

厚生労働科学研究研究費補助金

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  
(16271201)

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 森 正樹

平成19（2007）年4月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成19年 4月10日

厚生労働大臣 柳沢 伯夫 殿

住 所 〒874-0838 別府市鶴見原4546

フリガナ モリ マサキ

研究者 氏 名 森 正樹 印

(所属機関 九州大学生体防御医学研究所)

平成18年度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)に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) : 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(16271201)

国庫補助金精算所要額 : 金19,200,000円也(うち間接経費 0円)

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (別添4のとおり)
5. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5のとおり)
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況  
(総括研究報告書、分担研究報告書の中に、書式に従って記入すること)
7. 健康危険情報
  - ・研究の結果、得られた成果の中で健康危険情報(国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものがある場合や、研究過程において健康危険情報を把握した場合には、国民の生命、健康に重大な影響を及ぼすと考えられる内容と理由を簡潔に記入するとともに、その情報源(研究成果、研究者名、学会発表名、雑誌等の詳細)について記述すること。
  - ・既に厚生労働省に通報した健康危険情報であっても、本研究報告書の提出の時点において健康危険情報に該当すると判断されるものについては記述すること。
  - ・分担研究者、研究協力者の把握した情報・意見等についても主任研究者がとりまとめ、一括して総括研究報告書に記入すること。
  - ・なお、交付基準額等決定通知の添付文書において、健康危険情報を把握した際には、一定の書式で速やかに厚生労働省健康危機管理官まで通報していただくよう協力をお願いしているので、本件とともに留意すること。

---

別添 1

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

(作成上の留意事項)

研究報告書の表紙は、別紙 1「研究報告書表紙レイアウト」を参考に作成すること。

---

別添 2

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

(作成上の留意事項)

研究報告書の目次は、別紙 2「研究報告書目次レイアウト」を参考に作成すること。

---

別添 3

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

(作成上の留意事項)

総括研究報告書は、別紙 3「研究報告書レイアウト」を参考に作成すること。

---

別添 4

厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

(作成上の留意事項)

分担研究報告書は、別紙 3「研究報告書レイアウト」を参考に作成すること。

---

別添 5

研究成果の刊行に関する一覧表

(作成上の留意事項)

研究成果の刊行に関する一覧表は、別紙 4「研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト」を参考に作成すること。

# 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<br>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 | ----- | 4 |
|--------------------|-------|---|

|                  |       |   |
|------------------|-------|---|
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 6 |
|------------------|-------|---|

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)  
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** 個々の癌患者の再発予測が可能になれば、抗癌剤治療が必要な患者のみを選択できる可能性があり、不要な患者への投与を回避できることにより、医療費の軽減が実現する。われわれは再発予測の指標として、subclinical levelでの診断を目指し末梢血中および骨髄中の微量癌の存在に注目し、平成18年度までに厚生労働省科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）により、最終目標である2000例を超え合計2478例（乳癌1214例 食道癌17例、胃癌1035例 大腸癌167例、その他16例 健常コントロール29例）の乳癌・消化器癌における末梢血・骨髄の微量癌検出および解析を終えた。平成17年度には、乳癌855例と胃癌910例について末梢血中および骨髄中の遊離がん細胞を検索した。その結果乳癌では、末梢血液に存在する遊離癌細胞自体が予後・転移・再発能を決定しうる、真の癌細胞であると考えられた。一方、胃癌症例では、臨床病期におけるCEAまたはCK7発現頻度は末梢血液、骨髄ともに差がなく、真の転移を規定する遊離癌細胞を解析する必要があると考えられた。

特に、乳癌転移陽性患者と陰性患者の末梢血液の有核細胞層の遺伝子発現プロファイルの比較をcDNAmicroarrayにて行った。転移陽性乳癌患者で有意に発現増加している遺伝子のうち、u-PAR、VEGFR-1およびMMP-14遺伝子は乳癌の再発予測因子となりうることを明らかにした。

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  
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

**【A】 研究目的**

手術後の癌再発予測を個々の患者で正しく行うことは、未だに容易ではない。本研究は、現在用いられている診断法で診断するより前のsubclinical levelで確実に再発を診断するために必要である。その成果により、転移・再発予測のみならず、抗癌剤の適切な投与判断と治療効果の早期判定が可能になるため、医療費節減や不要な抗癌剤投与による患者のQOL低下の防止につながる。したがって医療行政上からも国民の利益の観点からも必要性が高い研究である。

平成16年度および17年度の研究助成をいた

だき、最終目標である2000例を超え合計2478例（乳癌1214例 食道癌17例、胃癌1035例 大腸癌167例、その他16例 健常コントロール29例）の乳癌・消化器癌における末梢血・骨髄の微量癌検出および解析を終えた。胃癌については従来汎用してきた血中ITCの存在が転移・再発に直接関係しないことを明らかにした。また、乳癌・大腸癌ではCK7,CEAが転移・再発マーカーとして有用で臨床応用の可能性は十分にあるが、しかし、極めて満足できるレベルまでには至っていないことも明らかになった。そこで特に乳癌について今のマーカー以上に転移能力を反映するマーカーを新たに見いだす必要がある。

本研究では末梢血液・骨髄液中に含まれる癌細胞と非癌細胞（宿主の骨髄由来細胞や循環内皮細胞など）の両方に着目し、転移・再発に強く関与する遺伝子マーカーを同定することで、再発予測の精度を格段にあげることを目的とする。すなわち、主眼を癌細胞のみに着目する研究から宿主側細胞を包括する形での研究に替え、転移再発を規定する宿主側要因を解析する。

## 【B】研究方法

1) 宿主(host)を含めた転移マーカーの同定：乳癌非再発例に比し再発陽性症例の骨髓液中に過剰発現している遺伝子を明らかにする。

解析可能な質と量を備えたRNAを抽出しえた術前stage IIより3年以内に再発した乳癌患者3例と同病期無再発癌患者3例の術前骨髓液より、それぞれ単核細胞を採取しtotal RNAを抽出した。それぞれの検体につきsingle hybridization法でのmicroarrayを実施。転移陽性患者のみに普遍的に発現する遺伝子を同定する。

2) 候補遺伝子について本助成でこれまで集積した乳癌症例のうち臨床病理学的因子や再発・転移・予後が明らかになった約600症例について解析を行う。さらに胃癌約900例についても候補遺伝子の発現の臨床病理学的意義について解析を行う。

## 【C】研究結果

1) microarray解析の結果、S100A9, CA2, EEF1A1, FTH1, HA-1, HIF3A, HMOX1, LYZ, MMP1, MMP14, PRG1, QRSL1, TIMP-1, U-PAR, UQCRH, VEGFR等の遺伝子が転移陽性乳癌症例において過剰発現していた。これらの遺伝子についてpreliminaryにパイロット症例(乳癌転移陽性10例、非転移10例)の解析を実施し、有用性が期待できる3つの遺伝子をピックアップし全症例で詳細に解析した。

2) 上記遺伝子のうち、癌浸潤・転移との関係について重要であると思われる、以下の遺伝子について、解析をおこなった。(1)u-PAR：正常コントロールの上限値をcut-off値としたところ、骨髓液においてu-PAR(+)140例はu-PAR(-)512例に比べ、統計学的有意差をもちDFS、OSともに予後が悪かった。一方、末梢血液ではu-PAR陽性例が陰性例に比しDFSが有意に低値を示した。(2)VEGFR-1:末梢血液および骨髓液ともに、VEGFR-1陽性例は陰性例に比べて統計学的有意差をもちDFSが低値を示した。(3)MMP-14：骨髓については、高発現群で

有意にPgR陽性の症例が多かった( $p=0.04$ )が、術後再発について有意差は認めなかった。一方、末梢血液においては、術後再発が高発現群で有意に多かった( $P<0.001$ )が、他の因子についての有意差は認めなかった。また、末梢血液において、無再発生存曲線を2群間で比較しても、log-rank testにて有意差を確認した( $P<0.001$ )。

## 【D】考察

Heissらの免疫染色を用いた担癌患者の骨髓中におけるu-PARの発現に関する報告(J Clin Oncol 2002)では、u-PAR発現陽性症例は陰性症例に比して著しく予後が悪かった。われわれのRT-PCRを用いた報告でも同様の所見であるが、末梢血液からの検出も可能であったことは、今後、外来患者の再発予測など臨床への応用が期待される結果であった。u-PARの発現は癌細胞由来であると報告されているが、血管内皮細胞、骨髓前駆細胞あるいはサイトカインからの発現誘導等もあり宿主側の要因が極めて重要であると考えられる。

固形癌において転移・再発を規定する細胞・因子を同定し、特異的に検出するマーカーをみいだすために、われわれは、癌細胞因子の中で特に癌幹細胞に着目し研究している。自己複製能および分化能を有し抗癌剤耐性、放射線耐性を制御する同細胞が原発巣から転移巣へ生着することは転移成立を規定する上で重要な因子であると考えている。われわれが行った全骨髓液における転移陽性例と陰性例との比較のmicroarrayにおいては、既知の幹細胞マーカーは認められていないが、発現profileの中に存在する可能性があり、今後検証をしていきたい。

## 【E】結論

転移陽性乳癌症例の骨髓液中に過剰発現している遺伝子profileを確立した。そのうちu-PAR、VEGFR-1、MMP-14が末梢血液において過剰発現を示した症例は高い再発率を示したことから、これらの遺伝子が乳癌の再発を予測しうるマーカーとして有用となることが期待される。

【F】健康危険情報  
特になし

【G】研究発表

1. Mimori K, Kosaka Y, Hirasaki S, Kita Y, Inoue H, Mori M. Disseminated isolated tumor cells in bone marrow of esophageal cancer cases. *Esophagus* (in press)
2. Mimori K, Nishida K, Nakamura Y, et al. Loss of MAL Expression in Precancerous Lesions of the Esophagus. *Ann Surg Oncol* 2007.
3. Nakamura Y, Tanaka F, Nagahara H, et al. Opa Interacting Protein 5 (OIP5) Is a Novel Cancer-testis Specific Gene in Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* 2007;14(2):885-92.
4. Ieta K, Ojima E, Tanaka F, et al. Identification of overexpressed genes in hepatocellular carcinoma, with special reference to ubiquitin-conjugating enzyme E2C gene expression. *Int J Cancer* 2007.
5. Haraguchi N, Inoue H, Tanaka F, et al. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancers. *Hum Cell* 2006;19(1):24-9.
6. Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, et al. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006;24(3):506-13.
7. Iinuma H, Okinaga K, Egami H, et al. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol* 2006;28(2):297-306.
8. Ishii H, Mimori K, Inoue H, et al. Fhit modulates the DNA damage checkpoint response. *Cancer Res* 2006;66(23):11287-92.
9. Masuda T, Mimori K, Mori M. [Occult micrometastasis]. *Nippon Rinsho* 2006;64(3):442-9.
10. Mimori K, Ishii H, Nagahara H, et al. FHIT is up-regulated by inflammatory stimuli and inhibits prostaglandin E2-mediated cancer progression. *Cancer Res* 2006;66(5):2683-90.
11. Mimori K, Nagahara H, Sudo T, et al. The epidermal growth factor receptor gene sequence is highly conserved in primary gastric cancers. *J Surg Oncol* 2006;93(1):44-6.
12. Mimori K, Sadanaga N, Yoshikawa Y, et al. Reduced tau expression in gastric cancer can identify candidates for successful Paclitaxel treatment. *Br J Cancer* 2006;94(12):1894-7.
13. Ohmachi T, Inoue H, Mimori K, et al. Fatty acid binding protein 6 is overexpressed in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(17):5090-5.
14. Ohmachi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Yanaga K, Mori M. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(10):3057-63.
15. Uchikado Y, Inoue H, Haraguchi N, et al. Gene expression profiling of lymph node metastasis by oligomicroarray analysis using laser microdissection in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2006;29(6):1337-47.
16. Tanaka S, Pero SC, Taguchi K, Shimada M, Mori M, Krag DN, Arii S. Specific peptide ligand for Grb7 signal transduction protein and pancreatic cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:491-8
17. Yamashita K, Park HL, Kim MS, Osada M, Tokumaru Y, Inoue H, Mori M, Sidransky D. PGP9.5 methylation in diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res* 2006;66:3921-7

<学会発表>

1) 三森功士 食道癌 ITC の臨床的意義に関する研究について、胃癌・乳癌症例解析結果に基づく提言 第 60 回日本食道学会ワークショップ

2) 三森功士 乳癌患者における遊離癌細胞検出意義の解明と転移形成能予測マーカーの同定 第 106 回日本外科学会ワークショップ

研究成果の刊行に関する一覧表

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 |
|------|---------|-----------|-----|------|-----|-----|-----|
|------|---------|-----------|-----|------|-----|-----|-----|

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      |
|--|---|----------------------------|----|----------|----------|
| <u>Mimori K</u> , Kosaka Y, Hirasaki S, Kita Y, <u>Inoue H</u> , <u>Mori M</u>                           | Disseminated isolated tumor cells in bone marrow of esophageal cancer cases.  | Esophagus                  |    |          | In press |
| Haraguchi N, <u>Inoue H</u> , Tanaka F,  | Cancer stem cells in human gastrointestinal cancers.  | <i>Hum Cell</i>            | 19 | 24-9     | 2006     |
| Iinuma H, <u>Mimori K</u> , <u>Mori M</u> , Sasako M.  | Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. | <i>Int J Oncol</i>         | 28 | 297-306. | 2006     |
| Haraguchi N, Utsunomiya T, <u>Inoue H</u> , Tanaka F, <u>Mimori K</u> , Barnard GF, <u>Mori M</u>        | Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system.   | <i>Stem Cells</i>          | 24 | 506-13   | 2006     |
| Yamashita K, Park HL, Kim MS, Osada M, Tokumaru Y, <u>Inoue H</u> , <u>Mori M</u> , Sidransky D.         | PGP9.5 methylation in diffuse-type gastric cancer.  | <i>Cancer Res</i>          | 66 | 3921-7   | 2006     |
| <u>Mimori K</u> , Ishii H, Nagahara H, Sudo T, Yamashita K, <u>Inoue H</u> , Barnard GF, <u>Mori M</u> . | FHIT is up-regulated by inflammatory stimuli and inhibits prostaglandin E2-mediated cancer progression.   | <i>Cancer Res</i>          | 66 | 2683-90  | 2006     |
| Tanaka S, Pero SC, Taguchi K, Shimada M, <u>Mori M</u> , Krag DN, Arii S.                                | Specific peptide ligand for Grb7 signal transduction protein and pancreatic cancer metastasis.  | <i>J Natl Cancer Inst.</i> | 98 | 491-8.   | 2006     |