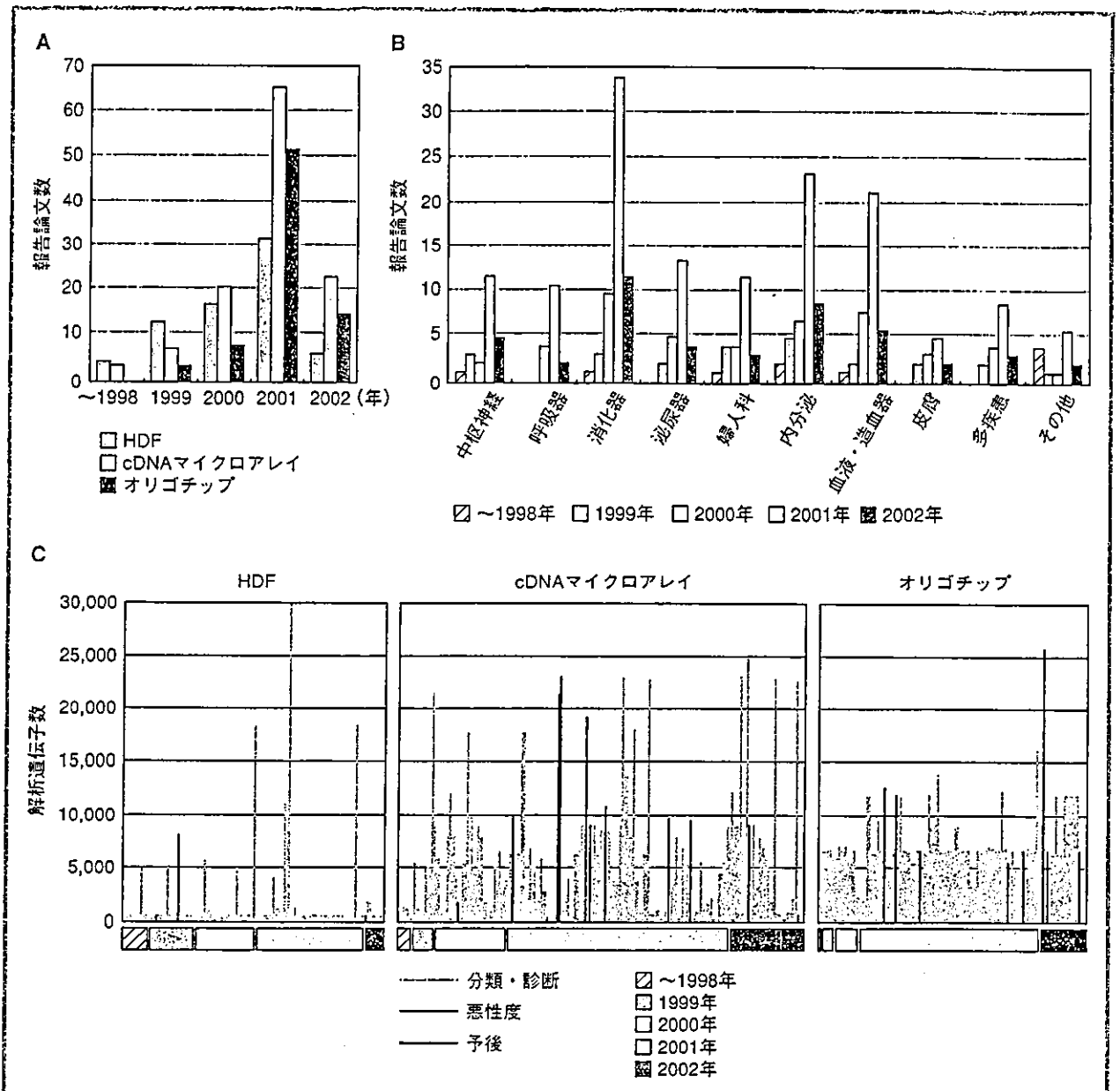


図3 DNAチップの種類別の報告論文数(A)と解析遺伝子数(C)および疾患部位別の報告論文数(B)

A: 1996~2002年4月に報告された、DNAチップを用いたヒト癌に関する研究をDNAチップの種類別(HDF, cDNAマイクロアレイ, オリゴチップ)にまとめたものである。2000年よりcDNAマイクロアレイ, オリゴチップともに年々報告数が増加し、癌研究におけるDNAチップの有用性が広く認識されるようになった。

B: 疾患部位を中枢神経, 呼吸器, 消化器, 泌尿器, 婦人科, 内分泌, 血液・造血器, 皮膚, 多疾患, その他に分けて、DNAチップを用いたヒト癌に関する研究の報告論文数を示した。ほぼすべての癌腫でDNAチップを用いた発現プロファイル解析が行われている。

C: DNAチップの種類別(HDF, cDNAマイクロアレイ, オリゴチップ)に、基板ごとの解析遺伝子数(スポット数/枚)を示した。一度に数多くの遺伝子を解析し、より包括的なアプローチを試みるものと、数は少なくとも重要な遺伝子を選出して有意義な情報を検索しようとするものに分けられる傾向がある。棒グラフの「分類・診断」は発現プロファイルによる癌の特性分類・診断について述べられているもの、「悪性度」は癌の悪性度診断の可能性についての記述がみられるもの、「予後」は予後予測診断の可能性についても言及されているものである。

チップの種類別〔HDF (high density filter), cDNA マイクロアレイ, オリゴチップ〕に、報告された論文数を年代順に示したものである。HDF はスライドガラスの代わりにナイロンメンブレンを基板にcDNAをスポットして、放射性原子または蛍光色素によってラベリングされたターゲットの発現を検出するもので²¹⁾、1999年ごろまでよく用いられていたのがわかる。2000年からはcDNA マイクロアレイを用いた論文が多数報告されるようになり、2001年からはオリゴチップを用いたものも増えてきている。

図3Bは、疾患部位別の論文数である。1997年に米国のNCI (National Cancer Institute) 主導で発足し、発現プロファイル解析による体系的な癌の分類・診断を目的としたCGAP (Cancer Genome Anatomy Project)²²⁾の解析対象疾患が、ヒトで発生率の高い5種類の癌(前立腺, 卵巣, 乳腺, 肺, 消化管)であることの影響もあり、消化器癌(大腸癌, 胃癌, 肝細胞癌など), 内分泌癌(乳癌など), 血液・造血器系の癌(白血病, リンパ腫), 婦人科系の癌(卵巣癌など), 泌尿器系の癌(前立腺癌など)での報告が目立つが、ほとんどすべてのヒト癌腫でDNAチップを用いた研究成果が報告されていることがわかる。

図3CはDNAチップ種類別の解析対象遺伝子数(遺伝子スポット数/枚)を示したものである。スポット密度を高くして、より多くの遺伝子を対象に網羅的な解析を試みようとするものと、少なくとも重要な遺伝子だけを選びすぐって解析をしているものに分けられるようである。オリゴチップは、ほとんどすべてがAffimetrix社製のもので、6,800個, 12,000個版など数種類のチップが用いられていた。これに対してcDNAマイクロアレイのスポット数はさまざまに各研究機関においてカスタムメイドされたものを使用しているケースが多いと思われる²³⁾。またグラフの「悪性度」, 「予後」はそれぞれ癌の悪性度診断, 予後予測についての記述がみられる論文を示し、少しずつで

はあるが最近増えていく傾向があるようである。これは発現プロファイルで癌の分類をするだけでなく、その分類がいかに臨床に役立つかということに重点が移りつつあることを示している。

これらのうち特に重要と思われる報告を、癌の分類・診断について述べてあるものと、診断・結果予測について述べてあるものに分けていくつか紹介する。

1. 癌の分類・診断

Golubらは、急性リンパ球性白血病(ALL)と、急性骨髄性白血病(AML)は“predictor”遺伝子群の発現パターンによって判別が可能であることを示した¹⁸⁾。現在の病理学診断を用いればALLとAMLを形態学的に区別することはそれほど困難なことではないが、この論文は、発現プロファイルによる癌の分類の可能性を示した最初の報告であり、これ以降の同様の論文に最も大きな影響を与え、その考え方の基本となっている。

Bittnerらは、悪性黒色腫は発現プロファイル解析によって、悪性度の高い群をサブクラスとしてとらえることが可能なことを示した。悪性黒色腫は形態学的な分類が困難であるため、発現プロファイルによる分子生物学的な癌の分類が有用であることを報告している²⁴⁾。

Perouらは、乳癌患者の生物学的なvariationが分子レベルで分類可能であることを示した。また癌組織内に混入する間質細胞やリンパ球といった正常細胞もその発現パターンから識別可能であり、多種類の細胞から成るヒト固形癌でのcDNAマイクロアレイを用いたゲノムワイドな遺伝子発現解析の可能性と有用性を示した^{25,26)}。

Hedenfalkらは、家族性乳癌の遺伝子発現プロファイルが、BRCA1の変異によるものとBRCA2の変異によるものとは有意な違いを認めたことより、germ-lineの変異がその発現プロファイルに影響を及ぼす可能性を示した²⁷⁾。

このような報告の多くは、ある癌腫に狙いをつけその生物学的特徴を遺伝子発現情報によって解

析しようというものであるが、ごく最近では、数種類の癌腫を対象にしたマルチクラスの解析もみられるようになった。Khanらは、組織学的には区別が難しい小円形青色細胞腫に属する4種類の癌も、その遺伝子発現パターンをANN: supervised learningで処理することによって、きわめて精度の高い識別が可能であることを示した²⁸⁾。

Ramaswamyらは218例14種類の癌腫(原発巣と転移巣)の発現プロファイルをSVM: supervised learningを用いて78%のaccuracyでその発生組織に正しく分類することが可能であり、転移巣の解析ではその原発組織を正確に判定しうることも示した。この報告は、たとえば原発不明の転移巣があったとしても、転移巣の遺伝子発現プロファイル解析ができれば原発巣を推定しうることを示したもので、臨床応用への期待がもたれた²⁹⁾。

2. 予後・治療奏効性予測

Alizadehらは、びまん性大B細胞リンパ腫(diffuse large B cell lymphoma; DLBCL)患者のリンパ腫細胞における遺伝子発現プロファイルをクラスター解析した。患者は、胚中心B細胞様の発現プロファイルを示すものと、活性化末梢血B細胞様の発現プロファイルを示すものの2群に分類することが可能で、前者は、後者に比べ明らかに予後良好であった。DLBCLは非Hodgkinリンパ腫のうち最も一般的なサブタイプで、現在の治療で長期予後が得られるのは約40%と悪性度が高いにもかかわらず、形態学的、免疫組織学的な確定的マーカーはなく、患者によって予後には大きなばらつきがみられていた。しかし、発現プロファイルによる分子レベルでの分類により、既存の形態学的・病理学的診断ではできなかった予後予測が可能になった。またこの分類により、診断後、画一的に施行されていた多剤化学療法の適応の妥当性の見直しや、骨髄移植の診断段階からの早期適応の考慮など、個々の患者に適したより有効な治療法を選択できるようになると報告している³⁰⁾。

その後Shippは、supervised learningにより従来のリンパ腫の病期分類(IRI)では比較的低悪性度に属する症例群を、発現プロファイルによって5年生存率が決定的に異なる(70% vs. 12%) 2群に分けることが可能であることを示した³¹⁾。

Pomeroyは、形態学的に判別困難で予後予測が困難であった中枢神経系の胎児性腫瘍のうち、最も数の多い髄芽細胞腫(medulloblastoma)が他の中枢神経系腫瘍とはまったく異なった遺伝子発現プロファイルを示し、supervised learningによってその予後予測が可能であることを報告した³²⁾。

個々の患者の抗癌剤感受性を予測するのは非常に困難なことであるが、2000年にはじめて遺伝子発現と分子薬理学の関連性を指摘する報告がされた。ScherfはNCIで開発された薬剤スクリーニング用のNCI60パネルという60種類のヒト癌のcell lineを用いて、クラスター解析により118種類の薬剤感受性と遺伝子発現パターンの関連性を見出した³³⁾。

さらにStauntonはNCI60パネルを用いて、supervised learningにより薬剤感受性は遺伝子発現プロファイルによって統計学的に有意に予測可能であることを示した³⁴⁾。in vitroの実験結果が実際の臨床にどれだけあてはまるのかはまだ不明であり、今後in vivoでの成果が待たれる。

これらの報告はDNAチップを用いた遺伝子発現プロファイル解析が、癌の個性や、薬剤耐性のメカニズムを解明するのに非常に重要な役割を果たし、標的分子の同定のみならず、従来の分類よりパワフルな癌の特性分類・診断が可能となること示している。今後、病理学的アプローチと分子生物学的アプローチをバランスよく臨床に取り入れることで、臨床診断能を向上させ、個々の症例に応じた癌治療(個別化医療)による治療成績の向上が期待される。

臨床応用に向けての課題と問題点

結核菌を含む抗酸菌3種やクラミジアの同定な

ど、細菌性感染症診断ではすでにPCRが保険適用となり、臨床現場に大きなインパクトをもたらした。PCR導入の最大の意義は、診断に要する時間が従来の培養法に比べて格段に早くなることである。DNAチップがPCRと同等のインパクトをもって今後の癌の遺伝子診断に応用されるかどうかは、ユーザーである医療機関側にいかにメリットを与えるかにかかっている。DNAチップが今後の癌研究において大きな役割を担うことに疑う余地はないが、実際の臨床応用のためにはまだ多くの課題と改善点が残されている。

1. 技術改良とコンテンツ

臨床応用のためには、まずチップ自体の感度と精度を向上させ、なおかつ再現性を確保することが必須である。そのために、基板のコーティングやフラットネスの改善、プローブの種類やデザイン、プローブと基板との結合性、スポット技術、色素の種類やラベリングテクニックなど、多くの点で現在も改良が重ねられている³⁵⁾。また、アレイヤー、スキャナーといったハードウェアの技術開発も進んでいる。しかし何よりも重要なことは、臨床診断用に役立つ遺伝子(コンテンツ)を厳選して、転移予測診断用、予後予測診断用、化学・放射線療法感受性診断用など、目的に応じた実践的なDNAチップを開発することである。また、cost-efficiency(低価格化)、user-friendly(簡易化)を実現することも不可避な条件である。臨床診断用チップのコンテンツを入手するためには、癌患者からの病理組織を用いた、十分量の発現解析情報が必要であり、さらにその情報のなかからエッセンシャルな情報を得るためには情報解析ツールなど、データマイニングにかかわる情報生物学(bioinformatics)が非常に大きな役割を担うと考えられる³⁶⁾。今後は、癌研究(oncology)、実験理論(methodology)、情報処理(bioinformatics)にかかわる3者がバランスよく協力することが大切である³⁷⁾(図4)。

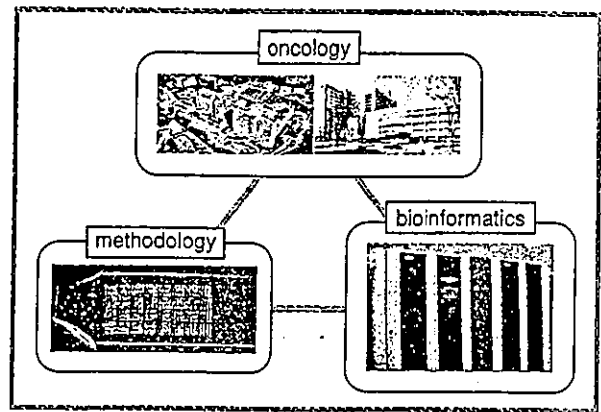


図4 癌研究と実験方法と生命科学情報の連携

DNAチップで得られる遺伝子発現情報は膨大であり、そこから有意義な情報を手に入れるためには、癌研究(oncology)、実験理論(methodology)、情報処理(bioinformatics)にかかわる3者がバランスよく協力することが大切である。

2. 臨床サンプルの組織不均一性

固形腫瘍は、腫瘍組織の分化度に違いがあるうえ、腫瘍細胞のほかに、上皮細胞、間質細胞、脂肪細胞、炎症細胞、微小脈管など多くの正常細胞が混入しており、組織不均一性(heterogeneity)をもっている。そのため、臨床ステージが同じ腫瘍でも、その悪性度には大きな違いが生じることがしばしば経験される。この腫瘍のheterogeneityは遺伝子発現プロファイルにも大きな影響があると考えられる。つまり同一の腫瘍でも、サンプリングする部位によって発現プロファイルは大きく異なる可能性が考えられ、どこを、どのようにサンプリングするのが大きな問題である。現在のサンプリングの考え方は、純粋な癌細胞だけ(顕微鏡的)を解析するものと、癌組織全体(肉眼的)を解析するものに分けられる。前者は、LCM(laser capture microdissection)³⁸⁾などを用いて固形癌組織から正常細胞の混入をなるべく避け、癌細胞そのものの性質を追究しようとするものである。正常組織とのinteractionが最も激しい癌先進部での性格がその癌の悪性度を反映することはよく知られていることで、LCMを用いfocusされた発現プロファイリングによって、より正確な悪性