

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19790959

研究課題名（和文）膵臓癌における DNA アレイを用いた抗癌剤感受性の遺伝子学的検討

研究課題名（英文） Gene expressions associated to chemosensitivity in pancreatic cancer patients

研究代表者

倉持 英和（KURAMOCHI HIDEKAZU）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：30287362

研究成果の概要（和文）：マイクロアレイを用いたパラフィンサンプルからの遺伝子網羅的測定は成功しなかったため real-time RT-PCR を用いた遺伝子定量に切り替え、膵臓癌治癒切除症例 81 例を対象に、術後補助化学療法として Gemcitabine 単独療法または S-1 単独療法が施行された症例の手術検体における mRNA 発現量と予後の関係をレトロスペクティブに検討した。その結果、5-FU の分解酵素である DPD と葉酸代謝関連酵素である DHFR、FPGS、GGH が予後因子であることが見出された。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the gene expression levels associated with chemosensitivity in 81 pancreatic cancer patients after complete resection using real-time PCR. DPD, DHFR, FPGS, and GGH were found to be biomarkers of survival in those patients. We verified the function of those genes *in vitro* experiments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：膵臓癌、化学療法、S-1、Gemcitabine、DNA マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

長い間膵臓癌は化学療法抵抗性であると言われてきたが、近年膵臓癌に効果があるとされる新薬が相次いで承認された。Gemcitabine（ジェムザール）は5-FUとの比較大規模第三相試験で有意な予後の延長と患者の自覚症状の改善

を認められ現在世界的に膵臓癌に対する第一選択薬となっており、さらにTS-1も2006年に保険承認された。しかしいずれの薬剤に対しても薬剤感受性を規定する有用なバイオマーカーはない状況であった。教室では1999年からは学内倫理委員会（IRB）の承認のもと、膵

癌のみならず各種消化器癌患者の血液や切除標本、内視鏡生検やCT下穿刺生検標本の保存を開始し、臨床データとの相関をもとに薬剤感受性に関与するバイオマーカーの探索を続け多くの成果をあげてきた。膵臓癌についても5-FU代謝関連遺伝子であるDPD 遺伝子のm-RNA 発現レベルが薬剤感受性に関与していることを明らかにし、化学療法前のDPD発現レベルで症例を選択することにより無効例を排除できる可能性を報告したが、治療成績の向上のためにはより選択性の強い新たな指標が必要であった。

2. 研究の目的

GemcitabineとTS-1のそれぞれの化学療法症例の遺伝子発現プロファイルを比較し網羅的探索によりそれぞれの薬剤感受性予測に有用な指標となる遺伝子群の抽出をすることを目的としDNAマイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行う予定であった。

3. 研究の方法

(1) DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析

我々はいままでに胃癌、大腸癌などにおいてパラフィン包埋サンプル検体を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現測定を行ってきた。今回その方法論を膵臓癌においても用いたが結果的には成功しなかった。マイクロアレイのために必要十分なQualityを持ったRNAの抽出に成功しなかったことがその理由である。原因の推察として、膵臓癌の検体は繊維質に富み、癌細胞が集合して存在せず繊維の中にばらばらに存在するため、十分量の細胞数が採取できなかった。また他癌腫に比べ疾患の頻度が少ないため、症例数を確保するために、比較的古いサンプルまで検討に加えたが、古いサンプルではRNAの変性の度合いが強く、比較的長鎖のRNAを必要とするマイクロアレイでは質のよいRNAを抽出できなかったことも原因と考えられる。そのため方針を変更しReal-time RT-PCRを用いた遺伝子発現測定を行うこととした。

(2) Real-time PCRによる遺伝子発現測定

この方法では比較的少量の、変性の進んだRNAからでも測定が可能であった。測定遺伝子は抗癌剤Gemcitabineの感受性に関連するといわれる遺伝子、フッカピリミジン系薬剤関連遺伝子、葉酸関連遺伝子を10種類選択した。膵臓癌の手術検体のパラフィン包埋サンプルからFFPE RNA Extraction Kitを用いてt-RNAを抽出し、逆転写反応を用いてcDNAに変換。Taqman PCR (ABI 7900)を用いて遺伝子発現量を定量した。内部標準遺伝子にはGAPDHを用いた。

4. 研究成果

これまで我々は膵臓癌治療切除症例 81 例を対象に、術後補助化学療法としてGemcitabine 単独療法またはS-1 単独療法が施行された症例の手術検体における mRNA 発現量と予後の関係をレトロスペクティブに検討した。その結果、5-FU の分解酵素であるDPD と葉酸代謝関連酵素であるDHFR、FPGS、GGH が予後因子であることが見出された。さらに、S-1 が術後補助化学療法として実施された症例においてはGGHが高い症例で予後不良であった。GGHはFPGSによってグルタメート化されたグルタミン酸の切断を行う酵素であり、GGHが高い細胞においては葉酸が細胞外に排泄されやすくなる。よって、膵臓癌症例においてもLeucovorin(LV)を付加することにより5-FUの効果増強作用が期待され、新たな治療法としての可能性が見出された。そこで我々は、葉酸併用による抗腫瘍効果への影響を検討するために、膵臓癌細胞株(PANC-1、MIA-Paca2)を用いて薬剤感受性試験を施行した。その結果、MIA-Paca2において5-FUにLVを併用することにより抗腫瘍効果が4.9倍増強することが確認された。さらに、これら2種類の細胞株について葉酸代謝関連酵素および5-FU代謝関連酵素のmRNA発現量を測定した結果、FPGSおよびDPDの発現量は高く、一方GGHの発現量は低い傾向が

示された。よって膵臓癌の細胞内では葉酸量が低く、5-FU も分解されやすい可能性が示唆された。

以上の結果から、膵臓癌では DPD 作用の抑制および 5-FU へ葉酸を併用する化学療法が抗腫瘍効果増強作用に重要である可能性が in vitro の実験により示された。

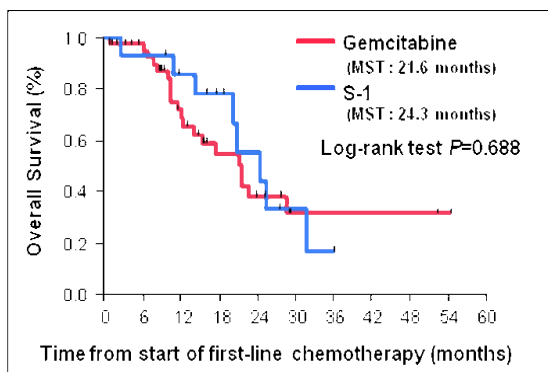


Fig.1
Kaplan-Meier plot for overall survival of adjuvant chemotherapy

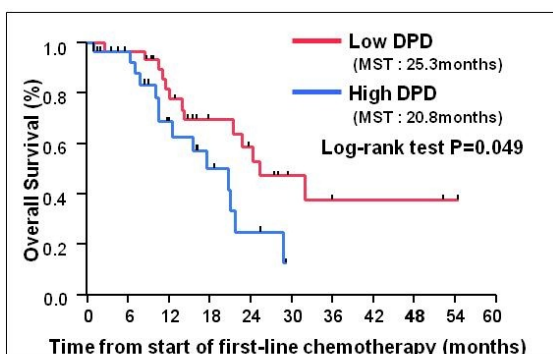


Fig.2
Kaplan-Meier plot for overall survival of adjuvant chemotherapy according to DPD

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 13 件)

1. Kuramochi H, Hayashi K, Nakajima G, et al. (他 4 名、1 番目) Epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels and protein expression levels in primary colorectal cancer and corresponding liver metastases. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010 Apr;65(5):825-31. 査読あり

2. Kuramochi H, Uchida K, Peters JH et al. (他 5 名、1 番目) Loss of heterozygosity at thymidylate synthase locus in Barrett's metaplasia, dysplasia, and carcinoma sequences. *BMC Cancer.* 2009 May 21;9:157 査読あり

3. Sakuyama R, Aruga A, Kuramochi H, 他 4 名、3 番目) [The analysis of CCR4+/CXCR3+ cell ratio in gastrointestinal cancer patients receiving chemotherapy or immunotherapy] *Gan To Kagaku Ryoho.* 2008 Nov;35(12):2259-61. 査読あり

4. Oh DS, DeMeester SR, Dunst CM, , Kuramochi H et al. (他 8 名、6 番目) Validation of a rodent model of Barrett's esophagus using quantitative gene expression profiling. *Surg Endosc.* 2009 Jun;23(6):1346-52. 査読あり

5. Uchida K, Hayashi K, Kuramochi H, et al. (他 2 名、3 番目) [Three cases of stomatitis caused by chemotherapy for gastrointestinal cancer that responded well to lafutidine] *Gan To Kagaku Ryoho.* 2008 Aug;35(8):1435-8. 査読あり

6. Kamikozuru H, Kuramochi H, Hayashi K (他 2 名、2 番目) ERCC1 codon 118 polymorphism is a useful prognostic marker in patients with pancreatic cancer treated with platinum-based chemotherapy. *Int J Oncol.* 2008 May;32(5):1091-6. 査読あり

7 Kuramochi H, Hayashi K, Uchida K et al. (他 6 名、1 番目) High intratumoral dihydropyrimidine dehydrogenase .A levels in pancreatic cancer associated with a high rate of response to S-1.Cancer Chemother Pharmacol. 2008 Dec;63(1):85-9. 査読あり

8. Kobayashi H, Sugihara K, Kuramochi H, (他 7 名、6 番目) Messenger RNA expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in primary colorectal cancer and corresponding liver metastasis. Ann Surg Oncol. 2008 Apr;15(4):1232-8. 査読あり

9. Kuramochi H, Tanaka K, Oh D et al. (他 8 名、1 番目), Thymidylate synthase polymorphisms and mRNA expression are independent chemotherapy predictive markers in esophageal adenocarcinoma patients. Int J Oncol. 2008 Jan;32(1):201-8 査読あり

10. Vallböhmer D, Marjoram P, Kuramochi H et al. (他 9 名、3 番目) Towards the molecular characterization of disease: comparison of molecular and histological analysis of esophageal epithelia. J Gastrointest Surg. 2007 Sep;11(9):1095-104 査読あり

11. Vallböhmer D, Yang DY, Kuramochi H, (他 6 名、3 番目) DPD is a molecular determinant of capecitabine efficacy in colorectal cancer. Int J Oncol. 2007 Aug;31(2):413-8. 査読あり

12. Oh DS, DeMeester SR, Kuramochi H (他 8 名、5 番目) Reduction of interleukin 8 gene expression in reflux esophagitis and Barrett's esophagus with antireflux surgery. Arch Surg. 2007 Jun;142(6):554-9 査読あり

13. Uchida K, Hayashi K, Kuramochi H, (他 3 名、3 番目) Combination therapy of S-1 and CDDP for patients with colorectal cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2007 Nov;133(11):841-6. 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 倉持英和ほか、S-1+I-OHP 療法を施行した大腸癌症例における ERCC1 多型の感受性マーカーとしての有用性。第 47 回日本癌治療学会総会口演。2009.10.22 ~ 24、横浜
2. H. Kuramochi, K. Hayashi, G. Nakajima, H. Kamikozuru, M. Yamamoto. Evaluation of thymidylate synthase and ERCC1 mRNA levels as predictive markers in colorectal cancer patients treated with S-1 and oxaliplatin. 2009 ASCO Annual Meeting Abstract No.15071, May 29 through June 2 Orlando, USA
3. H. Kuramochi, K. Hayashi, H. Kamikozuru, G. Nakajima, T. Hatori, M. Yamamoto. High intratumoral Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) mRNA levels in pancreatic cancer associated with a high rate of response to S-1 IPRF Forum 2009, March 28, Tokyo, Japan
4. A. Nakamura, H. Kuramochi. Correlation of folate-metabolizing enzymes with the outcomes of patients treated with gemcitabine or S-1 for adjuvant chemotherapy of advanced pancreatic cancer. AACR meeting 2009 April 18-22, Denver, USA
5. 倉持英和ほか、進行再発大腸癌に対する S-1+オキサリプラチン併用療法 (SOX 療法) の第一相試験。第 46 回日本癌治療学会総会口演 2008.10.30 ~ 11.1, 名古屋

6. 倉持英和ほか、大腸癌原発巣と肝転移巣における EGFR mRNA 発現レベルと蛋白発現との関連性の検討。第 63 回日本消化器外科学会総会口演 2008.7.16～18, 札幌
7. H. Kuramochi, K. Hayashi, G. Nakajima, K. D. Danenberg, P. V. Danenberg, M. Yamamoto The relationship between epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels and protein expression in primary colorectal cancer and corresponding liver metastases. 2008 ASCO Annual Meeting Abstract No.15021, May 30-June 3, Chicago, USA
8. 倉持英和ほか、Thymidylate Synthase (TS) 遺伝子多型と遺伝子発現の食道腺癌患者における化学療法感受性マーカーとしての有用性の検討。第 6 回日本臨床腫瘍学会口演.2008.3.20～21, 福岡
9. 倉持英和ほか、大腸癌原発巣と肝転移巣における Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) の遺伝子発現量の検討。第 62 回日本消化器外科学会総会口演 2007.7.18～20, 東京
10. H. Kuramochi, K. Hayashi, K. Uchida, M. Yamamoto, K. D. Danenberg, P. V. Danenberg .Epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA expression levels are strongly correlated between primary colorectal cancer and corresponding liver metastases. 2007 ASCO Annual Meeting No.4106, June 1-5 Chicago, USA

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者

倉持 英和 (KURAMOCHI HIDEKAZU)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：30287362

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし