

平成21年 5月 7日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590568  
 研究課題名（和文） 消化器癌患者における血漿中核酸断片を用いた新規バイオマーカーの  
 開発と臨床応用  
 研究課題名（英文） Clinical application of circulating nucleic acids as new biomarkers  
 in patients with gastrointestinal cancers.  
 研究代表者  
 市川 大輔 (ICHIKAWA DAISUKE)  
 京都府立医科大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：20347446

## 研究成果の概要：

癌患者の末梢血液中に、腫瘍細胞が崩壊することによって放出される DNA や RNA 等の核酸が安定した状態で存在することが本研究で判明した。実際の胃癌や食道癌患者の末梢血液を用いた検討では、DNA の断片の濃度が健常者に比較して高濃度であることや、一部の患者において癌に特異的な異常分子の検出が可能であった。DNA の繰り返し配列を用いた検討や、検索 RNA を増やすことによって、感度や特異度が上がり、実地臨床に応用可能と思われた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：胃癌、食道癌、バイオマーカー、DNA断片、血漿

## 1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進歩により、癌における種々の遺伝子変化が明らかになってきている。これら得られた知見を利用した癌の分子診断の進歩は目覚しく、正常細胞と癌細胞における DNA 異常や RNA 発現の差異に着目した微量癌細胞の高感度診断法が盛んにおこなわれている。なかでも、腹水中微量癌細胞の検出、リンパ節の微小転移診断、担癌患者における血中の微量遊離癌細胞の検出など

は臨床応用されつつあるが、これらは全て体液・組織中に含まれる微量の癌細胞自体の検出であるため、必然的に極めて進行した症例が対象であった。一方、細胞の壊死やアポトーシスを介して、DNA断片のみならず、mRNAも比較的安定した状態で末梢血液中に存在することが明らかになってきている。

これら末梢中の遊離核酸は、以前から行われていた遊離癌細胞自体を検出する方法に比較して、癌の早期の段階で異常を検出でき

る新たなバイオマーカーの候補として注目を浴びていた。

また、担癌患者における血漿中遊離 DNA 断片の総濃度などが、健常人に比較して有意に高くなっている事実も、近年、肺癌や乳癌などで諸外国より報告されており、これら体液中の遊離核酸は、種々の分子生物学的検索から判明した新知見を実地臨床に応用するトランスレーショナルリサーチにおいて鍵となる分子であり、今後、癌の二次予防の観点から重要な癌の早期診断学の領域においては注目すべき検索対象として認識されていた。

## 2. 研究の目的

食道癌・胃癌・大腸癌などの消化器癌患者の原発巣及び再発病巣に対する高感度診断系の確立と、新規抗癌剤感受性試験の開発を目的に、(1) 担癌患者血漿中の癌細胞に特異的な DNA メチレーション異常の検出に加え、(2) 癌細胞特異的 mRNA の検出、(3) 遊離 DNA 断片の総濃度ならびに DNA 断片中の“長さ”比 (Integrity) などを解析し、種々の臨床病理学的因子との比較から、実地臨床に極めて有用な、全く新しい概念のバイオマーカーの開発を試みる。

## 3. 研究の方法

血液採取は、手術時皮膚切開前に行い、3 回の遠心分離により細胞成分の混入を防ぎ、得られた血漿成分より Cell-free genomic DNA 断片及び Cell-free mRNA の抽出を行った。

(1) 同抽出核酸を用いて、血液中の遊離 mRNA の安定性の確認を目的として、Real-time PCR 法を用いて GUSmRNA の検出を試みた。(2) 癌細胞に特異的な異常として、胃癌患者における hTERTmRNA、MUC1mRNA、cMETmRNA、食道癌患者における WT1mRNA の検出を試み、更に (3) beta-actin

上 102bp fragment (総濃度) と 253bp fragment (long DNA fragment 濃度) の検出も試みた。

これらの結果と臨床病理学的因子との比較検討から、同手法の臨床診断としての有用性を検討した。

また、長い fragment の DNA 断片の定量による検討や、LINE などの繰り返し配列を用いた解析によって、より高い感度ならびに特異度を併せもった解析手法の開発を試みた。

一方で、これら手法による解析を、手術や化学療法など治療前後のサンプルに行うことによって、治療効果判定手法としての有用性についても検討を加えた。

## 4. 研究成果

(1) Cell-free plasma mRNA の定量：健常人の末梢血液中遊離 GUSmRNA の解析結果から、細胞から壊死やアポトーシスを介して放出された mRNA が DNA 断片同様、比較的安定した状態で循環血中に存在することが判明した。

(2) ①胃癌患者の 15%において hTERTmRNA や MUC1mRNA が検出されたが、一方、健常人サンプルの解析ではこれら異常は検出されなかった。しかし、cMETmRNA については、胃癌患者での異常検出症例も認めたが、一方で、健常人でも 10%程度の検出例が認められることも判明し、同分子については癌のスクリーニング目的のバイオマーカーとしては、不适当であることも判明した。②食道癌患者の WT1mRNA の検出では、健常人に比して有意に高値であることを確認し、Receiver Operating Curve 曲線解析における AUC が 0.73 であった。臨床病理学的因子と同結果との比較検討では、組織型と同濃度との間の相関も示唆され、今後の更なる多症例での解析を試みる必要があると思われた。

(3) Cell-free DNA fragment 濃度定量、DNA integrity 解析：①まず、beta-actin 上に設計した 102bp の短い断片と、253bp の長い断片の標準コントロールにおける定量解析を行い、両断片解析における再現性を確認することによって、低濃度でも十分な解析能を持つと判断した。②同解析を用いて行った血漿中遊離 DNA 断片解析において、食道癌・胃癌患者共に血中 DNA 断片が健常人に比較して有意に高値であることが判明した。253bp の DNA long fragment の定量において、健常者との差がより顕著であった (ROC 曲線解析 AUC 食道癌 0.91、胃癌 0.75)。③癌組織中の壊死由来 DNA 断片のみを特異的に検出する試みで、500bp 以上の fragment の検出をリアルタイム PCR にて試みたが、今回の検討で用いた beta-actin 上の DNA 断片では、感度や再現性に問題があり、今後の更なる高感度診断系の確立を要する結果であった。④LINE などの DNA 繰り返し配列を用いた解析では、従来の  $\beta$  actin などの配列を利用した解析に比較して、極めて高い感度が確認され、また再現性の点でも従来の方法に比較して優れた結果であった。同手法を用いた解析では、600~700bp 程度の断片濃度の解析も可能であり、今後、更に症例を重ねることによって、同手法の担癌患者スクリーニング法としての有用性を検討する必要があると思われる。⑤治療前後の解析結果の比較によって、DNA 断片濃度の低下症例と非低下症例が存在することが判明し、今後、これらの症例の生命予後などを解析していくことによって、同解析法の予後判定法としての有用性も検討していく予定である。

#### 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 8 件)

①Otsuji E, Ichikawa D, et al. (他 5 名, 3 番目): Efficacy of prophylactic extended lymphadenectomy with gastrectomy for patients with node-negative advanced gastric carcinoma. *Hepato-gastroenterol*, 55;755-759(2008) 査読有

②Komatsu S, Ichikawa D, et al. (他 6 名, 4 番目): Long-term complete response of multiple hepatic metastases from carcinoma of the papilla of Vater intrahepatic infusion of 5FU with low-dose cisplatin following pancreaticoduodenectomy. *Int J Clin Oncol* 13;567-570(2008) 査読有

③Sai S, Ichikawa D, et al. (他 8 名, 2 番目): Quantification of plasma cell-free DNA in patients with gastric cancer. *Anticancer Res*, 27;2747-2751(2007) 査読有

④Tomita H, Ichikawa D, et al. (他 9 名, 2 番目): Quantification of circulating plasma DNA fragments as tumor markers in patients with esophageal cancer. *Anticancer Res*, 27;2737-2741(2007) 査読有

⑤Ikoma H, Ichikawa D, et al. (他 8 名, 2 番目): Clinical application of methylation specific-polymerase chain reaction in serum of patients with gastric cancer. *Hepato-gastroenterol*, 54;946-950(2007) 査読有

⑥Tani N, Ichikawa D, et al. (他 11 名, 2 番目): Circulating cell-free mRNA in plasma as a tumor marker for patients with primary and recurrent gastric cancer. *Anticancer Res*, 27;1207-1212(2007) 査読有

⑦Ikoma D, Ichikawa D, et al. (他 8 名, 2 番目): Circulating tumor cells and aberrant methylation as tumor markers in patients with esophageal cancer. *Anticancer Res*,

27:535-539(2007)査読有

⑧富田晴久、市川大輔、他(他16名,2番目):  
癌存在診断法としての食道癌・胃癌患者にお  
ける Circulating DNA 断片定量解析の検討  
癌と化学療法, 34:1908-1910(2007)査読無

[学会発表](計 3件)

①市川大輔他:末梢血液中の核酸バイオマ  
ーカーを用いた癌存在診断の現状と展望.第46  
回日本癌治療学会総会 2008年11月 名古屋

②市川大輔他:消化器癌における血中遊離癌  
細胞の臨床的意義.第108回日本外科学会総  
会 2008年5月 長崎

③市川大輔他:胃癌患者末梢血液中の遊離核  
酸を用いた新たなバイオマーカー有用性の  
検討.第66回日本癌学会総会 2007年10月  
横浜

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

市川 大輔 (ICHIKAWA DAISUKE)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号:20347446