

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591907

研究課題名(和文) 消化器癌の血清DNA断片を標的とした悪性度に関する遺伝子診断法の基礎的臨床的検討

研究課題名(英文) Basic and clinical research of circulating DNA fragments as a biomarker in gastrointestinal cancer.

研究代表者

小澤 壮治(OZAWA, Soji)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10169287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト食道扁平上皮癌細胞TE-4をヌードマウスの両側背部皮下に移植した。移植3週間後に片側腫瘍切除と両側腫瘍切除を行った。移植5週間後に採血後犠死させた。また、移植3週間後に5-FU 25mg/kg, 50mg/kgを4回投与し、移植5週間後に採血後犠死させた。Real Time PCR法によりAlu247(腫瘍壊死由来)とAlu115(アポトーシス由来)のDNA量を定量した。両DNAは切除や5-FUによる残存腫瘍量に応じて減少した。血清中の癌細胞由来の遊離DNA断片が悪性腫瘍の進行度診断や治療効果判定のバイオマーカーとなり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Human squamous cancer cells (TE-4) were inoculated subcutaneously in the bilateral back of BALB/c nude mice. Unilateral tumors or bilateral tumors were resected 3 weeks after inoculation as surgical models. And 5-FU (25mg/kg or 50mg/kg) was injected intraperitoneally 4 times 3 weeks after inoculation as chemotherapy models. Blood was collected and animals were sacrificed 5 weeks after inoculation. Serum was processed and used for DNA measurement using a real time PCR method. DNA concentrations (Alu 247 and Alu115) correlated with tumor volumes. Serum DNA seems to be a good biomarker for cancer staging and evaluating chemotherapeutic effects.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：癌 核酸 外科 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

消化器癌の進行度診断や治療効果判定は画像診断法や血液腫瘍マーカーなどにより行われているが、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将来の発展が期待されている。

これまでわれわれ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 断片が悪性腫瘍の進行度診断や治療効果判定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な検討を計画するに至った。

われわれはインフォームドコンセントを取得した健常者から末梢血液を採取して血清を分離後に DNA を抽出し、また大腸癌細胞株 WiDr から DNA を抽出した。Umetaniらの報告を参考に、Real Time PCR を行い、Alu115 と Alu247 の DNA 断片量の定量方法を確立した。

次に 60 例の大腸癌患者について 200bp 以上の遊離 DNA 断片量と 160bp 以下の遊離 DNA 断片量の比(以下「長鎖/短鎖 DNA 割合」)を調べると、進行度、リンパ節転移度、脈管侵襲が高度なほど「長鎖/短鎖 DNA 割合」が高く、ROC 解析から血清 CEA 値 や Ca19-9 値よりも高感度に癌と非癌を鑑別できることが明らかとなった。

さらにヒト大腸癌細胞株 (WiDr) 移植ヌードマウスモデルを作成して 5-FU を投与すると、抗腫瘍効果が高いほど「長鎖/短鎖 DNA 割合」が高値となり、両者は正の相関を示し、「長鎖/短鎖 DNA 割合」が化学療法剤の効果判定に有用である可能性が示唆された。

そこで大腸癌以外の代表的な消化器癌である食道癌においても、われわれが確立した測定系を用いると「長鎖/短鎖 DNA 割合」が悪性度の指標となるかについて検討し、消化管癌に共通する事象であるかを明らかにする必要があると考えた。

2. 研究の目的

これまでの研究成果および研究動向から、血清中の癌細胞由来の遊離 DNA 断片が悪性腫瘍の進行度診断や治療効果判定のバイオマー

カーとなり得ると考え、消化器癌(食道癌など)における「長鎖/短鎖 DNA 割合」が悪性度の指標となるか、そして手術や化学療法後の治療効果判定に有用か、有用であればどの時期に測定するのが効率的かを明らかにするために、ヒト消化器癌細胞株(食道癌細胞など)移植ヌードマウスモデルを用いて基礎的に検討することにした。

3. 研究の方法

食道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(I)腫瘍径、(II) 腫瘍切除の程度(腫瘍完全切除と部分切除)、(III)化学療法剤の抗腫瘍効果と、血清中の「長鎖/短鎖 DNA 割合」の経時的な変化を調べ、腫瘍量や治療効果との経時的な関連性を詳細に検討した。

(1)ヒト消化器癌細胞株移植ヌードマウスモデルの作成

BALAB/cA-nu/nu ヌードマウスにヒト食道癌細胞株(TE シリーズ)を皮下に移植して腫瘍を形成させた。

(2)ヌードマウスモデルにおける検討群の設定

自然経過群: 癌細胞移植時から腫瘍形成、腫瘍増大、死亡にいたるまでの 4 時点で、採血の後に犠死させた。

腫瘍切除群: 腫瘍形成後に、腫瘍を 50%切除または 100%切除し、切除前、切除一定期間後に採血の後に犠死させた。

化学療法群: 腫瘍形成後に 5-FU を腹腔内投与した。薬剤投与前、投与一定期間後に採血の後に犠死させた。

* 換算腫瘍重量(RW)は腫瘍の短径を a (mm)、長径を b (mm)とすると、 $RW (mg) = a^2 \times b / 2$ で算出した。

(3)ヌードマウスの観察

ヌードマウスの生死、体重、換算腫瘍重量(RW)を経時的に観察した。

(4)血清中遊離 DNA 断片の測定

ヌードマウスから採血し、犠死させた後、換算腫瘍重量(RW)と実測腫瘍重量の測定を行った。

採取した血液は、3,000rpm, 30 分で遠心分離をした後、血清を分注し-80 で冷凍保存した。

QIAamp®DNA kit (QIAGEN™社)を使用し血清中から DNA を抽出した。

抽出した DNA と SYBR® Premix Ex Taq™ 試薬(タカラバイオ社)と Alu115 または Alu247 の primer を用いて Thermal Cycler Dice® Real Time System(タカラバイオ社)で Real Time PCR を行った。PCR は熱変性 95 , 30 秒、アニーリング 64 , 30 秒、伸長反応 72 , 30 秒で 35 サイクル行った。

あらかじめ段階希釈した標準資料を用いて検量線を用意し、Thermal Cycler Dice® Real Time System で設定した閾値と増幅曲線が交わる点(Ct 値)から、Alu115 と Alu247 の DNA 量を定量し、Alu247DNA / Alu115 DNA 比を算出した。最終的にこの比を「長鎖/短鎖 DNA 割合」としている。

4. 研究成果

(1)移植細胞株の検討

食道癌細胞 7 株 (TE1, TE4, TE6, TE8, TE10, TE11, TE14)について、細胞増殖率、ヌードマウス移植率、腫瘍増殖率を詳細に検討した。その結果、TE4 は増殖速度が早く、計画実験に適しているとの結論を得た。

(2)TE4 を用いた測定系の確立

ALU115 primer と ALU247 primer を購入し、Real time PCR による測定系を検討した。測定系確立用の TE4 移植ヌードマウスモデルを作成し、採血後犠死させて血清を採取した。その血清について上記「血清中遊離 DNA 断片の測定」法に準拠して、DNA0.1pg/tube - 10ng/tube を検

出できる測定系を確立した。

(3)腫瘍切除群の血清中遊離 DNA 断片の測定

10⁶個の TE4 細胞をヌードマウス両側背部皮下に移植し、3 週間後に両側腫瘍切除モデルと片側腫瘍切除モデルを作成し、2 週間後に採血後犠死させて血清を採取した。

Alu247DNA と Alu115 DNA は片側腫瘍切除モデルより両側腫瘍切除モデルの方が低値であった(P<0.05)。Alu247DNA / Alu115 DNA 比には差を認めなかった。

(4)化学療法群の血清中遊離 DNA 断片の測定

10⁶個の TE4 細胞をヌードマウス両側背部皮下に移植し、3 週間後から 2 投 5 休で 5-FU (25mg/kg または 50mg/kg)を投与し、2 週間後に採血後犠死させて血清を採取した。

Alu247DNA と Alu115 DNA は 5-FU (25mg/kg) モデルより 5-FU (50mg/kg) モデルが低い傾向にあった (P<0.06)。Alu247DNA / Alu115 DNA 比は前者より後の方が低値であった (P<0.05)。

(5)考察

食道癌腫瘍が手術により完全に切除できると DNA 断片が不完全切除よりも減少した。また化学療法により腫瘍縮小が得られると同様に DNA 断片が減少した。さらに DNA 比も減少した。これらのことより、腫瘍量を反映する血液マーカーとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

{雑誌論文} (計 0 件)

{学会発表} (計 0 件)

{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

小澤壯治 (OZAWA, Soji)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 10169287

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

宮地勇人 (MIYACHI, Hayato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 20174196