

(平成 23 年度研究報告書)

23-B-6 循環中の微量がん細胞の高感度発現解析に基づく
胃がんのオーダーメイド医療の実用化に関する研究

独立行政法人国立がん研究センター中央病院・上部消化管腫瘍科 深川 剛生

研究の分類・属性

内科系

研究の概要

早期および進行胃がん患者腹腔洗浄液や腹水中の微量がん細胞および細胞株の遺伝子発現プロファイルから高感度分子細胞診断用ミニ DNA チップなどの最新の遺伝子解析法によって胃がんの再発、その形式や予後の分類・予測法を確立するとともに、予後不良例の分子経路を捉え、治療標的分子を探索する。分類・予測のための遺伝子解析法は、過去に蓄積した約 400 症例の腹腔洗浄液や約 1000 症例の血液や骨髄液で評価し、対外診断薬としての認可を目指す。また治療標的分子に関しては、既存の阻害剤または siRNA の効果を in vitro および in vivo で評価する。

研究経費

5,000 千円

研究班の組織

深川剛生	国立がん研究センター中央病院、消化管腫瘍科、外来医長	腹腔洗浄液採取、 臨床情報の解析
佐々木博己	国立がん研究センター研究所、遺伝医学研究分野、ユニット長	検体の管理、 分子生物学的解析

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標)：胃がん患者の腹腔内、血液、骨髄液中を循環しているがん細胞 (Isolated Tumor Cell, ITC) の存在を高感度に検出する分子細胞診断法の確立および再発とその形式や予後などの性質診断法の確立する。またその研究過程で捉えた悪性度相関分子経路から新しい治療法の開発へ向けたシーズを見出す。

第 1 年次

(到達目標)

平成 23 年度は、患者毎に高感度に微量胃がん細胞を検出するミニ DNA チップ法 (分子細胞診断法) の開発を行い、過去に集積した腹腔内洗浄液沈査 RNA に適用する。新たに収集する腹腔内洗浄液や腹水から微量ながん細胞を集め、網羅的遺伝子発現プロファイルを集積する。

(年次評価時点の実績要点)

患者毎に3日以内に結果を報告できる高感度分子細胞診断用ミニDNAチップ解析法の開発に成功し、特許申請を行った(特願2011-247757)。昨年12月から新たに集めた腹腔内洗浄液や腹水の数も160症例を超え、抗EP-CAM抗体で集めることのできた微量胃癌細胞の遺伝子発現プロファイリングが可能であることを示した。

研究成果と考察

第1年次評価時点

従来の分子細胞診断用ミニDNAチップ解析法(特許4317854号)は早期胃癌患者などの陰性コントロール群の試料を使って閾値を決定しなければならなかったため、患者毎に判定するには陰性コントロール試料と検体をその都度測定しなければならず、実用化に向いていなかった。しかし、今回の方法によって上記のような陰性コントロール群を使用することなく、進行胃癌患者毎に3日間以内に判定結果を出すことができるようになった。また定量的RT-PCRに比べ、DNAチップのCV値(ばらつき)は小さく、バックグラウンド値の1.25倍以上のシグナル強度で陽性と判定できた。その結果、調べた進行胃癌の再発の約7割を検出できた。また、細胞診の結果と95%一致し、細胞診陰性・チップ陽性例は細胞診陽性症例の予後と同様に不良であった。細胞診陰性ミニチップ陽性例の再発率、死亡率ともに、従来法よりも各15、11ポイント高く、精度よく胃癌の再発・予後予測可能であった。これらの結果から本発明の特許申請も行った(特願2011-247757)。昨年12月から新たに集めた腹腔内洗浄液や腹水の数も160症例を超え、抗EP-CAM抗体で集めることのできた微量胃癌細胞の遺伝子発現プロファイリングが可能であった。

以上の成果からほぼ100%の達成率としたい。

倫理面への配慮

本研究の中で、マイクロアレイ等による体細胞遺伝子発現・構造解析は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を準拠して試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進める。過去に集めた腹腔洗浄液、抹消血、骨髓液は、施設内の倫理審査委員会の承認を得、患者の同意を取った試料である。平成23年度から集める試料についても、同様の手続きのもとで、研究に使用する。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

平成23年度：

(英語雑誌論文)

1. Yamashita H, Katai H, Morita S, Saka M, Taniguchi H, **Fukagawa T**. Optimal extent of lymph node dissection for Siewert type II esophagogastric junction carcinoma. *Ann Surg* 2011;254:274-80.
2. Tanaka N, Katai H, Saka M, Morita S, **Fukagawa T**. Laparoscopy-assisted pylorus-preserving gastrectomy: a matched case-control study. *Surg Endosc* 2011;25:114-8.
3. Saka M, Morita S, **Fukagawa T**, Katai H. Present and future status of gastric cancer surgery. *Jpn J Clin Oncol* 2011;41:307-13.
4. Nonaka S, Oda I, Nakaya T, Kusano C, Suzuki H, Yoshinaga S, **Fukagawa T**, Katai H, Gotoda T. Clinical impact of a strategy involving endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer: determining the optimal pathway. *Gastric Cancer* 2011;14:56-62.
5. Kosaka Y, Mimori K, **Fukagawa T**, Ishikawa K, Etoh T, Katai H, Sano T, Watanabe M, Sasako M, Mori M. Clinical Significance of Molecular Detection of Matrix metalloproteinase-1 in Bone Marrow and Peripheral Blood in Patients with Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* 2011.
6. Iwasa S, Yamada Y, **Fukagawa T**, Eguchi Nakajima T, Kato K, Hamaguchi T, Morita S, Saka M, Katai H, Shimada Y. Management of adjuvant S-1 therapy after curative resection of gastric cancer: dose reduction and treatment schedule modification. *Gastric Cancer* 2011;14:28-34.
7. Wang K, Diskin SJ, Attiyeh EF, Winter C, Schnepf RW, Diamond M, Zhang H, Hou C, Bosse K, Mayes P, Glessner J, Kim C, Frackelton E, Garris M, Wang Q, Glaberson W, Chiavacci R, Nguyen L, Saeki N, **Sasaki H**, Grant SFA, Mosse YP, Iolascon A, Hannenhalli S, Li H, Devoto M, McGrady PW, London WB, Capasso M, Rahman N, Hakonarson H, Maris JM. Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene. *Nature* 2011; 469: 216-220.
8. Saeki N, Saito A, Choi JI, Matsuno K, Ohnami S, Totsuka H, Chiku S, Kuchiba A, Lee Y-S, Yoon K-A, Kook M-C, Park SR, Kim Y-W, Tanaka H, Tajima K, Hirose H, Tanioka F, Matsuno Y, Sugimura H, Kato S, Nakamura T, Nishina T, Yasui W, Aoyagi K, **Sasaki H**, Yanagihara K, Katai H, Shimoda T, Yoshida T, Nakamura Y, Hirohashi S, Sakamoto H. Chromosome 1q22 is a susceptibility locus of diffuse-type gastric cancer,

harboring a functional SNP of MUC1. Gastroenterology 2011; 140: 892-902.

9. Aoyagi K, Minashi K, Igaki H, Tachimori Y, Nishimura T, Hokamura N, Ashida A, Daiko H, Ochiai A, Muto M, Ohtsu A, Yoshida T, **Sasaki H**. Artificially induced epithelial-mesenchymal transition in surgical subjects: its implications in clinical and basic cancer research. PLoS ONE 2011; 6(4):e18196.
10. Oue N, Noguchi T, Anami K, Sentani K, Sakamoto N, Uraoka N, Wakamatsu Y, Sasaki H, Yasui W. Serum concentration and expression of Reg IV in patients with esophageal cancer: age-related elevation of serum Reg IV concentration. Oncol Lett 2011; 2: 235-239.
11. Hoshino A, Ishii G, Aoyagi K, Ohtaki Y, Nagai K, **Sasaki H**, Ochiai A. Podoplanin-positive fibroblasts enriched at perivasucular region enhance lung adenocarcinoma tumor formation. Cancer Res 2011; 71: 4769-4779.
12. Shibata T, Kokubo A, Saito S, Narisawa-Saito M, **Sasaki H**, Aoyagi K, Yoshimastu Y, Katai H, Kushima R, Kiyono T, Yamamoto M, Hirohashi S. Molecular signatures of NRF2 mutation confers malignant potential and resistance to chemoradiation therapy in advanced esophageal squamous cancer. Neoplasia 2011; 13: 864-873.
13. Ono H, Hiraoka N, Lee Y-S, Woo SM, Lee WJ, Choi IJ, Saito A, Yanagihara K, Kanai Y, Ohnami S, Sakamoto H, Chiwaki F, Sasaki H, Yoshida T, Saeki N. Prostate stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis. Genes Chromosomes Cancer (in press)
14. Oue N, Noguchi T, Anami K, Kitano S, Sakamoto N, Sentani K, Uraoka N, Aoyagi K, Yoshida T, Sasaki H, Yasui W. Cytokeratin 7 is a predictive marker for survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol (in press)

(日本語雑誌論文)

1. 深川剛生、術後補助療法 胃癌：外科医のための最新癌薬物療法。臨床外科 2011;66: 107-9.
2. 深川剛生、阪真、三森功士、佐々木博己、森田信司、石田道拓、片井均、胃がんの予後予測因子、総合臨床 2011; 60: 461-463.
3. 佐々木博己、西村公男、小松崎理絵、千脇史子、青柳一彦、山田康秀、がん幹細胞を標的とした Hedgehog シグナル阻害薬、Mebio 2011; 28: 7-15.

(学会発表) 筆頭演者、発表責任者のみ記載

1. 深川剛生、片井均、阪真、森田信司、石田道拓、CY陽性胃がんに対する治療方針、第83回日本胃癌学会総会ワークショップ3、2011.
2. Takeo Fukagawa, Hitoshi Katai, Makoto Saka, Shinji Morita, Michihiro Ishida. Prognosis of gastric cancer patients with lavage cytology positive and new therapeutic strategies. 9th International Gastric Cancer Congress, Seoul. April, 22nd 2011.
3. 深川剛生、片井均、阪真、森田信司、石田道拓、洗浄細胞診陽性進行胃がんに対する治療成績と術前化学療法の評価。第66回日本消化器外科学会総会シンポジウム2、2011.
4. 深川剛生、新しいエネルギーデバイスの可能性：胃がん手術にどう応用するか。第66回日本消化器外科学会総会ランチョンセミナー、2011.
5. Takeo Fukagawa, Current Topics about Gastric Cancer Surgery. 2nd Oncological Seminar on Digestive Disease, Moscow. 12th Nov. 2011.
6. 深川剛生、片井均、森田信司、石田道拓、奥田幸恵、洗浄細胞診陽性胃癌に対する治療方針：術前治療か術後補助治療か。第73回日本臨床外科学会総会ワークショップ4、2011.
7. 西村公男、青柳一彦、三梨桂子、谷口浩和、武藤学、吉田輝彦、坂井義治、佐々木博己、食道癌治療前生検検体の網羅的遺伝子発現解析による食道癌幹細胞関連遺伝子の検索、第111回日本外科学会、ワークショップ、2011
8. Sasaki H. Subtyping and recurrence/prognosis prediction of gastric and esophageal cancers by the use of DNA chip. The 9th Annual Meeting of JSMO, 2011.
9. 藤田剛、高橋陵宇、千脇史子、柳原五吉、青柳一彦、坂本裕美、深川剛生、片井均、落谷孝広、今野弘之、吉田輝彦、佐々木博己、びまん性胃癌における癌幹細胞の同定とその特性、第70回日本癌学会、ワークショップ、2010.
10. 青柳一彦、三梨桂子、加藤健、山田康秀、西村公男、小松崎理絵、大幸宏幸、武藤学、落合淳志、大津敦、吉田輝彦、佐々木博己、治療前生検試料の発現プロファイリングにより分類された食道がんの化学放射線療法感受性に関

わる2つのサブタイプ、第70回日本癌学会、ワークショップ、2011.

11. 西村公男, 青柳一彦, 三梨桂子, 武藤学, 山田康秀, 日月裕司, 坂井義治, 吉田輝彦, 佐々木博己, 食道癌における新規EMT制御因子としてのSIX1の同定およびその機能解析、第70回日本癌学会、ワークショップ、2011.
12. 千脇史子, 檀上稲穂, 西村公男, 小松崎理絵, 青柳一彦, 佐々木博己, 扁平上皮がん幹細胞の分化誘導療法の開発、第70回日本癌学会、2011.

(書籍)

Saeki N, Sasaki H. Gasdermin superfamily: a novel gene family functioning in epithelial cells. In Endothelium and Epithelium: Composition and Functions. Carrasco J and Mota M (edits) Nova Science (2011)

(知的財産権)

特許出願

発明の名称: 胃癌の再発を判定する方法

出願番号: 特願2011-247757

特許出願日: 平成23年11月11日

発明者: 深川剛生, 佐々木博己, 福島雅夫, 間森千春

出願人: 独立行政法人国立がん研究センター, 住友ベークライト株式会社

(政策提言 (寄与した指針等))

平成23年度次世代医療機器評価指標作成事業、テーラーメイド医療診断機器 (DNAチップ等を用いる遺伝子発現解析装置) 審査WG委員としてガイドラインを作成した (分担研究者佐々木博己)。