

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18390362
 研究課題名（和文） パラフィン包埋標本を用いた cDNA マイクロアレイの開発と臨床応用
 研究課題名（英文） Development and clinical application of cDNA microarray using formalin fixed paraffin embedded specimen

研究代表者

植竹 宏之（UETAKA HIROYUKI）
 東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・寄附講座教員
 研究者番号：60311651

研究成果の概要（和文）：抗癌剤感受性に関わる因子の分子生物学的検索において、マイクロアレイによる遺伝子発現解析は大変有用な方法である。本研究の目的はホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）標本から抽出した RNA を用いた cDNA マイクロアレイを開発することである。

研究成果の概要（英文）：Microarray technology is potentially a powerful approach to identify genes expression signatures that predict the effects of chemotherapeutic drugs. The aim of this study is to develop cDNA microarray using RNA isolated from laser-capture microdissected formalin fixed paraffin embedded (FFPE) specimens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸小腸肛門外科学

1. 研究開始当初の背景

我々はオーダーメイド治療の確立に向け、消化器癌の腫瘍内遺伝子発現量を RT-PCR 法を用いて半定量的に評価する方法を開発した。近年 cDNA microarray が開発されたことにより、一検体に対して一度に 15,000 種に及ぶ遺伝子発現の網羅的解析が可能となった（グローバルアプローチ）。しかし、凍結標本より汎用性の高い FFPE 標本を用いた cDNA microarray はい開発されてなか

った。その理由としては、パラフィン包埋標本からの RNA 抽出の困難さがもっとも大きな要因と思われる。我々は質・量とも定量的 RT-PCR 法を行なうに十分な RNA をパラフィンから抽出することに成功していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、パラフィン包埋標本を用いた cDNA microarray を開発し、より多くの症例の抗癌剤効果規定因子、予後予測因子、副作用予測因子をグローバルに解析す

ることにより、抗癌剤治療のテーラーメイド化を確立し一般化することである。

3. 研究の方法

(1) 胃癌・大腸癌切除標本 (FFPE) を用い、抗癌剤感受性予測因子と思われる遺伝子の発現検索を行う。Real-Time PCR 機器(7300リアルタイムPCRシステム(アプライドバイオシステム社))を購入し、遺伝子発現量を半定量法にて測定する。パラフィン標本からのRNA抽出については、Real-Time PCR法を行うに十分な量が、再現性を持って得られる方法を確立する。FFPE標本の癌細胞だけを打ち抜く Laser Capture Microdissection(LCM)法を併用し、癌細胞のみの遺伝子検索を行う。

(2) 上記の方法でFFPEから抽出したRNAについて、マイクロアレイ解析が可能であるかを検討する。マイクロアレイ解析を行うに十分な量と質のRNAをすべての標本において回収することを目的とする。RNA収量が不十分な検体に関してはT7増幅を試みているが、現在のところ再現性が得られていない。実験手法などを更に検討する。また、収量が十分であるにもかかわらずマイクロアレイ解析が行い得ない検体についてもRNAのQualityなどについて検討する。LCM法のマイクロアレイへの応用についても検討する。

(3) 胃癌、大腸癌のFFPE標本を用いて、上記の過程で確立されたRNA抽出とcDNAマイクロアレイ法で遺伝子発現を網羅的に解析し、抗癌剤感受性因子や予後因子を検索する。

4. 研究成果

(1) FFPE標本を用いたLCM+RT-PCR法による遺伝子解析
Nuclear Fast Red染色を用いることにより、RNAの質を保った状態でLCM+RT-PCRを行うことが可能であることが分かった。この方法で胃癌、大腸癌の抗癌剤感受性に関する遺伝子を解析し、腫瘍の癌部と間質で発現強度が異なることを示した(「業績、論文発表の雑誌」の2)

(2) FFPE標本を用いたcDNAマイクロアレイの開発

上記の方法で抽出したRNAを用い、cDNAマイクロアレイへの適応を検討した。T7増幅などを使ってcDNAマイクロアレイへの応用が可能となった。この方法を用いて胃癌化学療法を受けた患者の検体を分析し、化学療法の効果を予想するClusterわけが可能であることを示した(「業績、学会発表」の3)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件)

1. Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, Sugihara K, Mori M. Over-and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. Int J Oncol 34: 1069-1075, 2009
2. Makino H, Uetake H, Danenberg K, Danenberg PV, Sugihara K. Efficacy of laser capture microdissection plus RT-PCR technique in analyzing gene expression levels in human gastric cancer and colon cancer. BMC Cancer 8: 210-, 2008
3. Kolev Y, Uetake H, Takagi Y, Sugihara K. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: Association with hypoxia-inducible factor (HIF-1 alpha) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis Ann Surg Oncol 15: 2336-2344, 2008
4. Motoyama K, Inoue H, Nakamura Y, Uetake H, Sugihara K, and Mori M. Clinical Significance of High Mobility Group A2 in Human Gastric Cancer and Its Relationship to *let-7* MicroRNA Family. Clin Cancer Res 14: 2334-2340, 2008
5. Kobayashi H, Sugihara K, Uetake H, Higuchi T, Yasuno M, Enomoto M, Kuramochi H, Lenz HJ, Danenberg KD, Danenberg PV. Messenger RNA expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in primary colorectal cancer and corresponding liver metastasis. Ann Surg Oncol 15 1232-1238, 2008

6. 植竹宏之, 杉原健一. 【大腸癌治療の現在
化学療法と外科手術のコンビネーション】
病期(ステージ)と大腸癌術後補助化学療法
の適応. Pharma Medica 27.11 - 14,
2009
7. 植竹宏之, 石川敏昭, 杉原健一. 【大腸がん
化学療法の NEW STRATEGY】切除
不能進行・再発大腸がんに対する化学療法
大腸がん化学療法におけるペバシズ
マブの位置付けとその効果. Mebio 66-71,
2009
8. 石川敏昭, 植竹宏之, 杉原健一. 大腸
癌の発生から転移までのメカニズム.
薬局. 58 (5): 1855-1860,
2007
9. 石川敏昭, 植竹宏之, 杉原健一. コンセ
ンサス術後補助療法 大腸癌. コンセン
サス癌治療. 6 (2): 72-75, 2007
10. 植竹宏之, 石川敏昭, 杉原健一. 下
部消化管疾患における最近の話題 大腸癌
の化学療法の進歩と限界. 日本医師会雑
誌. 136 (3): 535-538, 2007
11. 植竹宏之, 石川敏昭, 杉原健一. 侵襲を
めぐる Q&A 血管新生 癌に対する血
管新生阻害薬の臨床効果について教えて
下さい (Q&A). Surgery Frontier. 14 (4):
463-465, 2007

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Hiroyuki Uetake, Toshiaki Ishikawa,
Hideki Ueno, Kenichi Sugihara, Naohiro
Tomita. Quantitative analysis of genes
using FFPE sample was dependent to
dilution of a formalin solution and
soaking duration: A report of the
SACURA Study Group. The 101st annual
meeting of AACR. Apr. 21, 2009. Denver,
Colorado, USA
2. Hiroyuki Uetake. Current status of

chemotherapy for CRC in Japan.
CURSO INTERNACIONAL DE
ENDOSCOPIA DIAGNOSTICA Y
TERAPEUTICA. 2009/8/27. Santiago,
Chile

3. Shinji Morita, Mikito Inokuchi, Hiroyuki Uetake, Andreas C. Hoffmann, Janine Cooc, Akiko Omori, Kenichi Sugihara, Kathleen D. Danenberg, Peter V. Danenberg¹ Molecular Signatures of Gastric Cancers Derived from Microarray Analysis of Paraffin-Embedded Specimens Predict the Degree of Response to CPT11/S-1 Chemotherapy. The annual meeting of ASCO. June. 1, 2008. Chicago, IL, USA
4. 植竹宏之, 石川敏昭, 光法雄介、有井滋樹、杉原健一. 大腸癌肝転移に対する Bevacizumab 併用化学療法後肝切除の有用性. 第 17 回 日本消化器関連学会週間. 2009/10/16 京都
5. 植竹宏之. 進行再発大腸がん化学療法の新たな治療戦略. 第 20 回日本消化器癌発生学会 総会 ランチョンセミナー 2009/11/27 広島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植竹 宏之 (UETAKA HIROYUKI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・
寄附講座教員

研究者番号：60311651

(2)研究分担者

杉原 健一 (SUGIHARA KENICHI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10171167

樋口 哲郎 (HIGUCHI TETURO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90334416

飯田 聡 (IIDA SATOSHI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20361694

石川 敏昭 (ISHIKAWA TOSIAKI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号：00422478

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号：