

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20591558

研究課題名(和文) 消化器癌の血清遊離DNA断片を標的とした新しい悪性度診断法の基礎的臨床的検討

研究課題名(英文) Basic and clinical study of new diagnostic method for gastrointestinal cancer using the ratio of free DNA fragments in the serum

研究代表者

小澤 壯治 (OZAWA SOJI)

研究者番号：10169287

研究成果の概要(和文)：基礎研究では、ヒト大腸癌移植ヌードマウスモデルを用いて、消化器癌における「遊離DNA断片の長鎖と短鎖の比」に関して検討した。血清中に存在する「遊離DNA断片の比率」はマウスにおける化学療法の効果判定に有用であることが明らかとなった。臨床研究では、大腸癌患者の血清中に存在する「遊離DNA断片の比率」と臨床腫瘍学的因子との関連性を検討した。「遊離DNA断片の比率」は、癌・非癌の鑑別に有用であり、CEAやCA19-9よりも診断能が高いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to analyze in the serum of nude mice that were implanted colorectal cancer cells and in the serum of colorectal cancer patients using Alu DNA sequences (Alu247 and Alu115) and to reveal whether Alu247/Alu115 ratio (Alu ratio) is related to outcome of treatments and to clinical-oncological factors. We concluded that the Alu ratio might be useful for predicting effects of chemotherapy and for discriminating between cancer and non-cancer. The Alu ratio was considered to have a higher discriminatory ability for diagnosing cancer than the CEA and CA19-9 tumor marker levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：消化器癌、DNA断片、悪性度診断法

1. 研究開始当初の背景

近年、消化器癌に対する治療として悪性度に応じたテーラーメイド治療が注目されている。日常臨床では画像診断法や血液腫瘍マーカーなどにより進行度診断や治療効果判定が行われているが、癌細胞レベルの異常を検出する方法は従来の診断法とは異なった情報が得られるので今後の発展が期待されている。

これまで我々は分子生物学的な手法を用いて、食道癌では臓器転移には cyclinD1 遺伝子異常が関与し、リンパ節転移には EGFR 遺伝子異常、p16 遺伝子異常、VEGF 発現が関与することを報告してきた。これらは優れた悪性度診断法となり得るが、切除材料ないし生検材料を用いた検査手法であるため組織の採取が必須条件という制限があった。末梢血液を検体とする手法は簡便であるが、食

道癌の代表的な血液腫瘍マーカーである SCC は、陽性率が低く感度不良であるため一部の進行癌でのみ有用であった。そこで、細胞の不死化に関連する telomerase 活性に着目して、末梢血液の非リンパ球成分を用いた血行性転移診断の可能性について検討し、画像診断前に血行性転移を診断予測する方法を確立した。この telomerase 活性による診断法は、癌細胞自体が末梢血液中に存在することを検出する方法であり、進行度診断や治療効果判定には不十分であった。

食道癌に限らず消化器癌の進行度診断や治療効果判定に広く利用できる方法が必要と考え、検査材料採取が簡便な方法として末梢血液に着目した。末梢血液の血漿や血清中には細胞由来の DNA 断片が存在する。健常人では組織のアポトーシスにより DNA 断片が末梢血液中に流出し、その長さは 160-200bp である。一方、悪性腫瘍患者では腫瘍の進展過程で細胞壊死を伴うために、末梢血液に流出する遊離 DNA 断片が長くなり、200bp 以上の長鎖となる。実際、膵臓癌患者の血清中には健常人よりも長い遊離 DNA 断片が存在している。つまり血漿や血清中の 200bp 以上の遊離 DNA 断片の割合は、健常人よりも悪性腫瘍患者の方で高いことが予測される。乳癌患者では、200bp 以上の遊離 DNA 断片量の割合が 160bp 以下の遊離 DNA 断片量の割合に比べて Stage の進行につれて増加傾向にあり、腋窩リンパ節転移の推測が可能であると報告された。

したがって、血清中の癌細胞由来の遊離 DNA 断片が悪性腫瘍の診断や予後のバイオマーカーとなり得ると考えられ、消化器癌における遊離 DNA 断片量に関する基礎的・臨床的な検討を計画するに至った。

2. 研究の目的

(1) 胃癌細胞と大腸癌細胞をヌードマウスに移植して、腫瘍動物モデルを用いて①腫瘍径、②腫瘍切除の程度（腫瘍完全切除と部分切除）、③化学療法剤の抗腫瘍効果と、血清中の「200bp/160bp DNA 割合」を調べ、腫瘍量や治療効果との関連性を検討する。

(2) 消化器癌（胃癌と大腸癌）患者の治療前における血清中の「200bp/160bp DNA 割合」を解析し、TNM 分類の各カテゴリーや病理組織所見を含めた臨床腫瘍学的諸因子との関連性を明らかにする。

(3) 消化器癌（胃癌と大腸癌）患者の治療前と治療後（手術または化学療法）において、「200bp/160bp DNA 割合」の変化を調べ、治療効果との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法と結果（基礎研究）

【目的】ヒト大腸癌移植ヌードマウスを用いて消化器癌における「200bp/160bp DNA 割合」に関する基礎的な検討を行った。

【材料と方法】ヒト大腸癌細胞株（WiDr）移植ヌードマウスモデルの作成をした。自然経過群は癌移植後に、腫瘍切除群は両側腹部に癌を移植し腫瘍の片側を切除し1週後に採血を行った。化学療法群は腫瘍を形成後に5-FUを腹腔内投与し、抗腫瘍効果を確認し採血した。血清中遊離 DNA 断片の測定は採取した血液からDNAを抽出し、Alu115とAlu247のprimerを用いてReal Time PCRを行った。Alu115とAlu247のDNA量を定量し、Alu247/Alu115DNA比を算出し、「200bp/160bp DNA 割合」とした。2群間の比較にはMann-WhitneyのU検定を用いp<0.05を有意差ありと判定した。

【結果】自然経過群では腫瘍増大に伴う「200bp/160bp DNA 割合」は癌接種1ヶ所群と2ヶ所群のでは両群に差は認めなかった。腫瘍切除群でも切除しない群との差はなかった（図1）。化学療法群において100mg/kg投与群ではコントロール群に比較し上昇を認めた(p=0.029)（図2、図3）。

図1 腫瘍の数と200bp/160bp DNA 割合

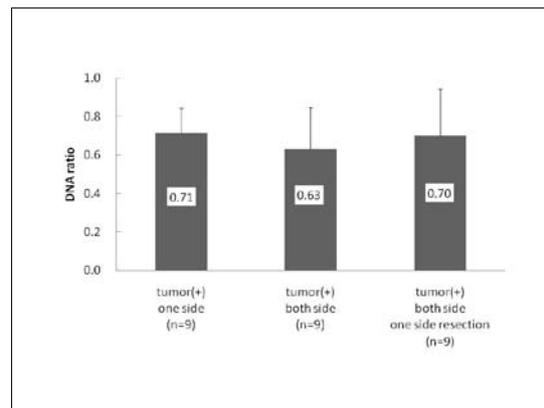


図2 5FUによる相対腫瘍重量の経時的変化

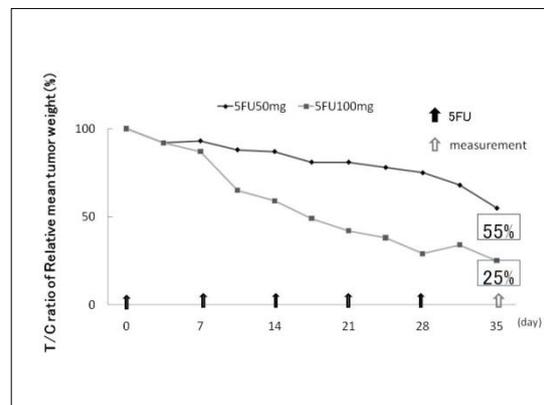
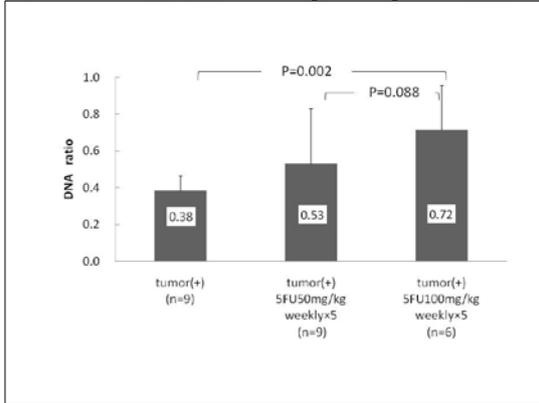


図3 5-FU投与量と200bp/160bp DNA割合



【結論】血清の「200bp/160bp DNA割合」はマウスにおける化学療法の効果判定に有用であることが明らかとなった。

4. 研究の方法と結果（臨床研究）

【目的】大腸癌患者の血清の「200bp/160bp DNA割合」と臨床腫瘍学的因子との関連性を検討した。

【対象と方法】2008年2月から2009年12月までに手術を行なった初発大腸癌60例、健常者24例を対象とした。手術1週間前に採血を行ない、全血から血清を分離後にDNAを抽出した。real time PCRにより測定したAlu247とAlu115のDNA量を用いて「200bp/160bp DNA割合」を算出した。健常者とDukes分類、壁深達度、分化度、リンパ管侵襲の有無、静脈侵襲の有無、リンパ節転移の有無、遠隔転移の有無などについて比較検討した。統計には一元配置分散分析、T検定、 χ^2 乗検定を用いた。

【結果】健常者とDukes分類(A+B)とDukes分類(C+D)(図4)、リンパ節転移の有無(図5)、静脈侵襲の有無(図6)で差を認めた。ROC曲線にて「200bp/160bp DNA割合」のcut off値を0.135に設定すると(図7)、「200bp/160bp DNA割合」はCEAとCA19-9より、高感度に癌か非癌かを鑑別することが可能であった($P < 0.001$)。

図4 Dukes分類と200bp/160bp DNA割合

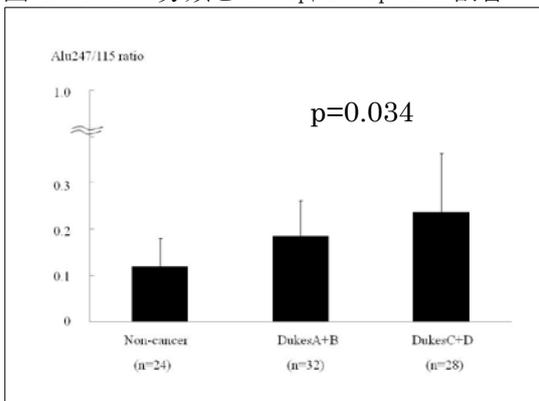


図5 リンパ節転移と200bp/160bp DNA割合

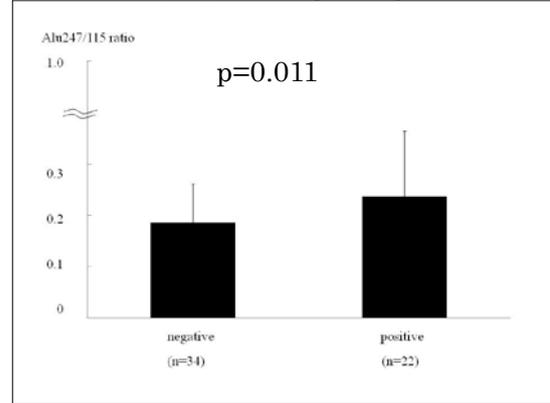


図6 静脈侵襲と200bp/160bp DNA割合

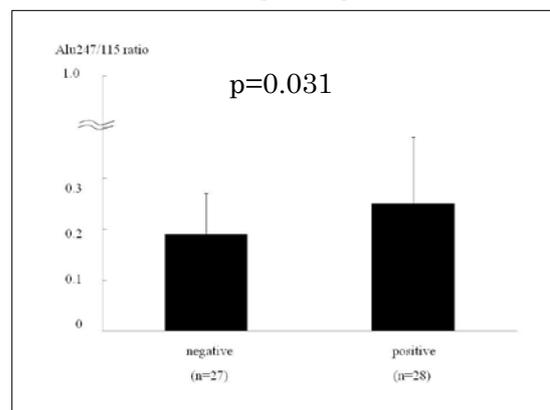
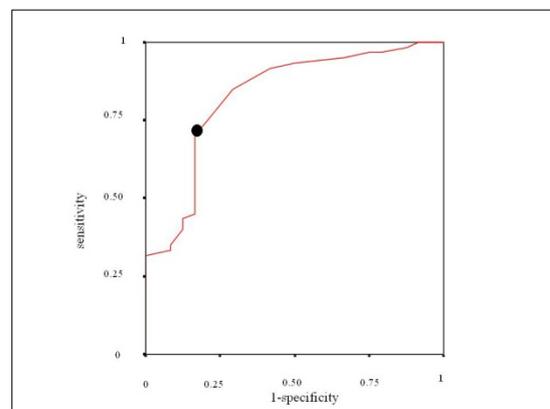


図7 ROC曲線による癌・非癌の鑑別



【結論】「200bp/160bp DNA割合」は癌・非癌の鑑別に有用であり、CEAやCA19-9より癌の診断能が高いと考えられた。

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)

Arakawa S, Ozawa S, Ooshima H (4番目),

他4名, “Gene expression and effects of orally active derivatives of fluoropyrimidine on gastric and colorectal cancer, Experimental and Therapeutic Medicine, 査読有, 1(1): p331-336, 2010

[学会発表] (計3件)

荒川 敏、小澤壯治、大島久徳 (4 番目) 他4名、胃癌と大腸癌における抗癌剤感受性関連遺伝子の発現と経口フッ化ピリミジン系抗癌剤の効果に関する検討、第68回日本癌学会総会、2009年10月1日、パシフィコ横浜

大島久徳、小澤壯治、荒川 敏 (4 番目)、他9名、血清遊離DNA断片比による消化器癌の悪性度診断の基礎的検討、第110回日本外科学会定期学術集会、2010年4月8日、名古屋国際会議場

荒川 敏、小澤壯治、大島久徳 (7 番目)、他8名、「血清遊離DNA断片比による大腸癌高感度診断法の検討、第69回日本癌学会総会、2010年9月24日、大阪国際会議場

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件) : 無

[その他]

ホームページ等 : 無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 壯治 (OZAWA SOJI)
東海大学医学部消化器外科学・教授
研究者番号 : 10169287

(2) 研究分担者 : なし

(3) 連携研究者

白石 天三 (SHIRAIISHI TENZOU)
藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院
一般消化器外科・講師
研究者番号 : 00449464

大島 久徳 (OOSHIMA HISANORI)
藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院
一般消化器外科・助教

研究者番号 : 70367712

荒川 敏 (ARAKAWA SATOSHI)
藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院
一般消化器外科・助教
研究者番号 : 8044962