

膵・胆道癌に対する外科的治療の現状と問題点

中森 正二

国立病院機構大阪医療センター統括診療部長

はじめに

がんによる死亡が、わが国における死亡原因の第1位になって久しい。そのなかでも膵癌および胆道癌による死亡は、「がんの統計'09」¹⁾に基づくと、がんによる死亡数のそれぞれ第5位と第6位に位置する。また、最近1年間の膵・胆道癌の罹患患者数は4万人を超え、毎年ほぼ同数の患者を膵・胆道癌で失っており、難治がんの代表とされる。このような膵・胆道癌において、唯一根治的な治療を望めるのが外科的切除であることに現在のところ異論はなく、膵・胆道癌と診断されたすべての患者に対してまず外科的切除の可能性を検討することが重要となる。しかしながら、膵癌登録報告2007²⁾によると、1980年代に20%台であった切除率は最近では30%台後半と向上してきてはいるものの、代表的な消化器癌である胃癌や大腸癌に比べると非常に低い。しかも、膵癌登録は専門的な施設に偏った集計であり、実際の切除率はさらに低いものと考えられる。胆道癌登録に関する最近の公表はないが、胆道癌でも同様の切除率と推測される。また、切除された場合でも、膵癌登録における5年生存率は十数%²⁾であり、膵癌を専門とした大規模施設であっても20~30%程度と考えられる。

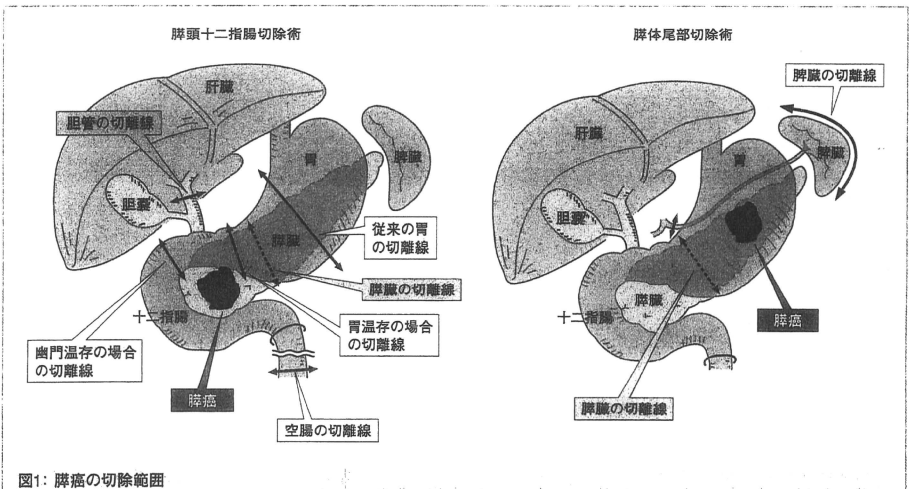
外科的切除のみでは太刀打ちできない癌であることをしっかり認識して対応していくことが望まれる。

本稿では、誌面の都合上、外科術式の紹介は専門書に譲り、膵・胆道癌の外科的治療の現状と問題点について、最近公表された診療ガイドライン^{3,4)}を中心に紹介する。

膵癌に対する外科的治療

1) 外科的切除の適応と血管合併切除

膵癌に対する外科的切除の術式は癌の局在により異なり、膵頭部癌に対しては膵頭十二指腸切除術(pancreaticoduodenectomy; PD)が、膵体尾部癌に対しては膵体尾部切除術が基本術式となる(図1)。腫瘍が膵頭部から体部・尾部に進展した場合には、膵全摘術が適応となる場合もある。一般的に、固形癌の外科的治療上最も重要なことはR0(癌遺残を認めない)手術を行うことであり、外科的切除対象となる膵癌においても癌遺残の有無は重要な予後因子の一つである。膵癌診療ガイドライン³⁾における膵癌治療のアルゴリズム(図2)に基づくと、膵癌取扱い規約第6版(日本膵臓学会編)のstage分類でI~IVaの症例が外科的切除の対象となる。しかしながら、



脾切除のような侵襲を伴う手術では、手術リスクとこれに見合うアウトカムとのバランスが適応を決定する重要条件となっている。遠隔転移がなく、肝動脈、上腸間膜動脈、大動脈などの合併切除によりR0手術を行うことができる場合でも、術後合併症リスク、再発率の高さ、予後改善への効果が認められないといった点から、こうした大血管に浸潤を認めるようなstage IVaの症例は「局所進行切除不能癌腫」とされ、現時点では外科手術の対象となっていない。なお、癌が門脈や上腸間膜静脈へ浸潤したstage IVa症例の場合には、門脈などの再建が可能な場合は外科的切除の適応とされている。しかしながら、根治を目指して行われる予防的な門脈合併切除の意義は明らかになっていない。

2) 拡大リンパ節郭清・神経叢郭清

これまでわが国では、局所制御率の向上を目的として、大動脈周囲リンパ節を含む拡大リンパ節郭清や、腹腔動脈、上腸間膜動脈全周囲の神経叢郭清などの拡大手術が盛んに行われてきたが、欧米やわが国で行われた標準手術と拡大手術の無作為化比較試験の結果、拡大手術では合併症発生率のみ高くなり、生存期間は標準手術と同等であることが示されたことから、現時点ではR0手術を目指した切除を行えばよいという考え方に変わりつつある。

3) PDにおける胃温存

膵頭部癌に対しては、当初は胃の3分の2切除を伴うPDが一般的であったが、臓器機能温存の考えから、近年では幽門輪と胃を温存する幽門輪温存PD (pylorus-preserving PD; PPPD) が広く行われるようになってきている。多数の無作為化比較試験の結果、両者の長期生存率に差はない。早期の合併症や術後の栄養状態の評価から違いが論じられることが多いが、その評価はまだ定まっていない。最近では、両者を折衷した亜全胃温存PD (subtotal stomach-preserving PD; SSPPD) も行われている (図1)。少なくとも、残胃の大きさが

長期予後に影響を与えないことは確かなようである。

4) 術中放射線療法の意味

局所制御率の向上を目指して、切除範囲に放射線照射を行う術中放射線療法も盛んに行われてきたが、局所再発率の改善はみられるものの生存期間には寄与しないという報告も多く、評価は定まっていない。最近、国内で行われた多施設無作為化試験の結果からも有用性は認められなかったことから、切除例に対する術中放射線療法は今後行われなくなっていくものと思われる。

胆管癌に対する外科的治療

1) 外科的切除の適応と術式

胆道癌は取扱い規約によると、その発生部位に応じて、肝内胆管癌、肝外胆管癌、(十二指腸) 乳頭部癌、胆嚢癌に区分されており、進展様式もそれに基づいた術式も様々である。切除の適応、術式の選択に関する大前提は、他の癌と同様にR0手術を目指した手術であるが、科学的な前向き解析などの研究はほとんど行われておらず、個々の施設の経験に基づいて術式が決められることが多い。また、早期胆嚢癌の場合を除けば、胆道癌の術式として、侵襲性の高い大量の肝切除やPD、またはその両方を選択される場合もあるが、R0手術の可能性だけでなく、全身状態が外科手術に耐え得るか否かの判断が手術適応の決定に占める割合も大きい。当然ながら、肝臓、肺などの遠隔臓器転移、腹膜播種、大動脈周囲などの遠隔リンパ節転移が認められる場合は手術適応としないが、胆嚢癌では肝浸潤だけでなく肝転移を認めた場合でも、系統的な肝切除を加えることによってR0手術が可能であれば切除手術が行われることもある。また、R0手術を目指した切除を予定しながらも、術中の診断で追加切除が必要となつたにもかかわらず耐術性などから切除範囲が制約され、追加切除ができず断端陽性となって終了することも少なくない。

2) 血管合併切除およびリンパ節郭清

腫瘍部位により、肝臓、胆管、膵頭十二指腸などが合併切除の対象となる。さらに、肝門部胆管癌や中下部胆管癌、胆嚢癌に関しては門脈や肝動脈の合併切除の報告もなされている。これらの血管への進展は切除不能因子とはなっていないが、血管合併切除の適応範囲についてのコンセンサスは得られていない。リンパ節や神経叢の郭清に関しては、膵癌の場合と同様に拡大郭清よりもR0を目指した過不足ない郭清が基本となりつつある。なお、胆嚢癌などの場合、肝十二指腸間膜や膵頭部のリンパ節郭清を行うために、胆管合併切除やPDが行われることもあるが、リンパ節転移を

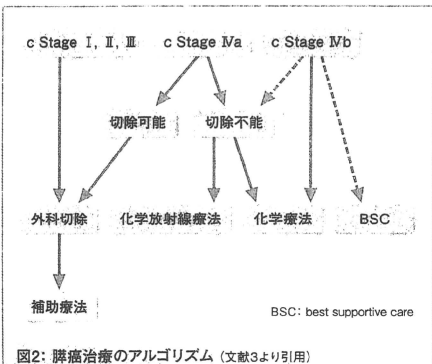


図2: 膵癌治療のアルゴリズム (文献3より引用)

これらの部位に認めた場合の予後は不良であり、リンパ節郭清だけのために予防的にこうした合併切除を行うことの意義についてはまだ明らかでない。

3) 術前黄疸に対する減黄ドレナージ

膵頭部癌も含め、胆道癌では閉塞性黄疸を合併する場合は多い。欧米で行われた無作為化試験では、術後の合併症発生率や死亡率に対して術前減黄の有無が影響を及ぼさないことを示した報告が多いが、これらの試験では対象に姑息的手術症例が多く含まれており、切除術症例を対象とした無作為化試験による成績は得られていない。ガイドラインでは、後ろ向き研究の結果から、胆管炎や肝機能不良を併発する閉塞性黄疸症例に対しては術前減黄のためのドレナージが現在のところ推奨されている⁴⁾。

遠隔転移巣切除

大腸癌の肝転移や肺転移の場合では、症例の選別後、積極的に外科的切除が行われ、比較的良好な成績が得られている。膵・胆道癌においては、肝転移や肺転移再発巣の切除の報告も散見されるが、まとまった成績の報告はなく、現状では肝転移や肺転移は外科的切除の対象となっていない。

その理由として、大腸癌と比べて原発巣の制御が容易でないことや、単独臓器にのみ転移し、その転移巣を遺残なく切除できるような転移形式でないことがあげられる。したがって、本領域においては、大腸癌のように積極的な転移巣の手術は行われていないのが現状であるが、症例の選別を慎重に行うことによって、転移巣切除の適応となるケースも出てくるかもしれない。

おわりに

膵・胆道癌において、唯一根治的な治療を望めるのは外科的切除であることは誰もが認めるところである。しかしながら、ガイドラインはあるものの、すべての外科的切除が科学的根拠に基づいたコンセンサスが得られたものではないのが現状である。また、早期癌の診断が困難であることから、外科的切除のみの遠隔成績も満足できるものではない。最近になって、膵・胆道癌に対する化学療法においてエビデンスレベルの高い臨床試験の成績が報告されている^{5, 6)}。膵・胆道癌の治療成績向上のためには、外科的切除と、早期癌診断技術や術前術後の補助化学療法などを組み合わせた集学的治療の開発が急がれる。

参考文献

- 1) 国立がん研究センターがん対策情報センター. がんの統計 '09. (http://www.ganjocho.jp/public/statistics/backnumber/2009_jp.html)
- 2) 日本膵臓学会. 膵癌登録報告2007. 膵臓2007, 22: e1-e427. (日本膵臓学会ホームページ: <http://www.suizou.org/>)
- 3) 日本膵臓学会膵癌診療ガイドライン改訂委員会編. 科学的根拠に基づく膵癌診療ガイドライン2009年版. 金原出版, 2009.
- 4) 胆道癌診療ガイドライン作成出版委員会編. エビデンスに基づいた胆道癌診療ガイドライン第1版. 医学図書出版, 2007.
- 5) Oettle H, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007, 297: 267-277.
- 6) Valle J, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 2010, 362: 1273-1281.

Yakult

大腸癌外科手術との対比からみた 化学療法の問題点

Economic analysis of chemotherapy and surgery of colorectal cancer

国立病院機構大阪医療センター外科

三嶋秀行 池永雅一 安井昌義 辻江正徳 宮本敦史
平尾素宏 藤谷和正 中森正三 辻仲利政

【ポイント】

- ◆ 大腸癌手術の費用は安価であり、化学療法と比較して患者1人を治すのにかかる費用が低く、費用対効果が高い。
- ◆ 補助化学療法の費用対効果はほかの医療と遜色ない。進行再発の化学療法における分子標的薬の費用対効果は高くない。
- ◆ 費用対効果を考えながら、化学療法に限らず日本は何をどのくらいまで保険で許容するのかを検討すべきである。

臨外 66(1) : 60-65, 2011

はじめに

「人の命は平等であり、命に値段はつけられない」は理想であるが、損害賠償や補償額は数千万～1億円以上が命の値段の目安となる。若くて収入が高ければ逸失利益は大きく、定年後で無職であれば逸失利益は少ない。理想とは異なり「使える医療費には限りがある」のが現実なので、保険で医療行為をどこまで許容するかは経済状態に応じて検討しなければならない。費用対効果 (cost effectiveness) は費用 (cost)/生存年 (life year)、費用対効用 (cost utility) は費用/質調整生存年 (cost/QALY (quality-adjusted life year)) で表される。総医療費には手術費だけでなく麻酔費や入院費などが含まれ、化学療法は薬剤費だけでなく診察費、検査費、交通費などが含まれる。

本稿では主に大腸癌の手術費と抗癌剤の薬剤費を対象として、大腸癌患者1人を治すのにかかる費用、または1年延命するのにかかる費用について検討する。

大腸癌の初回治療は手術が基本であり、Ⅲ期は術後6か月間の補助化学療法が、再発すると化学療法が基本となる¹⁾

大腸癌は0期からⅣ期まであり、遠隔転移しているのがⅣ期である。Ⅰ期からⅢb期までの治療方針は手術である。0期でも内視鏡切除が困難であれば手術となり、Ⅳ期でも狭窄を避けるため切除もしくはストーマ造設手術を行うので、初発大腸癌の約90%は何らかの手術を受ける。手術の根治度別割合を根治A 85%、根治B 5%、根治C 10%とする²⁾。根治AのなかでⅢ期は約30%であり、Ⅲ期30%と根治B 5%を合わせた35%には補助化学療法が必要である。根治Cの10%と根治A、B後の再発15%を合わせた25%には進行再発の化学療法が必要となり、補助化学療法と進行再発を合わせると、全体の半数以上が化学療法の適応となる。

大腸癌の罹患数と死亡数

年度別大腸癌の罹患数と死亡数を図1に示す。大腸癌は高齢者で増えるので、年齢調整死亡率は低下しているが、高齢化に伴って死亡者数は増えている。1年

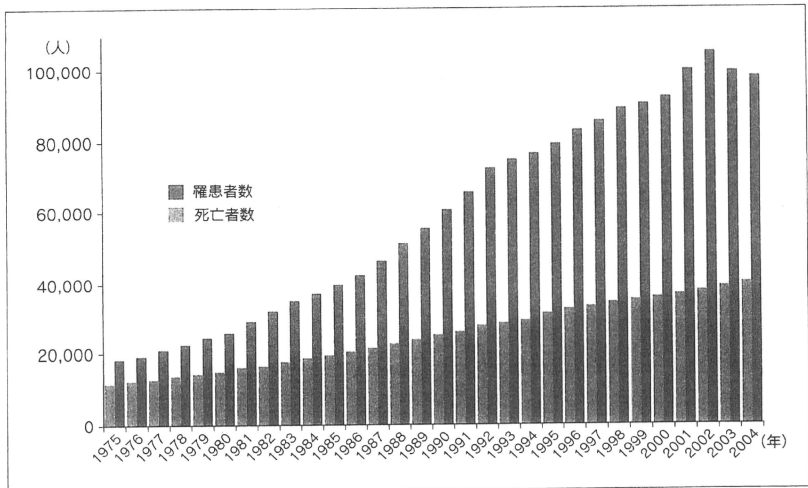


図1 大腸癌の死亡者数/罹患者数の年次推移 (1975年～2004年)

間に約10万人が大腸癌に罹患し、約4万人が死亡している。1975年頃は罹患数と死亡数の差は小さかったが、最近、大腸癌は罹患数と死亡数の差が比較的大きくなり、約60%は完全に治癒する。大腸癌は助かる患者が多いので1人を助ける医療費(手術費や薬剤費)を検討できるが、進行再発は治癒しないので1年延命するのに必要な医療費(薬剤費)を検討する。生存率が低い肺癌や膵臓癌などでは1人を助ける、もしくは1年延命する費用は高額になる。

大腸癌手術の費用

大腸癌の手術には通常の開腹手術と腹腔鏡下手術があり、結腸癌と直腸癌、開腹手術と腹腔鏡下手術で手術費用は少し異なる。大腸癌手術の費用は保険で決められていて全国一定であり、腹腔鏡下手術は通常の開腹手術に比べて約10万円高い(結腸癌32.7万円、腹腔鏡手術41.7万円、直腸癌66.3万円、腹腔鏡手術77.7万円)³⁾。1回の腹腔鏡下手術でトロッカーやクリップ、自動縫合器などの消耗品を約20～25万円分使用するので、約10万円高い手術費と約13万円の材料費加算でおおむね収支が一致するようになっている。手術費とは別に麻酔費と麻酔管理加算が加わる。手術費は時間や難易度にかかわらず一定であるが、麻酔は2時間までが基本料金で、以後30分ごとに加算される

料金システムである。

大腸癌の手術をして入院期間が10日間の場合、医療費は約95万円、内訳は手術費が約50万円、麻酔費が約10万円である。3割負担では28.5万円だが、自己負担限度額は通常8万円+少し(所得により異なる)である。入院が長くなると総費用は増える。

虫垂炎手術費は国ごとに異なり、手術総費用はニューヨーク200万円、ロンドン100万円と高く、パリ47万円、フランクフルト42万円はさほど高くなく、シドニーは21万円と安い。日本では虫垂炎手術費は虫垂周囲膿瘍を伴わないものが62,100円、虫垂周囲膿瘍を伴うものが88,800円である。麻酔費は脊椎麻酔8,500円、全身麻酔が83,000円なので、虫垂周囲膿瘍を伴わない虫垂炎手術を全身麻酔で行うと麻酔費のほうが高額となる。日本では手術費が比較的安く設定されている。

手術で大腸癌患者1人を助ける医療費は55～89万円
Ⅳ期では肝切除と併せて682万円(表1)

手術費用は開腹手術と腹腔鏡下手術を平均し、結腸癌は32.7万円+41.7万円÷2=37.2万円、直腸癌は66.3万円+77.7万円÷2=72万円、結腸癌と直腸癌の比は約2:1なので(37.2×2+72×1)÷3=48.8万円と

表1 手術で大腸癌患者を1人を助ける費用(病期別)

Stage	症例数	5年生存率	生存数	手術で1人を助ける費用
0期	1,960	94.3%	1,848	53万円
I期	3,673	90.6%	3,328	55.1万円
II期	4,839	81.2%	3,929	61.5万円
IIIa期	3,534	71.4%	2,523	70万円
IIIb期	1,846	56.0%	1,033	89.3万円
IV期	2,820	13.2%	372	682万円(+肝切除)

表2 結腸癌の手術費用と総費用

結腸悪性腫瘍手術	32.7万円
腹腔鏡下結腸悪性腫瘍手術	41.7万円
IIIa期結腸癌 100人手術して70人が治癒(S状結腸以外)	
$37.2万円 \times 100人 \div 70人$	53万円
入院費用を含めると	
$95万円 \times 100人 \div 70人$	135万円
IIIb期結腸癌 100人手術して62人が治癒	
$37.2万円 \times 100人 \div 62人$	60万円
入院費用を含めると	
$95万円 \times 100人 \div 62人$	153万円

し、大腸癌手術1例の費用は麻酔費を含めずに50万円として計算した。

I期は5年生存率が90%なので、手術で1人を助ける費用は50万円 \times 100人 \div 90人=55万円、IIIb期では5年生存率が56%なので、手術で1人を助ける費用は50万円 \times 100人 \div 56人=89万円と考えられる。IV期では5年生存率が13.2%であるが、転移巣も手術するので肝区域切除の40万円(394,500円)を加えて1人を助けるのは(50万円+40万円) \times 100人 \div 13.2人=682万円と相対的に高くなる。病期が進むほど助かる人数は少ないので1人を助ける医療費は高額になる。

各病期別の5年生存率を参考に大腸癌患者を手術で1人を助ける費用を計算した¹⁾。補助化学療法が追加されるのはIII期なので、IIIa期とIIIb期に分けて手術と補助化学療法の費用対効果を検討した。

結腸癌III期 手術で1人を助ける医療費は 135~153万円(表2)

III期では補助化学療法を行うので、手術と化学療法を比較するために結腸癌III期の手術による費用対効果を

を考える。結腸癌の手術費は、開腹手術と腹腔鏡下手術を1:1と仮定して32.7万円+41.7万円 \div 2=37.2万円とする。S状結腸癌を除く結腸癌IIIa期の5年生存率は約70%なので、100人手術して70人治ると考えると、1人を治す費用は37.2万円 \times 100人 \div 70人=53万円/人となる。実際には手術だけでなく入院費用もかかる。入院期間10日間の総医療費は約95万円なので、1人治す費用は95万円 \times 100人 \div 70人=135万円/人となる。結腸癌IIIb期の5年生存率は62.1%なので、100人手術して62人治ると考えると、1人を治す費用は37.2万円 \times 100人 \div 62人=60万円/人となる。入院期間10日間の総医療費は約95万円なので、1人を治す費用は95万円 \times 100人 \div 62人=153万円/人となる。

このように、III期の結腸癌を手術で1人を助ける医療費は200万円未満である。大腸癌では手術の費用対効果がきわめて高いことと、また病期が進行していないと費用対効果が高いことがわかる。

結腸癌IIIb期 補助化学療法で1人を助ける医療費は 1,500万円以上

III期以上では再発率を下げ、生存率を上げる目的で術後6か月間の補助化学療法が推奨されている。ここでは補助化学療法の費用対効果を検討する。

結腸癌に補助化学療法としてUFT/LVを6か月間投与すると、6か月間の薬剤費は約113万円である(患者の体の大きさで異なる)。補助化学療法で生存率5%の上乗せがあると仮定すると、1人を治す費用は113万円 \times 100人 \div 5人=2,260万円/人となる。カベシタピンの6か月間の薬剤費は約60万円なので、1人を治す費用は60万円 \times 100人 \div 5人=1,200万円/人となる。最近価格も効果も高いFOLFOXが補助化学療法に使えるようになったが、FOLFOXの6か月間の薬

表3 部位別の累積5年生存率

	I	II	IIIa	IIIb	IV
盲腸	86.7	81.4	69.3	59.5	9.8
上行結腸	90.9	83.7	73.9	57.3	14.2
横行結腸	89.1	82.6	70.1	60.1	9.6
下行結腸	90.3	81.4	70.9	57.8	18.5
S状結腸	91.4	84.5	81.4	67.4	16.6
直腸S状部	94.6	79.2	71.2	58.1	11.6
上部直腸	93.1	77.7	69.5	53.7	9.8
下部直腸	87.3	75.2	60.6	43.7	12.3
肛門管	92.2	78.9	43.7	47.0	10.2
結腸(C-S)	90.6	83.6	76.1	62.1	14.3
直腸(Ra-Rb)	89.3	76.4	64.7	47.1	11.1
全部位(C~P)	90.6	81.2	71.4	56.0	13.2

(文献1より引用)

剤費用は約177万円である。海外で行われた補助化学療法MOSAIC試験では、LV5-FU2の5年生存率72%に対してFOLFOXの5年生存率は76%とオキサリプラチンによって5年生存率に4%の上乗せ効果が認められた。また、NSABPC-07試験のサブ解析では、5-FU/LVの5年生存率55%に対してFLOXの5年生存率は68%と、オキサリプラチンによって5年生存率13%の上乗せ効果があることが示された。これらの結果から、5年生存率62.1%である国内の結腸癌Ⅲb期では、5-FUで約5%の上乗せ効果が、FOLFOXでさらに5%の上乗せ効果があると推測される(表3)。FOLFOXで1人治す費用は、177万円×100人÷10人=1,770万円/人となる。

このようにⅢb期ではオキサリプラチンの費用増加に見合う効果があるので良好な費用対効果が生まれるのである。

結腸癌Ⅲa期 補助化学療法で1人を助ける医療費は 2,500万円以上

結腸癌Ⅲa期の5年生存率はS状結腸癌のみが81.4%と高いが、S状結腸以外は70%程度である。5-FUで約4%の上乗せ効果が、FOLFOXでさらに3%の上乗せ効果があると仮定すると、UFT/LVで1人治す費用は、113万円×100人÷4人=2,825万円/人、カベシタピンで1人治す費用は60万円×100人÷4人=1,500万円/人となる。FOLFOXで1人治す費用は

表4 大腸癌手術費用と各抗癌剤の1か月の薬剤費用

術式	手術費用
結腸癌切除	32.7万円
結腸癌切除(腹腔鏡)	41.7万円
直腸癌切除	66.3万円
直腸癌切除(腹腔鏡)	77.7万円
レジメン	1か月の薬剤費用
FL	14万円
FOLFIRI	20万円
FOLFOX	40万円
ペバシズマブ	30万円
セツキシマブ・パニツムマブ	60万円

177万円×100人÷7人=2,528万円/人となる。再発が多いⅢb期と異なりⅢa期では再発率が少し低くなるので、1人助けるのにかかる費用は高くなる。また、使用する薬剤によって費用が異なる。

このようにⅢa期ではオキサリプラチンの費用増加に見合う効果はあるが、Ⅲbほどではない。1,000万円を追加してもう1人助ける方法を許容するかどうかを判断しなければならない。通常、1年延命するのに700万円程度は許容されるので、延命ではなく1,000万円ですべて1人助かるのなら許容されると考える。

進行再発にかかる抗癌剤費用(表4)

大腸癌ではオキサリプラチンに加えてペバシズマブ、

セツキシマブ、パニツムマブなどの高価な分子標的薬が登場した。1か月の薬剤費は、FOLFIRI 20万円、FOLFOX 40万円、ペバシズマブ 30万円、セツキシマブ/パニツムマブ 60万円である。切除不能進行再発に対する化学療法は目的は治癒ではなく延命である。Median survival time (MST)はBSCで8か月、FU/LVで13(12~14)か月、FOLFOX、FOLFIRIで20か月、分子標的薬をすべて使うと24か月とされているので、5-FU/LVによる延命効果は5か月、FOLFOX、FOLFIRIによる延命は12か月、分子標的薬を含めたすべての薬剤による延命は16か月ということになる。5-FU/LVの薬剤費は1か月約14万円なので、14万円×13か月=182万円かけて5か月の延命、言いかえると36万円で1か月延命していることになる。

FOLFOXを10か月、FOLFIRIを10か月使用すると、薬剤費用は40万円×10か月+20万円×10か月=600万円である。600万円で12か月延命するので、50万円で1か月延命していることになり、5-FU/LVとの差は1か月14万円である。FOLFOX+ペバシズマブを12か月、FOLFIRI+セツキシマブ/パニツムマブを12か月使用すると、薬剤費用は80万円×12か月+80万円×12=1,920万円である。1,920万円で16か月延命するので、120万円で1か月延命することになる。5-FU/LVとの差は1か月84万円、FOLFOX、FOLFIRIとの差は1か月70万円である。分子標的薬による生存期間の上乗せは4か月得られるのに、1,920万円-600万円=1,320万がかかっている。この増分に対する負担を許容するかどうかを判断しなければならない。

進行・再発癌の化学療法であるFOLFOX、FOLFIRIは600万円で1年延命する。1年延命する費用の基準を1,000万円以下とすると、大腸癌の分子標的薬の延命に対する費用対効果は高くないと考えられる⁴⁾。もっとも分子標的薬すべての費用対効果が低いのではない。

「使える医療費には限りがある」現実において、どこまで保険で許容できるかに関して検討を始めなければならない。英国では1年延命するのに700万円以下であるFOLFOX、FOLFIRIは保険で許容し、1年延命するのに700万円以上であるペバシズマブやセツキシマブは許容していない。皆保険制度があり混合診療が禁止されているわが国が今後、抗癌剤に限らずどの医療をどのぐらいの費用まで保険で許容するのか、冷静に考えていかなければならないだろう。

外科手術との比較

Ⅲ期の結腸癌を手術で患者1人を治す費用が100万円台であるのに対して、補助化学療法で1人を治す費用は1,500~3,000万円である。費用対効果を考えれば、手術が10倍以上有効な治療方法である。日本では手術の費用が低くて質は高いので、手術は費用対効果に優れた治療方法である。

それでは、1人を治す費用が1,500~3,000万円かかる補助化学療法は費用対効果が低いのだろうか。補助化学療法は手術では治らないところの一部を治すので、手術と同じ尺度では比較できない。また、現時点では大腸癌の分子標的薬は補助化学療法では効果がないので使用しない。いくらまでなら許容して、いくら以上なら許容しないというコンセンサスはあるのだろうか。つぎの項ではかの医療費を参考にしてみる。

そのほかの医療費

大腸癌手術に限らず、日本では欧米と比較して手術費が低く、材料費や薬剤費は同等か少し高い。

透析は医療費30兆円のうちの1兆円を占めている。各種の医療援助制度や身体障害者(1級)などがあるので本人の負担は大きくないが、透析にかかる費用は1人あたり年間約500万円程度、1人1か月約42万円である。透析患者の1年生存率は約87%、5年生存率は約60%、10年生存率は約35%である。5年生存率約60%は結腸癌Ⅲb期と類似している。5年生存の60人に必要な医療費は1人あたり500万円×5年=2,500万円、10年生存の35人に必要な医療費は5,000万円である。

補助化学療法と透析で1人助ける費用は大きく異なるが、補助化学療法は高価と考えがちなのはなぜだろうか。理由は2つ考えられる。1つは手術費が低いこと、もう1つは、補助化学療法で効果が得られるのは10人に1人程度で、かつどの人に効果があるかわからないことなどが原因と考えられる。

心臓移植は手術費そのほかで約250万円、免疫抑制剤などの薬剤費が5年間で700万円、合計1,000万円程度である。心臓移植の手術費は143万円、心臓採取術費61万円、心臓チームの交通費ならびに臓器搬送費(チャーター機の場合には100~400万円)がかかる。ここでも搬送費や薬剤費と比較して、手術費は高くない。

腎臓移植は1年間の総医療費(手術,入院,退院後の投薬・検査など)は約600万円程度である。そのうち生体腎採取料は34.2万円,生体腎移植術は60万円である。ここでも手術費は高くない。医療費の点からは透析よりも腎移植が費用対効果に優れている。

白内障の手術費は眼内レンズを入れる場合121,000円である。眼内レンズの費用はこのなかに含まれており別に算定できない。眼科手術は点数が高いとみられているが,ほかの手術と同様に眼科の手術費も高くない。

救急医療や重症患者では,10人中1人しか助からない状況でも患者を救うのに人工呼吸器を装着しながら救命を目指して高価な薬剤を使用した治療をすることがある。1人に1か月1,000万円以上かかることもある。1,000万円の治療を10人に行い1人が助かれば,1人助ける費用は1億円である。

国民医療費の推移⁵⁾

国民医療費の推移は1975年頃から急上昇し,1995年頃から抑制され頭打ちになっている。わが国は米国のチーム医療を取り入れようとしているが,米国では医師,看護師,薬剤師,そのほかのスタッフなど多くの人員が診療に携わるので,医療費も高額である。医師だけでなく医療従事者の数が少なく,医療費も高くない日本が米国のシステムをそのまま取り入れるのは

不可能である。最近では高価な薬剤が出ているが,医療費を抑制する方針の現状では,今より手術費や医療者の報酬を上げ,かつ医療従事者を増やして医療の質を上げるという理想と現実のギャップは大きい。

おわりに

大腸癌における手術と化学療法の費用対効果について述べた。それぞれの医療に対して費用対効果や費用対効用を考えながら,化学療法に限らず,わが国は何をどのぐらいまで保険で許容するかを検討すべきである。

文献

- 1) 大腸癌研究会(編):大腸癌治療ガイドライン。医師用2010年版。金原出版,2010
- 2) 大腸癌研究会(編):大腸癌取扱い規約。第7版補訂版。金原出版,2009
- 3) 医科診療報酬点数表。平成22年4月版。社会保険研究所,2010
- 4) Shiroiwa T, Fukuda T, Tsutani K: Cost-effectiveness analysis of bevacizumab combined with chemotherapy for the treatment of metastatic colorectal cancer in Japan. Clin Ther 29: 2256-2267, 2007
- 5) 国立がん研究センターがん対策情報センターがん情報サービス:がんの統計⁰⁸。(http://ganjoho.ncc.go.jp/public/statistics/backnumber/2008_jp.html)

MISHIMA Hideyuki, et al
国立病院機構大阪医療センター外科
〒540-0006 大阪府大阪市中央区法円坂2-1-14

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

トワイクロス先生のがん患者の症状マネジメント 第2版

Symptom Management in Advanced Cancer, 4/e

著 Robert Twycross, Andrew Wilcock,
Claire Stark Toller
監訳 武田文和

●A5 頁520 2010年
定価3,990円(本体3,800円+税5%)
[ISBN978-4-260-01073-3]

初版刊行後、トワイクロス先生はその原著をWEBで公開。全世界の専門家からコメントが寄せられ、その截留は、本書の刷新と充実に注ぎ込まれた。末期がんや進行がんに限らず、がんによる痛みや諸症状、さらには心の苦しみにまで手をさしのべた本書は、すべてのがん患者にとっての「福音の書」として、さらなる発展を遂げた。新設章「最期の日々」が加わった。

2. 体細胞リプログラミングにおける エピジェネティック制御

渡辺 亮, 山田泰広

iPS細胞 (induced pluripotent stem cell: 人工多能性幹細胞) は, ES細胞と同様にほぼすべての体細胞へ分化が可能な多能性幹細胞であり, 再生医療への応用が期待されている。幹細胞はエピジェネティック修飾状態を大きく変化させることで機能性体細胞へ分化するが, その逆である体細胞から未分化細胞に戻すリプログラミングの過程では, 分化によって獲得したエピジェネティック修飾を初期化することが重要である。iPS細胞樹立の成功からまもなく5年を迎えようとしているが, 臨床応用に向けてiPS細胞の品質管理が最重要視されており, 体細胞のリプログラミング過程におけるエピジェネティック修飾の初期化を正確に行うことが課題となっている¹⁾。

はじめに

高橋と山中によって樹立されたiPS細胞は, 診断や治療, 薬剤のスクリーニングなどの臨床への応用が期待されており, 高い効率で体細胞のリプログラミングを誘導する因子の探索や安全性の高いiPS細胞の作製の試みがなされている。一方で, ヒトES/iPS細胞とマウスES細胞でエピジェネティックな状態を含む性質に違いがあることが示され, 体細胞リプログラミングに

[キーワード&略語]

疾患特異的iPS細胞, 体細胞リプログラミング

ALS: amyotrophic lateral sclerosis
(筋萎縮性側索硬化症)

EpiSC: Epiblast stem cell
(胚盤葉上層由来幹細胞)

ES細胞: embryonic stem cell (胚性幹細胞)

iN細胞: induced neural cells

SMA: spinal muscular atrophy
(脊髄性筋萎縮症)

関与するエピジェネティックな変化のメカニズムの理解が求められている。本稿では, 臨床応用に向けたiPS細胞の現状を紹介し, エピジェネティクスの制御を基盤にしたiPS細胞の品質管理について概説する。

■ 体細胞のリプログラミングとiPS細胞

胚盤胞期の内部細胞塊から得られる幹細胞株であるES細胞 (embryonic stem cell: 胚性幹細胞) は, ほぼすべての組織細胞へ分化する分化多能性を保ち, 無限な増殖が可能であるために再生医療への応用が期待されている。例えば, マウスのES細胞は, 体外で培養した後胚に戻すことで個体が発生し, 生殖細胞を含む個体中のさまざまな組織に分化することができる。このような有用性が示されている一方で, ヒトES細胞は受精卵, あるいは受精卵より発生の進んだ初期胚を破壊するために生命倫理的な問題を抱えており, 生命の萌芽である受精卵を破壊しない技術がより望まれてきた。

Regulation of epigenetics during reprogramming of somatic cells

Akira Watanabe¹⁾/Yasuhiro Yamada¹⁾²⁾: Center for iPS Research & Application, Kyoto University¹⁾/PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST)²⁾ (京都大学iPS細胞研究所初期化機構研究部門¹⁾/科学技術振興機構さきがけ²⁾)

体細胞のリプログラミング(初期化)^{※1}とは、分化した細胞を再び卵細胞のように初期発生可能な状態に初期化することである。未受受精卵の核を体細胞の核に置き換える核移植実験によって、体細胞の核が未受受精卵の細胞質の因子によってリプログラミングを受けることが示されている。iPS細胞は、体細胞へ数種類の遺伝子を導入し、分化した体細胞を未分化な多能性幹細胞へと戻すリプログラミングを行うことで得られる細胞株である。ES細胞とほぼ同様な分化多能性や自己複製能を示し^{2)~4)}、現在までに神経細胞、心筋細胞、膵島細胞、肝細胞、各種血液細胞をはじめとするさまざまな細胞への分化誘導が可能となっている⁵⁾。

2 疾患特異的iPS細胞の医療応用

1) 疾患特異的iPS細胞の特性

iPS細胞は、疾患患者の皮膚などの細胞からも樹立が可能(疾患特異的iPS細胞^{※2})であり、ヒトES細胞で問題となる免疫拒絶反応を回避することができるため、細胞の異常遺伝子を修復する遺伝子治療への応用が可能である。遺伝子の異常やSNPの違いが発症に影響を与える疾患であれば、遺伝的背景の異なるiPS細胞から機能性体細胞を分化誘導し、疾患モデル細胞として用いることができる。この他に、新規治療方法の開発、新規薬剤の有用性や毒性の評価への応用も考えられる。このように、iPS細胞は(1)患者自身の体細胞から樹立できる、(2)ほぼ無限な供給が可能、(3)再分化過程における異常の再現が可能であることより、さまざまな疾患研究への応用が期待されている(図)。

Hochedlingerらはがん細胞株の核を移植したマウスの未受受精卵の一部から個体が発生することを示した⁶⁾。さらに、この個体からメラノーマが発生することを示

し、変異やゲノムDNAの異常な増幅や欠失をもつがん細胞の核でもリプログラミングが可能であり、遺伝子変異に起因する疾病を再現できることを明らかにした。このように、疾患に由来する細胞のリプログラミングによって得られた細胞は、疾患モデリング研究への応用が可能となっている。

体細胞のリプログラミングによってエピジェネティック状態は大きく変化するが、遺伝子変異などは保持される。疾患特異的iPS細胞を用いてディッシュ上で病態を再現することで、遺伝子変異が引き起こす疾患の発症機序を明らかにするさまざまな試みがなされている。例えば、遺伝子変異に起因する分化異常が原因の疾患であれば、疾患患者より得られた遺伝子変異を有する細胞をリプログラミングし、患部と同じ組織に再分化することで分化異常の瞬間を観察し、病態の発生する瞬間を捉えることが可能となる⁷⁾⁸⁾。また、疾患特異的iPS細胞は新規治療法の開発や、新規薬剤の有用性・毒性の検定などへ応用できると考えられる。

2) 疾患特異的iPS細胞研究の実際

難治性神経疾患である筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)は、筋組織を支配している運動ニューロンが変性や死滅することで、筋力低下や筋萎縮が生じる疾患である。詳細な発症機構は不明であるが、家族性ALSでは、SOD1が責任遺伝子の1つとして同定されている。米ハーバード大学のグループは、変異SOD1(L114F)のヘテロ接合体を有する白人の家族性ALSの姉妹(82, 89歳)の皮膚細胞からES細胞とほぼ同様の遺伝子発現パターンを示すiPS細胞を作製し、それが運動ニューロンやグリア細胞へ分化することを示し、疾患特異的iPS細胞を初めて樹立させた⁹⁾。さらに、米ウィスコンシン大学のグループは、脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy: SMA)患者の皮膚細胞より得られたiPS細胞を用いて、運動ニューロンに分化誘導すると運動ニューロンや細胞の大きさが減少することを示し、ディッシュ上で初めて病態の模倣に成功した。また、*in vivo*で有効性が示されている薬剤がこのiPS細胞を用いた実験系でも有効であったことより、疾患特異的iPS細胞による疾患モデルが、薬剤の探索にも有用である可能性が示唆された¹⁰⁾。この他にも、さまざまな疾患において疾患特異的iPS細胞が作製され、特に分

※1 体細胞のリプログラミング(初期化)

分化した体細胞が、発生過程で獲得したエピジェネティック修飾を初期化することで多能性幹細胞へ変化する。初期化因子を体細胞に導入するiPS細胞作製技術や体細胞の核を卵へ移植する体細胞核移植などによって行われる。

※2 疾患特異的iPS細胞

患者より得られた細胞をリプログラミングすることで得られるiPS細胞。特に遺伝性の神経疾患をはじめとした難治性疾患より樹立されている。皮膚などの患部ではない細胞からも得ることができる。

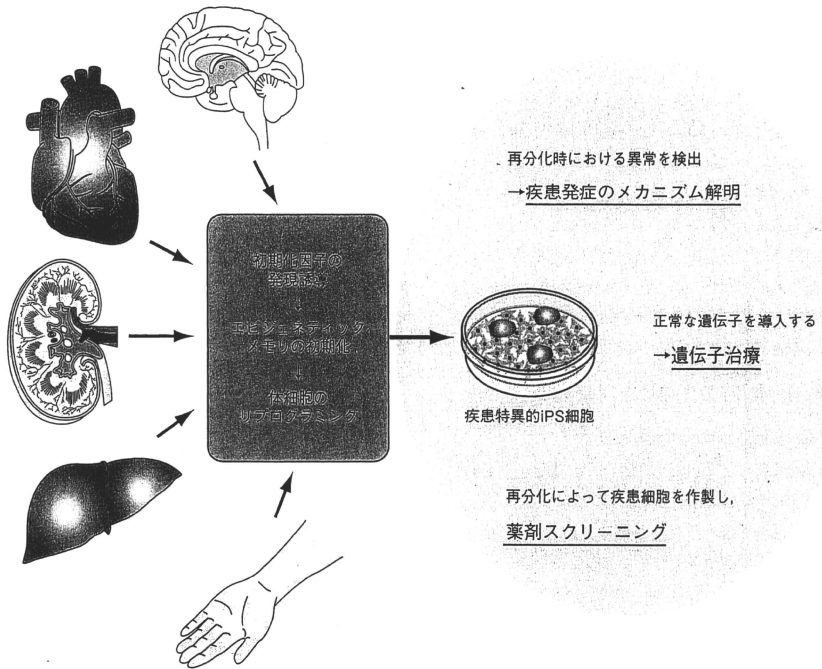


図 体細胞のリプログラミングとその応用

化の異常に起因する疾患に対する発症機序の解明や新規薬剤の探索への応用が期待されている¹⁾。もう1点、付け加えておきたい疾患特異的iPS細胞の特徴は、iPS細胞の状態ではほぼ無限に増殖が可能であり、長期的に研究材料の供給が可能であることである。同様に、これまでモデル動物のなかった疾患に対して細胞レベルでの解析が可能になる。

3 iPS細胞の医療応用へ向けた課題

iPS細胞技術はさまざまな医療への応用が期待されている一方で、克服すべき課題が多く残されている。1つは、iPS細胞の多能性の高さを評価する方法が定まっていない点である。マウスES細胞やiPS細胞では、生殖細胞への分化によって多能性幹細胞由来の遺伝子がキメラを介して次世代に伝わる、いわゆるジャームライン・トランスミッションを示すことでその多能性

幹細胞が全身に寄与している個体が産まれることを示すことができる。しかしながら、ヒトES細胞と同様にヒトiPS細胞もこのような評価を行うことができず、これらの細胞があらゆる体細胞へ分化することを示すことができないことから、臨床応用における品質管理という点で問題となる。2点目はiPS細胞からの再分化において、目的外の細胞への分化が起きてしまう点である。iPS細胞を患者体内に戻す場合、目的外の細胞の混入は可能な限り避ける必要がある。現在、多能性幹細胞から完全な分化誘導ができる条件や細胞が現時点で見つかっておらず、厳密に分化を制御できる条件の探索や、目的の分化を示す細胞のみを選択、あるいは目的外に分化した細胞の完全な除去が試みられている。3点目は、iPS細胞のクローンは相当数の細胞から構成されており、そのなかの細胞が均一な状態にならないことも考慮しなければならない点である。最後に、

初期のiPS細胞において問題となっていたiPS細胞のがん化も避けなければならない。いずれにおいても、iPS細胞の品質のコントロールが臨床応用に向けて急務となっている。

4 エピジェネティック制御を基盤としたiPS細胞の品質管理

1) 多分化能とエピジェネティクス

iPS細胞ではエピジェネティックなリプログラミングがきわめて重要であり、iPS細胞の品質はDNAメチル化をはじめとしたエピジェネティック状態の初期化の度合いに比例するとも言っても過言ではない。DNAメチル化酵素である*Dnmt1*のノックアウトマウスは致死であり、分化過程におけるDNAメチル化の重要性が示されている¹²⁾。ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞とそこから分化させた体細胞では、同じゲノムDNAをもちながら遺伝子の発現プロファイルが大きく異なる。このことは、リプログラミングや分化は、個々の遺伝子の発現制御を包括的に制御するエピゲノム状態、すなわちクロマチン修飾やDNAメチル化の変化によって引き起こされるものであることが強く示唆される¹³⁾。

実際、マウスiPS細胞樹立の最初の報告ではOct3/4やNanogのプロモーター領域のDNA脱メチル化が不完全でiPS細胞を含むキメラマウスが生まれなかったが、改良を受けたiPS細胞ではES細胞に近いDNA脱メチル化がなされており、キメラマウスの作製も成功している¹⁴⁾。ヒストン修飾についても多能性幹細胞では特徴的なパターンを示している。分化細胞では、転写活性化部位のヒストンH3の4番目のリジンがトリメチル化を受けており(H3K4me3)、転写抑制を受けている領域ではヒストンH3の27番目のリジンがトリメチル化(H3K27me3)される傾向が観察されている。

BernsteinとLanderらは免疫沈降されたDNA断片をゲノム全領域にプローブが搭載されたマイクロアレイで同定するChIP-on-chip解析によって、ES細胞におけるヒストンの修飾状態を網羅的に解析した¹⁵⁾。その結果、転写活性化マークであるH3K4me3と転写抑制マークであるH3K27me3が同時に修飾されている領域が検出された。このような“バイバレント”な修飾は発生に寄与する転写因子の遺伝子領域に多くみられ、それらの遺伝子の発現量は低い状態にある傾向が

みられる。このように、ES細胞では発生に関する遺伝子の発現を抑える一方で、分化に向かった際に活性化できる状態を維持していることが示された。iPS細胞でも同様にバイバレントな修飾を受けている領域が同定されており、体細胞リプログラミングの度合いを評価する目安になっている¹⁶⁾。このバイバレントなヒストン修飾を受ける領域は、体細胞とそこから作製されたiPS細胞で異なるDNAメチル化状態を示すことから、リプログラミングや分化にエピジェネティックな制御機構が深く関与していることが支持されている¹⁷⁾。

2) 多能性幹細胞におけるDNAメチル化大規模解析

現在、次世代シーケンサーを用いた大規模解析によって研究室単位でのゲノム解析が実現されている。例えば、1台の次世代シーケンサーでヒトの全ゲノム配列を数週間決定できる時代となってきた。この技術を用いて、ES細胞やiPS細胞におけるDNAメチル化やヒストン修飾の解析も従来の遺伝子単位から全ゲノムレベルへと変わってきている。バイサルファイト処理を行った後にパドロックプローブを用いた部位特異的な増幅を行い、次世代シーケンサーで配列を決定することで、iPS細胞と線維芽細胞においてメチル化の度合いの異なる288領域が決定された¹⁸⁾。さらに、バイサルファイト処理を行ったDNAの塩基配列を次世代シーケンサーで決定するゲノムワイドな1塩基レベルDNAメチル化解析も行われている¹⁹⁾。

これまで、転写制御には、プロモーター領域に存在するCpGのシトシンがメチル化を受け、転写抑制にかかわることが示唆されてきた。しかしながら、分化細胞である胎児肝由来の線維芽細胞では、メチル化されたシトシンの99%以上がCpGであったのに対し、多能性幹細胞であるES細胞やiPS細胞では、約1/4のメチル化シトシンがCpGのシトシンではなく、CHHやCHG(HはA、TまたはG)であった。そして、CHHやCHGといった非CpG型メチル化シトシンはプロモーター領域ではなく、遺伝子が転写されている領域であるgene bodyに多く存在した。これまでの研究でプロモーター領域のCpGのシトシンメチル化を受けた遺伝子の転写は抑制されている傾向にあることが明らかになっているが、gene bodyのCHHやCHGがメチル化を受けている遺伝子については、むしろ転写が活性化している傾向が観察された。すなわち、ES細胞やiPS

細胞におけるDNAメチル化は従来とは異なったメカニズムで転写やその他の生命現象にかかわっている可能性が示唆された。ただし、DNAメチル化の大規模解析で得られた結果は数が少ないため、今後、数多くの実験とともにこれらの結果がもつ意義を含めて議論が必要になってくる。

3) 多能性とエピジェネティック状態

このように、ES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞では、特徴的なDNAメチル化やヒストン修飾の状態が明らかになってきた。一方で、Dlk1-Dio3クラスターにおけるエピジェネティックなサイレンシング状態の解除がマウスiPS細胞の多能性レベルと関連することが明らかとなり、ヒトのES/iPS細胞の品質管理を行ううえで、胚盤蓋上層由来幹細胞(Epiblast stem cell: EpiSC)とbona fide ES細胞の違いを規定するエピジェネティック修飾状態を同定し、分化多能性に与える影響を明らかにすることが必要である²⁰⁾。

また、マウスとヒトのES細胞はともに奇形腫形成能を有するにもかかわらず、異なる性質をもつことが知られている。ヒトES細胞はマウスにおけるEpiSCに性質が近く²¹⁾、bFGFやActivin Aシグナル依存的に未分化能が維持されるが、マウスES細胞はLIFとBMP4依存的に未分化能を維持する。形態も両者で違いがあり、マウスES細胞がより立体的なコロニーを形成するのに対し、マウスEpiSCやヒトES細胞は単層のコロニーを示す。遺伝子発現もヒトES細胞はマウスES細胞よりEpiSCに近いパターンを示す。

また、マウスEpiSCやヒトES細胞ではX染色体の活性化が不十分であることが示され、ヒトES細胞とマウスES細胞は、エピジェネティック修飾状態も異なることが示唆されている²²⁾。注目すべきは、マウスEpiSCにはキメラ動物への寄与能力がなく、マウスES細胞に比して分化が進んだ細胞であると考えられることである。ヒトiPS細胞もマウスEpiSCに近い性質をもっていることから、より高い多分化能を示すiPS細胞の樹立には、マウス型ES細胞株の樹立方法が求められている。最近、HannaやJaenischらのグループはマウスEpiSCやヒトES細胞、ヒトiPS細胞に、プロテインキナーゼA経路の活性化を行うフォルスコリンを添加して培養することでマウス型ES細胞に性質が類似した細胞へ変換できることを見出した²³⁾。

4) エピジェネティクスを基盤としたiPS細胞研究の今後の展望

iPS細胞は今後、数多くの患者やさまざまな組織から樹立されることが考えられ、それぞれの細胞株について厳格な品質管理を行うことが重要である。トランスクリプトームやプロテオームに比べて、DNAのメチル化は分解などによる変動を受けにくい長所をもつ。このことより、細胞のリプログラミングの度合い、すなわちiPS細胞の品質管理において、メチル化DNAはマーカーとしても有用である。これまで、DNAメチル化は、どの領域や塩基がメチル化されるかといった一次元レベルの情報解析されてきたが、今後はDNAの折りたたまれ方などの三次元構造とエピジェネティクスの関係といったより高次元の情報の収集が必要になると考えられる²⁴⁾。例えば、多能性幹細胞の代表的なマーカーである*NANOG*近傍の領域は約200 kbにわたり、DNAの高次構造の制御を介して同時に制御を受けていることが知られている²⁵⁾。この領域にDNA脱メチル化との関連が示唆されている*AID*や*DPPA3*や*APOBEC1*が存在していることもリプログラミング過程におけるDNAの三次構造が与えるDNAの脱メチル化との関係を示唆している²⁶⁾、²⁷⁾。

おわりに

iPS細胞作製技術により、それまで受精卵やES細胞などごく一部に由来する細胞が兼ね備えていた特殊能力が、線維芽細胞や肝細胞、神経細胞などさまざまな細胞に由来する細胞より得られるようになった。それにより、ES細胞が受精卵を破壊することに起因する生命倫理的な問題が大きく軽減されただけでなく、iPS細胞の樹立は細胞の種類を選ばない自由度があり、例えば患者さんより得られたiPS細胞から拒絶反応のない移植用の組織や臓器を作製することも理論的に可能となっている。

従来戻れないと思われていた時空への逆戻り、すなわち体細胞のリプログラミングを可能にしたiPS細胞作製技術は、生命科学におけるタイムマシンとも言われている。この体細胞のリプログラミングにはエピジェネティック状態の初期化の重要性が示されている。最近、iPS細胞を経ずりに線維芽細胞から直接神経細胞へ変換(induced neural cells: iN細胞)することが²⁸⁾

示され²⁸⁾、iPS細胞技術が切り開いたリプログラミング研究に多様性が出てきたが、いずれの場合においてもエピジェネティック状態を厳密に制御することが臨床応用への鍵となっている。ここ数年間のゲノムやエピゲノムの解析技術はめざましい発展をしており、体細胞リプログラミングにおけるエピジェネティック制御をはじめとする分子レベルのメカニズム解明が強く期待されている。

文献

- 1) Hochedlinger, K. & Plath, K. : *Development*, 136 : 509-523, 2009
- 2) Takahashi, K. & Yamanaka, S. : *Cell*, 126 : 663-676, 2006
- 3) Takahashi, K. et al. : *Cell*, 131 : 861-872, 2007
- 4) Yu, J. et al. : *Science*, 318 : 1917-1920, 2007
- 5) Amabile, G. & Meissner, A. : *Trends Mol. Med.*, 15 : 59-68, 2009
- 6) Hochedlinger, K. et al. : *Genes Dev.*, 18 : 1875-1885, 2004
- 7) Saha, K. & Jaenisch, R. : *Cell Stem Cell*, 5 : 584-595, 2009
- 8) Inoue, H. : *Exp. Cell Res.*, in press
- 9) Dimos, J. T. et al. : *Science*, 321 : 1218-1221, 2008
- 10) Ebert, A. D. et al. : *Nature*, 457 : 277-280, 2009
- 11) 長船健二 : *再生医学*, 8 : 310-314, 2009
- 12) Li, E. et al. : *Cell*, 69 : 915-926, 1992
- 13) Bibikova, M. et al. : *Cell Stem Cell*, 2 : 123-134, 2008
- 14) Okita, K. et al. : *Nature*, 448 : 313-317, 2007
- 15) Bernstein, B. E. et al. : *Cell*, 125 : 315-326, 2006
- 16) Maherali, N. et al. : *Cell Stem Cell*, 1 : 55-70, 2007
- 17) Doi, A. et al. : *Nat. Genet.*, 41 : 1350-1353, 2009
- 18) Deng, J. et al. : *Nat. Biotechnol.*, 27 : 353-360, 2009
- 19) Lister, R. et al. : *Nature*, 462 : 315-322, 2009
- 20) Stadtfeld, M. et al. : *Nature*, 465 : 175-181, 2010
- 21) Tesar, P. J. et al. : *Nature*, 448 : 196-199, 2007
- 22) Silva, S. S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105 : 4820-4825, 2008
- 23) Hanna, J. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107 : 9222-9227, 2010
- 24) Lieberman-Aiden, E. et al. : *Science*, 326 : 289-293, 2009
- 25) Levasseur, D. N. et al. : *Genes Dev.*, 22 : 575-580, 2008
- 26) Popp, C. et al. : *Nature*, 463 : 1101-1105, 2010
- 27) Nakamura, T. et al. : *Nat. Cell Biol.*, 9 : 64-71, 2007
- 28) Vierbuchen, T. et al. : *Nature*, 463 : 1035-1041, 2010

<筆頭著者プロフィール>

渡辺 亮 : 2003年東京大学工学系研究科博士課程修了(油谷浩幸教授)。工学博士。東京大学先端科学技術研究センターにてがん抑制遺伝子の機能解析に従事。'09年より京都大学 物質-細胞統合システム拠点 特定拠点助教。'10年改組により現職。リプログラミング過程におけるエピジェネティック制御機構を明らかにし、分化制御に基づいたがん細胞の根絶を目指している。

Rest Promotes the Early Differentiation of Mouse ESCs but Is Not Required for Their Maintenance

Yasuhiro Yamada,^{1,3,4,5,*} Hitomi Aoki,^{2,5} Takahiro Kunisada,² and Akira Hara¹

¹Department of Tumor Pathology

²Department of Tissue and Organ Development, Regeneration, and Advanced Medical Science
Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu, 501-1194, Japan

³Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

⁴PRESTO, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho Kawaguchi, Saitama, Japan

⁵These authors contributed equally to this work

*Correspondence: y-yamada@ciara.kyoto-u.ac.jp

DOI 10.1016/j.stem.2009.12.003

The functional significance of *Rest* in the maintenance of ESC pluripotency remains controversial. We herein showed that *Rest* is not necessary for the maintenance of mouse ESCs, and instead suggested that the *Rest* transcriptional repressor connects to the Oct3/4-Sox2-Nanog core regulatory circuitry during early ESC differentiation.

The pluripotency of ESCs is maintained by coordinated expression of a core regulatory circuit of genes that includes Oct3/4, Sox2, and Nanog. *Rest* (also called *Nr5f*) is abundantly expressed in ESCs and is a target of the Oct3/4-Sox2-Nanog regulatory network. However, the functional significance of *Rest* in the maintenance of pluripotency remains controversial. We have generated *Rest* conditional knockout and *Rest*-inducible ESC lines. Conditional ablation of *Rest* showed that it is not required for maintenance of pluripotency, but it is involved in the suppression of self-renewal genes during early differentiation of ESCs. In addition, forced expression of *REST* in ESCs results in rapid differentiation. These results indicate that *Rest* is not necessary for the maintenance of mouse ESCs, and instead suggest that the *Rest* transcriptional repressor connects to the Oct3/4-Sox2-Nanog core regulatory circuitry during early ESC differentiation.

The transcriptional repressor *Rest* is a zinc finger protein that binds to a conserved 23 bp motif known as RE1 (repressor element 1, also called NRSE) in a number of genes encoding the fundamental neuronal traits (Chong et al., 1995; Schoenherr and Anderson, 1995). *Rest* is expressed throughout early development where it represses the expression of

neural genes, such as *Syp* and *Syt4* (Schoenherr et al., 1996). *Rest* is also expressed in ESCs and it has also been shown to be one of target genes of the regulatory circuitry of the pluripotent state in ESCs (Johnson et al., 2008; Sun et al., 2005). However, the functional significance of *Rest* in the maintenance of pluripotency in ESCs still remains controversial (Buckley et al., 2009; Jørgensen et al., 2009a; Singh et al., 2008). A previous study with a heterozygous *Rest* ESC line combined with an siRNA knock-down indicated that *Rest* maintains pluripotency through the induction of self-renewal genes, such as *Oct3/4*, *Nanog*, and *Sox2* (Singh et al., 2008). In contrast, Jørgensen et al. generated a *Rest* null ESC line and reported that such *Rest* null ESCs revealed no substantial change in either the Oct3/4 protein levels or alkaline phosphatase activity in comparison to matched wild-type controls (Jørgensen et al., 2009a, 2009b).

In order to elucidate the role of *Rest* in the maintenance of pluripotency, we first generated an ESC line and mice that contained the conditional knockout alleles of *Rest*. The first *Rest* allele in the ESCs (V6.5) was replaced with the KO vector carrying the floxed last exon of *Rest*, which encodes the coRest binding site that is essential for the generation of the silencing complex (Andrés et al., 1999; Grimes et al., 2000), followed by *ires-Gfp* to monitor the transcription of the modified allele (*Rest*^{3lox/+}; Figure 1A). The transient expression of *Cre recombinase* generated a *Rest* floxed ESC line that lacks a drug selection cassette (*Rest*^{2lox/+}). Analyzing the GFP expression allowed us to confirm that *Rest* is expressed in ESCs (Figure 1B).

Rest^{-/-} ESCs were next generated with the floxed *Rest* ESC line together with a plasmid expressing *Cre recombinase* (Figure 1A). After the excision of the floxed *Rest* gene by the transient transfection of *Cre* (*Rest*^{+/-(1lox)}), the second *Rest* allele was also replaced with the floxed allele (*Rest*^{2lox/-}). The transient transfection of *Cre* into *Rest*^{3lox/-} ESCs resulted in the establishment of *Rest*^{-/-} ESCs that were isogenic to the parental ESCs without any genetic modification except for the *Rest* alleles.

After the recombination of the *Rest* alleles, the lack of a *Rest* transcript in such *Rest*^{-/-} ESCs was confirmed by a northern blot analysis (Figure 1B; Figure S1A available online). Consistent with the recombination, a FACS analysis revealed a lack of any GFP signal in the *Rest*^{-/-} ESCs (Figure 1B). In addition, a western blot analysis revealed the lack of any *Rest* protein in such *Rest*^{-/-} ESCs (Figure 1B). *Syt4* possesses RE1 and it is expressed while relying solely on dissociation of the *Rest* repressor complex from the RE1 site for maximal expression (Ballas et al., 2005). The expression of *Syt4* significantly increased in the *Rest*^{-/-} ESCs, thus indicating that the *Rest*-targeted gene is derepressed in *Rest*^{-/-} ESCs (Figure S1B).

Consistent with the findings by Jørgensen et al. (2009a, 2009b), the growth and morphology of the *Rest*^{-/-} ESCs were indistinguishable from those of wild-type V6.5 ESCs under the self-renewal conditions (under the presence of LIF and MEF). Furthermore, when the expression of the pluripotent genes was compared, the expression of *Nanog*, *Oct3/4*, and *Sox2* in *Rest*^{-/-} ESCs were not altered

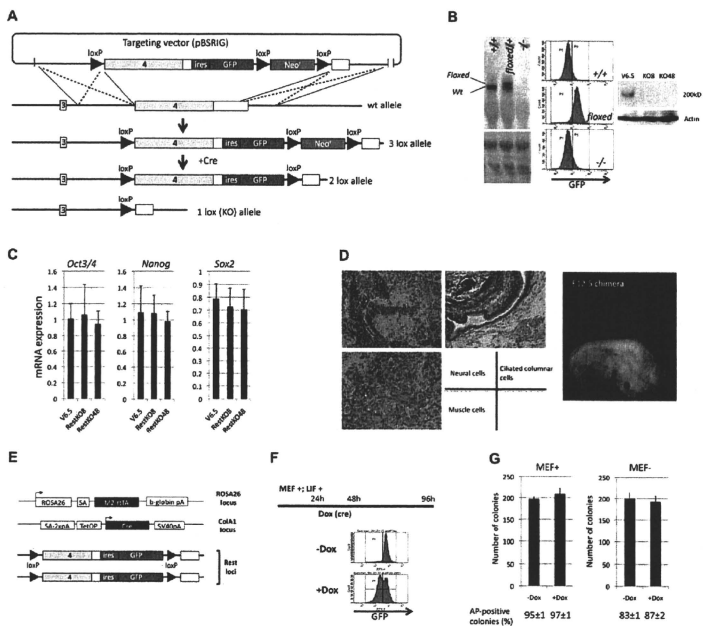


Figure 1. Rest Is Not Required for the Maintenance of ESC Pluripotency
 (A) A schematic drawing of the *Rest*-conditional knockout vector and targeted *Rest* allele.
 (B) A northern blot analysis reveals a lack of *Rest* transcripts. GFP fluorescence is observed to have disappeared in the *Rest*^{-/-} ESCs. A western blot analysis shows the absence of any Rest protein in two independent knockout ESC lines, RestKO8 and RestKO48.
 (C) Transcript levels of pluripotent genes in *Rest*^{-/-} ESCs. No significant changes in the expression of *Oct3/4*, *Nanog*, and *Sox2* are detectable in the *Rest*^{-/-} ESCs relative to the control ESCs. Transcript levels were normalized to β -actin levels. The data are presented as the average values with SD of six independent samples.
 (D) *Rest*^{-/-} teratomas differentiate into three different germ layers, including neural cells, ciliated columnar cells, and muscle cells. E12.5 chimeric mice were generated by injecting *Rest*^{-/-} ESCs into blastocysts.
 (E) A schematic drawing of the conditional *Rest* knockout ESC line containing doxycycline-inducible Cre alleles.
 (F) An experimental protocol. Conditional *Rest* knockout ESCs were treated with doxycycline (2 μ g/ml) for 24 hr starting at 24 hr and then were harvested at 96 hr after the passage. A FACS analysis revealed the presence of GFP-negative cells, thus indicating the occurrence of *Rest* ablation at 96 hr after passage.
 (G) The conditional deletion of the *Rest* gene does not suppress the development of alkaline phosphatase (AP)-positive ESC colonies under the presence or absence of feeder cells. *Rest*-floxed Cre-inducible ESCs were exposed to doxycycline and then were fixed after 3 days of exposure. The total number of colonies and the percent positivity for AP are indicated. The data are presented as the mean \pm SD of three independent 35 mm wells.

in comparison to those in the control ESCs (Figure 1C). To further examine the pluripotency of *Rest*^{-/-} ESCs, *Rest*^{-/-} ESCs were next injected into the subcutaneous tissue of nude mice. *Rest*^{-/-} ESCs could generate teratomas with evidence of differentiation into three different germ layers (Figure 1D). To fully evaluate the differentiation ability of the *Rest*^{-/-} ESCs, GFP-labeled *Rest*^{-/-} ESCs were

injected into blastocysts followed by transplantation into the uteri of pseudo-pregnant mice to generate chimeric embryos (Yamada et al., 2004). Eventually, this generated E12.5 chimeric mice with the widespread contribution of GFP-positive cells into the three germ layers (Figure 1D; Figure S1C).

In order to rule out the possibility that the adaptive responses, which occurred

as a result of multiple cell passages, reduced the requirement of Rest-mediated maintenance of ESCs, the initial response of the gene expression was examined after the conditional ablation of the *Rest* genes. For this purpose, an ESC line was derived from transgenic embryo that harbors a doxycycline-inducible Cre transgene together with *Rest*-floxed alleles (Figure 1E; *Rest2lox/2lox*;

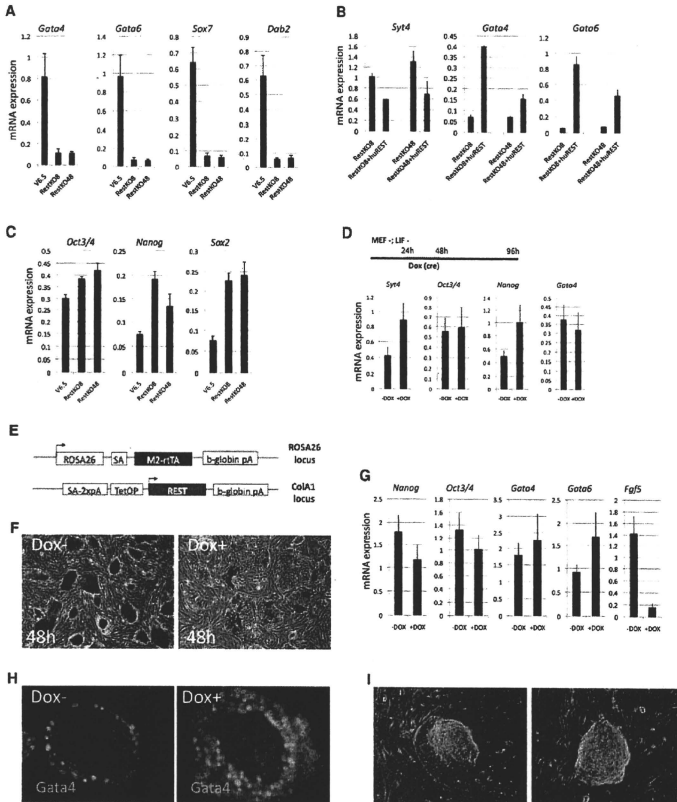


Figure 2. *Rest* Promotes Primitive Endoderm Differentiation in ESCs

(A) Under confluent culture conditions, the expression of *Gata4* and *Gata6* were significantly lower in the *Rest*^{-/-} ESCs in comparison to the control isogenic ESCs (V6.5). The expression of *Sox7* and *Dab2*, which are both markers for the primitive endoderm, are suppressed in *Rest*^{-/-} ESCs. Transcript levels were normalized to β -actin levels. The data are presented as the average values with SD of six independent samples.

(B) The exogenous expression of *REST* rescued the suppression of *Gata4* and *Gata6* in *Rest*^{-/-} ESCs. Mean \pm SD of three independent samples.

(C) The expression of pluripotent genes in the embryoid body (EB) cells. The expression of *Oct3/4*, *Nanog*, and *Sox2* are upregulated in *Rest*^{-/-} EB cells relative to the control EB cells. The data are presented as the mean \pm SD of six independent samples.

(D) Conditional *Rest* knockout ESCs were cultured under differentiation culture conditions and treated with doxycycline (2 μ g/ml) for 24 hr starting at 24 hr. The cells were harvested at 96 hr after the passage. The expression of *Syt4*, *Oct3/4*, *Nanog*, and *Gata4* after the conditional deletion of *Rest* under the differentiation culture condition. Note that the expression of *Nanog* and *Syt4*, but not of *Oct3/4*, were upregulated in the doxycycline-treated cells. The data are presented as the mean \pm SD of six independent samples.

(E) A schematic drawing of the doxycycline-inducible *REST* ESC line.

(F) 48 hr of the induction of *REST* causes the ESC differentiation into epithelium-like colonies with a decreased AP activity.

(G) The forced expression of *REST* in ESCs leads to decreased expression of *Nanog*, *Oct3/4*, and *Fgf5*, whereas it results in increased expression of *Gata6*. The data are presented as the mean \pm SD of six independent samples.

(H) In vitro differentiation of *REST*-inducible ESCs into EBs under the absence or presence of doxycycline. The exogenous *REST* expression results in an increased number of *Gata4*-positive cells at the periphery of EBs.

Rosa26::rtTA; Col1a1::tetO-Cre ESCs; Beard et al., 2006; Hochedlinger et al., 2005). This new ESC line enabled the conditional deletion of the floxed *Rest* genes in the presence of doxycycline. After 3 days of doxycycline exposure, the recombination in both alleles of the *Rest* was confirmed in 70%–80% of these ESCs by FACS (Figure 1F). However, the conditional deletion did not suppress the formation of AP-positive colonies regardless of the presence or absence of feeder cells in comparison to the parental ESCs without doxycycline (Figure 1G). In addition, the expression levels of *Oct3/4* and *Nanog* did not change, whereas the expression level of *Syt4* was derepressed while demonstrating evidence of *Rest* recombination shortly after doxycycline treatment (Figure S1D). These results therefore clearly rule out both the possibility of the adaptation in the long-term culture as well as the notion that feeder cells reduce the requirement of *Rest*-mediated ESC maintenance. Taken together, our results indicate that *Rest* is not required for the maintenance of ESC pluripotency in these experimental conditions.

Both *Gata4* and *Gata6* were significantly downregulated in the *Rest*^{-/-} ESCs under confluent culture conditions (Figure 2A), although the findings were not prominent before the cells reached confluence. *Gata4* and *Gata6* are transcriptional factors that promote primitive endoderm differentiation (Fujikura et al., 2002; Niwa, 2007). These findings suggest that the genetic deletion of *Rest* prevents ESCs from differentiating toward the primitive endoderm. The notion of the suppression of primitive endoderm differentiation is confirmed by the decreased expression of both *Sox7* and *Dab2*, markers for the primitive endoderm (Shimoda et al., 2007; Yang et al., 2002), in *Rest*^{-/-} ESCs (Figure 2A). Consistent with this notion, embryoid bodies (EBs) generated from *Rest*^{-/-} ESCs revealed a decreased number of *Gata4*-expressing cells in the periphery of EBs on the histological sections in comparison to the control EBs (13.1 ± 15.0/EB and 30.4 ± 9.02/EB in *Rest*KO8 EBs and V6.5 EBs,

respectively, $p < 0.006$ by Student's *t* test) (Figure S2A). Rescue experiments were performed with a plasmid containing human *REST* cDNA (Grimes et al., 2000) to further investigate the direct association of the genetic deletion of *Rest* and the altered expression of *Gata4* and *Gata6* in confluent *Rest*^{-/-} ESCs. Importantly, the decreased expression of both *Gata4* and *Gata6* in confluent *Rest*^{-/-} ESCs were derepressed by the exogenous expression of *REST* (Figure 2B).

The expression of *Nanog*, *Oct3/4*, and *Sox2* were significantly higher in the *Rest*^{-/-} EB cells than in the control EB cells (Figure 2C). Accordingly, these observations suggest that the delayed repression of self-renewal genes during the early differentiation of ESCs may thus cause the suppression of the early differentiation of *Rest*^{-/-} ESCs. To further examine the initial response of gene expression upon the early differentiation of *Rest*^{-/-} ESCs, the differentiation (-LIF, -MEF) of *Cre*-inducible *Rest*-floxed ESCs was induced with/without doxycycline exposure (Figure 2D). At 3 days after doxycycline treatment, the expression of *Nanog*, but not of *Oct3/4*, was observed to be significantly higher in the doxycycline-treated ESCs than that of the nontreated ESCs (Figure 2D). In contrast, a decreased expression of *Gata4* was not detectable at 3 days after doxycycline treatment when the *Syt4* expression had already been derepressed (Figure 2D). These results suggest that a decreased expression of *Gata4* in *Rest*^{-/-} cells is preceded by an increased expression of *Nanog* and that *Gata4* repression is therefore a secondary effect of *Rest* ablation.

Finally, a doxycycline-inducible *REST* ESC line was generated (Figure 2E; Figure S2B). The forced expression of *REST* led to the rapid morphological changes of ESC colonies into an epithelium-like shape, which was accompanied by decreased AP activity (Figure 2F). In line with such morphological changes, ESCs with exogenous *REST* expressed significantly lower levels of self-renewal genes. The expression of *Gata6* was higher, whereas the expression of an epiblast marker, *Fgf5*, was significantly

lower in such ESCs (Figure 2G). Furthermore, an increased number of *Gata4*-expressing cells in the periphery of EBs was observed in the exogenous *REST*-induced EBs (79.2 ± 19.6/EB and 50.7 ± 17.6/EB in *REST*-induced EBs and control EBs, respectively, $p < 0.004$ by Student's *t* test) (Figure 2H), thus suggesting that the forced *REST* expression promotes the ESC differentiation into the primitive endoderm. Importantly, the *REST*-induced ESC differentiation was, at least in part, rescued by the *Nanog* overexpression (Figure 2I; Figure S2D).

Although the critical role of the *Oct3/4*-*Sox2*-*Nanog* core transcription circuitry in the maintenance of ESC pluripotency is widely accepted (Boyer et al., 2005, 2006; Chambers et al., 2003; Loh et al., 2006; Mitsui et al., 2003; Niwa et al., 2000), the mechanisms leading to the breakdown of such core circuitry upon the early ESC differentiation are still not well understood (Kunath et al., 2007). The present study demonstrated that *Rest* ablation causes delayed repression of the pluripotent genes, whereas overexpression of *REST* immediately results in the suppression of the pluripotent gene expression. It is noteworthy that the delayed repression of the pluripotent genes by the conditional ablation of *Rest* was predominantly observed in *Nanog*. Given the fact that *Rest* is a transcriptional repressor and *Nanog* harbors RE1 in its promoter (Johnson et al., 2008), the current results therefore suggest that *Rest* is involved in the silencing of *Nanog* expression during the early differentiation of ESCs. This notion is also supported by the observation that ectopic *REST* in *Rest*^{-/-} ESCs predominantly repressed the *Nanog* expression relative to the expression in original *Rest*^{-/-} ESCs (Figure S2C). These findings suggest that *Rest* is an external factor connecting to the *Oct3/4*-*Sox2*-*Nanog* regulatory network core circuitry to influence the initial differentiation of ESCs. It is interesting to note that *Rest* is abundantly expressed in ESCs and it is a target of the *Oct3/4*-*Sox2*-*Nanog* regulatory network core circuitry (Johnson et al., 2008). It is possible that the negative feedback loop through *Rest* may play

(I) The *Nanog* overexpression dampens the *REST*-mediated ESC differentiation. *REST* was induced in *Nanog*-overexpressing and *EGFP*-overexpressing ESC colonies by the doxycycline exposure. The 24 hr exposure of doxycycline led to the rapid differentiation in *EGFP*-overexpressing ESCs (arrowheads), whereas *Nanog*-overexpressing ESCs retained an undifferentiated morphology. After the 48 hr exposure of doxycycline, 16 out of 25 *EGFP*-overexpressing colonies (68%) started to differentiate, whereas none of *Nanog*-overexpressing colonies (0/21, 0%) revealed the evidence of differentiation (see also Figure S2E).