

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790941  
 研究課題名（和文） 臨床診断用 DNA チップを用いた食道癌に対する  
 化学療法感受性予測システムの構築  
 研究課題名（英文） construction of prediction system for the response to chemotherapy  
 for esophageal cancer using custom DNA chip  
 研究代表者  
 山崎 誠（YAMASAKI MAKOTO）  
 大阪大学・医学系研究科・助教  
 研究者番号：50444518

研究成果の概要：ヒト全遺伝子型 DNA チップによる網羅的遺伝子発現解析により、食道癌の化学療法の感受性に関わる遺伝子を約 20 遺伝子見出した。その結果を基に、現在最も汎用されている定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析で、未知の食道癌症例に対する検証を行い、約 70%程度の正診率で化学療法に対する感受性を予測診断することが可能であり、現在前向きな症例に対する検証を継続しているところである。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

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：食道癌、抗がん剤感受性、予測診断、遺伝子発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 食道癌は、本邦において年間約 15,000 人が罹患し、そのうち約 3/4 が癌死している難治性の癌腫である。特にリンパ節転移を伴った食道癌は、手術により根治切除がなされても再発率が高く未だ予後不良である。このことは、リンパ節転移を有する症例では手術の時点ですでに微小の転移が存在していることを示唆している。そこで、リンパ節転移を疑う症例には、この微小転移の制御を目的として、外科治療に加えて化学療法を併用して、予後の改善を図る施設が増加して

きている。近年では、食道癌に対する術前化学療法の有用性を示す報告がされており、JCOG でも大規模臨床試験が開始され、今後食道癌に対する化学療法の重要性は増していくと考えられた。しかしながら、化学療法に対する効果予測をできないのが現状であり、治療前に予測診断することは、個々の症例に応じた適正な治療をするうえで極めて重要である。

- (2) 癌医療は、ヒトゲノムの解読完了に伴いこれまでの生命科学の集大成を土台に大きな革新を迎えようとしている。これら分子生物学的研究の急速な進歩により、癌医療

は、臨床病理学的なエビデンスと体系的なゲノム解析を比較対照することによって、生物学的特性を反映した個別化医療の確立が求められるようになってきた。特に DNA チップを代表とする遺伝子発現解析は、様々な成果を挙げ、臨床応用が最も期待される手法である。

しかし、これらの報告の多くはいまだ基礎的研究段階にあり、即時的に臨床応用できるものは見られない

## 2. 研究の目的

(1) 食道癌治療前のサンプルによるヒト全遺伝子型 DNA チップによる網羅的遺伝子発現解析の結果を用いて、臨床応用に向けた食道癌に対する化学療法感受性予測システムを確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 内視鏡下生検サンプルを用いた遺伝子発現解析の妥当性の検討

内視鏡下生検サンプルを腫瘍の複数箇所から採取し、および RNA の抽出を行う。それぞれの生検サンプルにおいて網羅的遺伝子発現解析を行う。

25 例の症例において本実験を施行し、遺伝子発現解析が行えるか？

同一サンプルでの遺伝子発現プロファイルはサンプリング部位によって異なるのか？

その違いは感受性予測診断を行ううえで、支障をきたすか？

という点について検討する。

(2) 予測診断システムの構築

すでに化学療法の感受性の判明している症例 25 例を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行う。

この遺伝子発現プロファイル解析により化学療法感受性に関与する遺伝子群の同定を行い、予測診断モデルを構築する。

(3) 予測診断システムの検証

新規の症例に対して、網羅的遺伝子発現解析を行う。これら新規の症例に対して、上記の予測診断モデルに適用させ、遺伝子発現プロファイルによる化学療法感受性診断を行う。

これらの新規症例の化学療法に対する効果判定を行うまでは、予測診断の結果を伏せておき、効果判定の結果と照合し、診断能の精度を検証する。

(4) 他 assay 系による遺伝子発現の検証  
現在最も汎用されている遺伝子発現解析方

法である定量 RT-PCR を用いて、蒸気に示す化学療法感受性に関わるとして抽出された遺伝子の発現を解析する。

網羅的遺伝子発現解析の結果との相関を検討するため、上記に示す 25 例の食道癌症例に対しての検証を行う。

(5) 早期に実現可能な assay による予測診断システム構築の可能性

DNA チップによる遺伝子発現解析は多数の遺伝子発現の解析には非常にロバストであるが、現時点では実験の煩雑さ、高コストであることから、早期の臨床応用という点では、まだ解決しなければいけない問題がある

そこで、先程の定量 RT-PCR 法を用いて、化学療法感受性に関わる遺伝子の発現の相関を検証していくと同時に、定量 RT-PCR による感受性予測診断も同時に行う。

(6) 新規化学療法感受性関連遺伝子の同定

化学療法耐性を示した症例全てではないが、一部の症例で突出して遺伝子発現に変化のある遺伝子を biclustering 法を用いて抽出する。

ここで抽出された遺伝子を用いて、決定木 (decision tree) による化学療法耐性症例の選別を行い、耐性予測診断の可能性を検討する

## 4. 研究成果

(1) 25 例の化学療法前の生検サンプルを用いたヒト全遺伝子型 DNA チップによる網羅的遺伝子発現解析の結果を用いて、化学療法の感受性に関わる遺伝子群の同定を行った。感受性群・非感受性群のそれぞれ 2 群において発現が異なる遺伝子を 1 万回の permutation 法を用いて順位付けした。この順位に基づいて判別式: weighted-vote 法、精度評価: leave-one-out 法による感受性予測診断を行ったところ、上位 10 ~ 200 遺伝子での診断性能が最も高く約 80% の診断精度であり、かつ安定した診断能力を有していた。

さらに新たに採取した 10 例の食道癌症例に対して、網羅的遺伝子発現解析を行った。これらの症例に対して、先程順位付けした遺伝子を用いて、化学療法感受性予測診断を行ったところ、199 遺伝子を用いた遺伝子発現プロファイルにより 80% の正診率で感受性を予測診断することが可能であった。

以上の結果は、下記に示す学会により本告らによって発表され、現在 International Journal of Oncology に論文投稿中である。

(2) 上記 25 例の全ての症例について、生検サンプルを 2 個採取し、それらを別に網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、全ての生検サンプルにおいて、網羅的遺伝子発現解析可能な RNA 量および RNA quality を有していた。また、同一症例における遺伝子発現パターンは、採取部位の違いにもかかわらず極めて類似しており、症例間での発現パターンの違いは、症例内での発現パターンの違いよりもはるかに大きなものであった。以上のことより、単一の生検サンプルにより予測診断は可能であり、かつそのデータの信頼性は極めて高いと考えられた。

この結果により現実的に臨床現場で可能なサンプル採取量からの解析が可能であることも明らかになり、臨床応用に向けた大きな進歩である。

以上のデータは International Journal of Oncology に掲載される予定である(in press)

(3) 上位の 200 遺伝子の中からプライマーの設計が可能な遺伝子を、無作為に 17 遺伝子を選択し、定量的 RT-PCR を行った。先程用いた 25 例の生検サンプルにより PCR と DNA チップのデータの相関、および化学療法の感受性予測診断能を検討したところ、17 遺伝子のうち 7 遺伝子において高い発現データの相関を有していた。これら 7 遺伝子での診断能力は DNA チップで得られた 80% の診断能力とほぼ同等であった。

このことにより、遺伝子増幅による発現量の測定と競合ハイブリダイゼーションによる発現量の測定という、異なる測定法では必ずしも同様の結果を得ることができないという問題点が明らかになった。しかしながら、異なる測定法においてもデータの相関を得ることのできた遺伝子においては、発現量データの信頼性が高いのみならず、異なる測定方法においても予測診断ができる可能性を示唆していると考えられた。

次いで、新規の食道癌生検サンプル 10 例を用いた 7 遺伝子の発現パターンによる予測診断能も 70% 程度の結果が得られた。このように異なる解析方法においても、同様な結果を得ることができ、本解析法の信頼性を検証することができたと同時に、DNA チップに比べ、現時点で汎用性の高い手法での予測診断の可能性を示唆することができた。

(4) 新たにサンプリングした化学療法前の生検サンプル 20 例につき、RT-PCR による化学療法感受性予測診断を行ったところ、70% 程度の正診率で感受性を診断することが可能であった。前向き症例での検証実験でも同様な結果を得ることができており、これらは

これまで食道癌治療において、できなかった化学療法感受性に基ついた個別化医療の推進に大きな一歩となりえると考えられる。

(5) 化学療法の効果を認めなかった症例全てではないが、一部の症例で突出して遺伝子発現に変化のある症例を biclustering 法を用いて、約 20 遺伝子抽出した。この解析方法により化学療法の効果を認めなかった症例のうち、1 例ないし 2 例だけに特異的に発現の上昇する遺伝子が同定され、化学療法耐性に関するメカニズムの一端を担っていると考えられた。また、ここで同定された遺伝子同士の関連性を現在解析中である。

同定された遺伝子の発現を用いて決定木による化学療法耐性診断を行ったところ、すべての化学療法の効果を認めなかった症例において、いずれかの遺伝子発現異常を認めた。検証用の 10 症例で同様に解析を行ったところ、化学療法の効果を認めなかった 10 例のうち 7 例で正しく診断が可能であった。

また、定量 RT-PCR で 20 遺伝子の発現を検証したところ、DNA チップと定量 RT-PCR の発現パターンは極めてよく相関していた。さらに新規の症例での検証実験を開始する予定である。

この結果は、牧野らにより学会発表された。

また、ここで抽出されてきた遺伝子は、化学療法に対する耐性のメカニズムに大きく関与すると考えられる。そこで、これらの遺伝子発現と化学療法感受性や予後との相関、さらには遺伝子発現の制御によるがん細胞の増殖能、薬物に対する感受性の変化など in vitro での検証をおこなっているところである。

ここで抽出された遺伝子のうち CK18 という分子については、現在 British Journal of Cancer に論文投稿中である。

## 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 1 件)

Masaaki Motoori, Ichiro Takemasa, Makoto Yamasaki, Takamichi Komori, Atsushi Takeno, Hiroshi Miyata, Shuji Takiguchi, Yoshiyuki Fujiwara, Takushi Yasuda, Masahiko Yano, Nariaki Matsuura, Kenichi Matsubara,

Morito Monden, Masaki Mori, Yuichiro Doki.: The feasibility of using biopsy samples from esophageal cancer for comprehensive gene expression profiling.; International Journal of Oncology.:有.:in press

〔学会発表〕(計5件)

Atsushi Takeno et.al.: Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in ESCC (esophageal squamous cell carcinoma) using endoscopic biopsies.:The 11th World Congress of the ISDE、September 10-13 2008.:(Budapest, Hungary)

牧野知紀他.:食道癌感受性予測における common pathway と specific pathway よりのアプローチ.:第62回日本食道学会学術集会.:2008.6.21.(東京)

本告正明他、食道癌生検標本を用いた化学療法の効果予測-臨床応用に向けて-.:第62回日本消化器外科学会定期学術総会.:2007.7.18.(東京)

本告正明他、食道癌生検標本を用いた化学療法の効果予測-臨床応用に向けて-.:第61回日本食道学会学術集会.:2007.6.22.(横浜)

本告正明他、食道癌生検標本を用いた網羅的遺伝子発現解析の妥当性の検討と化学療法(FAP)の効果予測.:第107回日本外科学会学術集会.:2007.4.12.(大阪)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 誠 (YAMASAKI MAKOTO)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号:50444518

(2)研究分担者

(3)連携研究者