

(平成 24 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

深川 剛生
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

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。

平成 24 年度研究経費

3,675 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を確立する。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 2 年次（到達目標）

1. 新たに集めた腹腔内洗浄液から RNA を抽出し、高感度分子細胞診断用ミニ DNA チップ解析法で細胞診陽性例を確実に検出できるか評価する。ミニ DNA チップ解析法は共同開発企業と PMDA への薬事申請を行う。さらに上記 RNA の抽出からチップ解析を大手臨床検査会社が行う体制をつくるため、事業化を進める。
2. 腹腔内の微量胃がん細胞や高腹膜播種細胞株の遺伝子発現プロファイルから、再発形式や予後と相関する遺伝子や分子経路を探索する。分類に役立つ遺伝子に関しては、その発現を定量する診断法を開発する。治療標的遺伝子産物や分子経路に関しては、既存の阻害剤または siRNA の効果を in vitro 細胞培養系で評価する。

(年次評価時点の実績要点)

1. 製造販売会社としては(株)住友ベークライト、検査会社としては(株)三菱化学メディエンスの体制が整った。2004年に集めた189例のうち89例でカットオフ値を決定し、100例で検証したデータおよび2010年から集めた390例のうち250例のデータを揃え、年度内にPMDAへの体外診断薬としての製造販売承認申請を行なう準備を進めた。申請のためのコンサルティングは(株)シミックが行なっている。
2. 高腹膜再発未分化型胃がん細胞株60As6のがん幹細胞分画で高発現する増殖抑制系シグナルの阻害剤がドセタキセルによる腹膜再発抑制効果を増強することを示し、特許を申請した(特願2012-29907)。その作用機序は静止期のがん細胞を再増殖誘導し、抗がん剤の効果を高めるものであり、本年度末には追加データを付記し、PTC出願することが決定している。

研究成果と考察

第2年次評価時点

胃がん再発予測チップの臨床性能に関する研究

高感度分子細胞診断用ミニDNAチップ解析法(特願2011-247757)の各遺伝子のカットオフ値はバックグラウンド値の1.25倍-5倍までの6通りの組み合わせで、2004年の試料189例のうち89例で決定し、100例で検証する方法を用いた。

◇ カットオフ値の設定 (89症例)

進行胃がん		リンパ転移		細胞診		実施例		再発		死亡					
+(陽性)/-(陰性)	症例数	+(陽性)/-(陰性)	症例数	+(陽性)/-(陰性)	症例数	+(陽性)/-(陰性)	症例数	症例数		症例数					
+	89	-	24	-	24	Low	19	1	5.3%	1	5.3%				
						Intermediate	5	1	20.0%	0	0.0%				
						High	0	0	-	0	-				
		+	65	-	46	-	46	Low	37	13	35.1%	11	29.7%		
								Intermediate	3	1	33.3%	1	33.3%		
								High	6	5	83.3%	4	66.7%		
				+	19	+	19	+	19	Low	1	0	0.0%	0	0.0%
										Intermediate	2	2	100.0%	2	100.0%
										High	16	14	87.5%	12	75.0%

◇ カットオフ値の検証結果 (100症例)

進行胃がん		リンパ転移		細胞診		実施例		再発		死亡					
+(陽性)/-(陰性)	症例数	+(陽性)/-(陰性)	症例数	+(陽性)/-(陰性)	症例数	+(陽性)/-(陰性)	症例数	症例数		症例数					
+	100	-	33	-	33	Low	27	2	7.4%	1	3.7%				
						Intermediate	3	1	33.3%	1	33.3%				
						High	3	2	66.7%	1	33.3%				
		+	67	-	52	-	52	Low	35	9	25.7%	5	14.3%		
								Intermediate	10	7	70.0%	6	60.0%		
								High	7	6	85.7%	6	85.7%		
				+	15	+	15	+	15	Low	0	0	-	0	-
										Intermediate	1	1	100.0%	1	100.0%
										High	14	11	78.6%	10	71.4%

図1. カットオフ値の設定を行った89症例とカットオフ値の検証を行った100症例は同様の結果を示したため、設定したカットオフ値は妥当だと考えられる。

またカットオフ値の前後15%の領域は中間の再発リスクであったことから、高リスク、中リスク、低リスクの3段階で判定することに決定し、関連特許の申請を進めた(図1)。この方法を用いると、図2に示すように、細胞診より感度良く再発例を見つけることができる。

胃がんチップの結果

	症例数	再発症例数		死亡症例数	
Low	119	25	21%	18	15%
Intermediate	24	13	54%	11	46%
High	46	38	83%	33	72%

細胞診の結果

	症例数	再発症例数		死亡症例数	
陰性	155	48	31%	37	24%
陽性	34	28	82%	25	74%

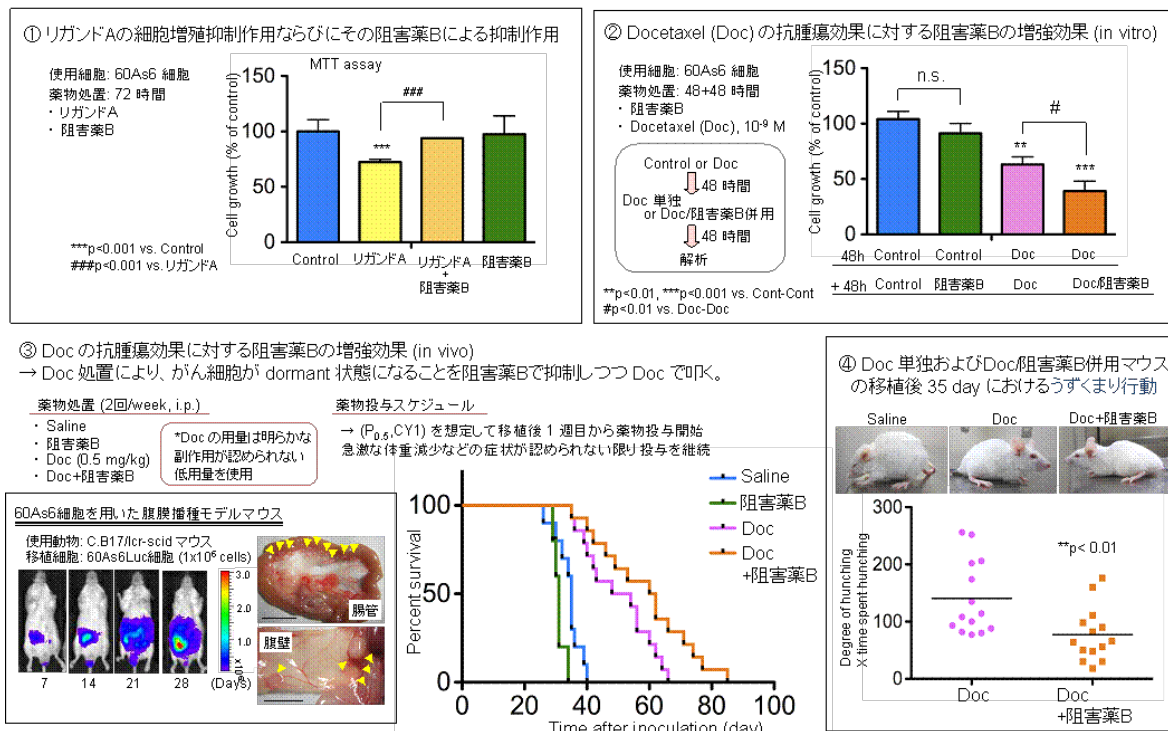
図2. 細胞診よりも多くの再発症例(28 vs. 51)をHighまたはIntermediateとして予測できた。

新たに集めた 20 検体での 2 施設間 (住友一三菱) の解析結果比較でも実質 95% の一致率を示したので、現在、三菱化学メディエンスが試料からの RNA の抽出、RT-PCR、ミニ DNA チップとの反応、計測、判定を一括で行うべく、12 月を目途に 200 検体 (現在まで 390 検体収集) を解析中である。

胃がんの腹膜再発抑制療法の基礎的な研究

未分化型胃がんの腹膜再発抑制に向けた抗がん剤増強剤の開発は、以下のようにして行った。高腹膜再発細胞株 60As6 から抗 CXCR4 抗体でがん幹細胞分画 (CXCR4+ 小型細胞から CXCR4- 小型細胞さらに MUC5AC+ 大型細胞へ分化、薬剤耐性、高スフェロイド・腫瘍形成能などの性質を持つ) を分離し、マイクロアレイ解析を行い、この分画で高発現する遺伝子を複数同定した。その中から、細胞増殖抑制に働き、さらにリガンドと阻害剤が入手可能な遺伝子を見出した。次に、in vivo 非臨床試験を行った。免疫不全マウス腹腔に 60As6 を移植し、1 週間後からドセタキセルを投与する腹膜再発抑制モデル (Fujita T, et al., Cancer Sci, in press) において、ドセタキセル単独投与群に比べ、前記阻害剤併用群において、予後や QOL の改善さらに微小転移抑制が認められた。その効果はリガンドの添加で失われた。また in vitro の実験では、リガンドは増殖を抑制し、阻害剤はその効果を打ち消した。ドセタキセルとの併用実験でも in vivo と同様の結果が得られた。本年 2 月に PTC 出願を行なった後、論文を投稿する予定である。実験結果のポンチ絵を下に添付するが、特許明細書 (特願 2012-29907) は来年 8 月まで公開されないので、リガンドを A、その受容体拮抗阻害剤を B と標記させて頂きたい。

内因性リガンド A の信号伝達阻害によるドセタキセルの未分化型胃癌の腹膜播種モデルマウスの延命効果の増強



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

二年次：

(英語雑誌論文) 胃がんに関するもの

1. 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*. S430-7, 2012.
2. Akiyoshi S, **Fukagawa T**, Ueo H, Ishibashi M, Takahashi Y, Fabbri M, Sasako M, Maehara Y, Mimori K, Mori M. Clinical significance of miR-144-ZFX axis in disseminated tumour cells in bone marrow in gastric cancer cases. *Br J Cancer*. 2012 Oct 9;107(8):1345-53. doi: 10.1038/bjc.2012.326. Epub 2012 Sep 6.
3. Kamata T, Suzuki H, Yoshinaga S, Nonaka S, **Fukagawa T**, Katai H, Taniguchi H, Kushima R, Oda I. localized gastric amyloidosis differentiated histologically from scirrhous gastric cancer using endoscopic mucosal resection: a case report. *J Med Case Rep*. 6: 231, 2012.
4. Deguchi Y, **Fukagawa T**, Morita S, Ohashi M, Saka M, Katai H. Identification of risk factors for esophagojejunal anastomotic leakage after gastric surgery. *World J Surg*. 36: 1617-1622, 2012.
5. Ishida M, Morita S, Saka M, **Fukagawa T**, Taniguchi H, Katai T. Metachronous liver metastasis from early gastric cancer. *J Gastrointest Surg*. 16: 837-841, 2012.
6. Fujita T, Yanagihara K, Takeshita F, Aoyagi K, Takigahira M, Chiwaki F, **Fukagawa T**, Katai H, Ochiya T, Sakamoto H, Konno H, Yoshida T, **Sasaki H**. Intraperitoneal delivery of a small interfering RNA targeting NEDD1 prolongs the survival of scirrhous gastric cancer model mice. *Cancer Sci*. 104: 214-222, 2013.
7. Satoh Y, Mori K, Kitano K, Kitayama J, Yokota H, **Sasaki H**, Uozaki H, Fukayama M, Seto M, Nagawa H, Yatomi Y, Takai D. Analysis for the combination expression of CK20, FABP1, and MUC2 is sensitive for the prediction of peritoneal recurrence in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 42: 148-152, 2012.
8. 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*. 19: 1902-1910, 2012.
9. Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Oda I, Taniguchi H, Koizumi F, Yanagihara K, **Sasaki H**, Nishio K, Yamada Y. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br J Cancer* 106: 727-732, 2012.
10. Sentani K, Oue N, Naito Y, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Uraoka N, Aoyagi K, **Sasaki H**, Yasui W. Upregulation of HOXA10 in gastric cancer with intestinal mucin phenotype: reduction during tumor progression and favorable prognosis. *Carcinogenesis* 33: 1081-1088, 2012.
11. Nishimura K, Semba S, Aoyagi K, **Sasaki H**, Yokozaki H. Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. *Pathobiology* 79: 290-306, 2012.
12. Suzuki M, Narita M, Hasegawa M, Furuta S, Kawamata T, Miyano K, Yanagihara K, Chiwaki F, Ochiya T, Suzuki T, Matoba M, **Sasaki H**, Uezono Y. Sensation of abdominal pain induced by peritoneal carcinomatosis is accompanied by changes in the expression of substance P and m-opioid receptors in the spinal cord of mice. *Anesthesiology* 117: 847-856, 2012.
13. Sakamoto N, Oue N, Sentani K, Anami K, Uraoka N, Naito Y, Oo HZ, Ohdan H, Yanagihara K, Aoyagi K, **Sasaki H**, Yasui W. Liver-intestine cadherin induction by epidermal growth factor receptor is associated with intestinal differentiation of gastric cancer. *Cancer Sci*. 103:1744-1750, 2012.
14. Naito Y, Oue N, Hinoi T, Sakamoto N, Sentani K, Ohdan H, Yanagihara K, **Sasaki H**, Yasui W. RegIV is a

direct target of intestinal transcription factor CDX2 in gastric cancer PLoS One 7(11): e47545, 2012.

(日本語雑誌論文) 胃がんに関するもの

1. 開腹胃癌手術における食道空腸吻合 **深川剛生**、大橋真記、森田信司、前田将宏、興田幸恵、片井均 臨床外科 67(12):1412-5, 2012.11
2. 胃癌肉腫の肉腫成分が大動脈内膜転移をきたした1例、塚原哲夫、森田信司、阪 眞、**深川剛生**、松原亜季子、片井均、日本臨床外科学会雑誌、73(7) : 1679-85. (2012.7)
3. 術式別解説 4 幽門側胃切除術、**深川剛生**、消化器外科 Nursing、17 (6) : 566-71. (2012.6)
4. 【進行胃癌治療の最前線】 進行癌に対するリンパ節郭清のエビデンス、**深川剛生**、日本外科学会雑誌、113(1) : 4-7. (2012.1)

(学会発表) 胃がんに関するもの

1. **深川剛生**、森田信司、大橋真記、前田将宏、興田幸恵、片井均 大動脈リンパ節郭清の変遷 第42回胃外科・術後障害研究会パネルディスカッション5, 2012年11月16日
2. **深川剛生**、片井均、森田信司、大橋真記、スキルス胃癌の治療戦略 第67回日本消化器外科学会 企画関連口演 2012年7月18日
3. **深川剛生** スキルス胃癌の治療戦略 要望演題口演 座長 第74回日本臨床外科学会総会 2012年12月1日
4. **深川剛生** ワークショップ: 微小転移(リンパ節、腹水、血液)の臨床的意義と臨床応用の可能性。座長 第84回日本胃癌学会総会、2012年2月9日
5. 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**、腹膜播種におけるびまん性胃癌幹細胞に対するTGF-betaの二元的機能、第71回日本癌学会、ワークショップ、2012.
6. 千脇史子、浜口哲弥、山田康秀、島田安博、柳原五吉、坂本裕美、吉田輝彦、**佐々木博己**、未分化胃がん患者腹水からの新規34がん細胞株および2マウス中皮細胞株の樹立、第71回日本癌学会、2012.
7. 小野弘恵、千原大、千脇史子、**佐々木博己**、坂本裕美、吉田輝彦、松尾恵太郎、佐伯宣久、胃がん・膀胱がん易罹患性関連遺伝子PSCA上のミスセンスSNPは胆のうがん細胞においてPSCAのがん抑制機能を減弱させる、第71回日本癌学会、2012.
8. 松本和子、荒尾徳三、浜口哲弥、島田安博、加藤健、小田一郎、谷口浩和、小泉史明、柳原五吉、**佐々木博己**、西尾和人、山田康秀、胃がんにおけるFGFR2遺伝子増幅の検討、第71回日本癌学会、ワークショップ、2012.
9. 市川寛、神田達夫、谷口浩和、畠山勝義、**佐々木博己**、近藤格、胃がんリンパ節転移に関わるタンパク質の同定、第71回日本癌学会、2012.
10. **佐々木博己**、体外診断薬としての発現解析型DNAチップ、第32回日本分子腫瘍マーカー研究会、特別企画、2012.

(書籍)

M. Sasako, **T. Fukagawa** Total Gastrectomy with D2 Lymph Node Dissection. Atlas of Advanced Operative Surgery. Vijay P. Khatri. 148-155, Elsevier 2012.

(知的財産権)

特許出願

発明の名称: 抗癌剤の作用を増強する医薬組成物、がん治療用キット、診断薬、及びスクリーニング方法

出願番号: 特願2012-29907

出願日: 平成24年2月14日

発明者: **佐々木博己**、上園保仁、鈴木雅美、長瀬博、鈴木勉、成田年

出願人: 独立行政法人国立がん研究センター

内容: 静止期のがん細胞を再増殖誘導し、抗がん剤の効果を高める方法と対象患者の診断法の発明

発明の名称: 抗癌剤の作用を増強する医薬組成物、がん治療用キット、診断薬、及びスクリーニング方法

出願番号: 特願2012-29907/PCT/JP2013/53522

出願日: 平成25年2月14日

発明者: **佐々木博己**、上園保仁、鈴木雅美、長瀬博、鈴木勉、成田年

出願人：独立行政法人国立がん研究センター

内容：静止期のがん細胞を再増殖誘導し、抗がん剤の効果を高める方法と対象患者の診断法の発明

(政策提言 (寄与した指針等))

平成 23-24 年厚生労働省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 委員として審査指標案を作成、平成 24 年に 11 月 20 日厚労省より公表 (薬食機発 1120 第 5 号) (佐々木博己)。

(その他)

1. 東南アジア胃がん手術ライブデモ・講演。ベトナム (ハノイ)、マレーシア (クアラルンプール)、タイ (バンコク)。2012 年 10 月 28-11 月 3 日
2. 第 63 回ウルグアイ外科学会招待講演 (ウルグアイ、モンテビデオ) 1. Splenectomy is needed for D2 total gastrectomy? 2. Paraaortic lymph node dissection for gastric cancer – Is it effective? 3. Neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer – Japanese standpoint (Therapeutic strategy for cytology positive gastric cancer- Is it cured?) 4. Junctional tumor – How is optimal lymph node dissection? 2012 年 11 月 23,4 日
3. 日本消化器病学会関東地方会市民講座 知っておきたい「がん」の知識。宇都宮 2012 年 10 月 6 日
4. 日本胃癌学会第 13 回市民講座 日本の胃がんの手術、外国の手術。松山 2012 年 11 月 10 日
5. 国際シンポジウム (サンクトペテルスブルグ) 講演/胃がん手術ライブデモ。2012 年 9 月 10-15 日。サンクトペテルスブルグ市がんセンター。
6. J&J セミナー講演 (東京)：胃全摘手術のリンパ節郭清。2012 年 9 月 8 日
7. 東南アジア胃がん手術ライブデモ・講演。ベトナム (ホーチミン)、マレーシア (クアラルンプール)、インドネシア (メダン) 2012 年 5 月 6-11 日。
8. 日本外科学会 (千葉) ブースセミナー：開腹胃がん手術における ENSEAL の使用経験。2012 年 4 月 12 日
9. J&J セミナー講演 (大阪)：胃がん手術リンパ節郭清の実際：開腹手術。2012 年 2 月 7 日
10. JICA セミナー講演 (東京)：Japanese Experience in Gastric Cancer Surgery and Western Outlook。2012 年 2 月 10 日