

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790416

研究課題名（和文） 進行胃癌に対する術前化学療法の治療効果関連因子の解明と治療効果予測システムの確立

研究課題名（英文） Elucidation of chemotherapy related factor of the preoperative chemotherapy for advanced gastric cancer and establishment of curative effect prediction system

研究代表者 一戸 昌明 (ICHINOE MASAOKI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80365163

研究成果の概要（和文）：治療効果群では、臨床病理学的に低分化型癌が少なく、リンパ節転移は低い傾向が見られた。また治療効果群は、治療抵抗群に比して、有意に LAT1 score が高値を示した。手術組織において、治療効果群は抵抗群に比して有意に KI-67LI が低値を示した。以上の結果より治療効果群では、手術時腫瘍部の細胞増殖能が有意に低下していることが示唆された。また現時点では、LAT1 の発現は、生検時治療効果を予測する上で有用なマーカーになりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Clinicopathological feature of chemotherapy effective group showed the frequency of lymph node metastasis and the frequency of poorly differentiated cancer were low tendencies. In chemotherapy effective group, there was significant higher LAT1 score than in chemotherapy resistance group. Further, there was significant low Ki-67LI than in chemotherapy group in the surgical specimen. There was the possibility that LAT1 expression at biopsy could become a useful marker in predicting curative effect was suggested at present.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：進行胃癌 化学療法 治療効果

### 1. 研究開始当初の背景

近年化学療法の進歩により、術前補助化学療法のレジメや適応が大きく変化しており、当施設においても高度進行胃癌に対して CS 療法（シスプラチン+S1）にドセタキセルを加えた術前化学療法（DCS 療法）が行われている。DCS 療法の安全性と抗腫瘍効果はすでに第 I 相試験で確認されている

(Nakayama N, et al. Oncology

2008;75:1-7)。

これまでに当施設にて術前 DCS 療法が施行された胃癌切除検体が 27 症例得られており、予備検討を行ったところ、病理組織学治療効果が Grade1b 以上の症例が 14 例 (54%) あり、その内 Grade2 以上の症例が 8 例 (31%) で確認された【胃癌取り扱い規約

に基づく治療効果判定基準:Grade 0:無効, Grade1a:ごく軽度の効果, Grade1b:軽度の効果, Grade2:かなりの効果, Grade3:著効】。症例の臨床病理学特徴としては男性に多く、低分化癌に多いことが挙げられる。同じレジメの化学療法であっても、治療効果が得られる症例群 (治療反応群: Grade1b, 2, 3)と治療効果が無効または乏しい症例群 (治療抵抗群:Grade0, 1a)がある。さらに、治療抵抗群は治療効果群に比してリンパ節頻度が高い傾向があり、有意に深達度 SE 症例が多いことが判明した。DCS 療法に対する治療効果関連因子は未だに詳細な解析はなされておらず、不明な点が多いが、最近始まったレジメであり、ここ数年で症例数が増加している。よって、高度進行胃癌に対する術前化学療法の治療効果関連因子の解明や治療効果予測システムを確立することは、治療法の選択や予後の改善に対して大いに役立つことが期待され、早急に病理学的な検討が必要と考えられる。

## 2. 研究の目的

そこで、上記背景を基に治療効果の差異を細胞周期関連蛋白等の発現とエピジェネティックな異常の差異から検討し、進行胃癌に対する術前化学療法の治療効果関連因子を見出し、生検から治療効果予測システムを確立することを目的に研究を行った。

## 3. 研究の方法

### ①対象

現在(2013年1月)までにDCS療法施行後胃切除症例35例を対象とし、各々、治療前生検組織と治療後の切除組織を使用した。

### ②免疫組織化学染色

治療効果群、治療抵抗群における腫瘍組織

の細胞増殖能やアポトーシスに関連した蛋白、癌タイプアミノ酸トランスポーターと

考えられているL-type amino acid transporter-1(LAT1)等の発現を免疫組織化学染色で検討した。下記の抗体を用いた免疫組織化学染色を施行した。

A) Ki-67, B) ss-DNA, C) Bax, D) TS, E) EGFR, F) Her2, G) LAT1

### ③評価方法

A), B):腫瘍細胞1000個当たりの陽性細胞数をlabeling index(LI)として算出した。

C), D), G):腫瘍細胞の細胞膜の染まりをintensity(0-3)で、評価し、さらに陽性面積を4段階(0-3)に評価し、染色のintensityと陽性面積を掛け合わせscore化(0-9)とした。

E):腫瘍細胞膜に発現があるものを陽性と判断した。

F):腫瘍細胞膜の染色性を基にscore化(0~3)した。

### ④DNA抽出

ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから、連続切片を作成し、癌細胞をArcturus社Pixcell IIeを用いてLaser Captured Microdissection(LCM)を行い、分離・採取し、抽出カラム(Qiagen社、DNA mini kit)を用いてDNAを抽出。

### ⑤DNAメチル化の検索

抽出したDNAにSodium Bisulfite処理を行ない、以下の遺伝子に関連した特異的プライマーを用いて、CpG siteのメチル化をMSP(methylation specific PCR)にて解析する。

A) 細胞周期調節因子: CDKN2A, RASSF1A, CHFR, p14, p21,  
B) 増殖シグナルの伝達: CDH1, RAR $\beta$ .  
C) DNAミスマッチ修復遺伝子: hMLH1, hMSH2.

## 4. 研究成果

### ①臨床病理学的特徴

今回対象とした 35 症例の臨床病理学的因子を下図の table に示す。予備検討として得られた結果と類似した結果で、男性に多く、低分化癌が多く、治療効果群ではリンパ節転移が低い傾向があり、分化型癌がより高頻度で得られる傾向があった。

	total	治療抵抗群 治療効果群	
		Grade0-1a	Grade1b-2
Age (year)	62	61	63
Gender			
Male	25	13	12
Female	10	5	5
Depth			
T1a(M)	1	0	1
T1b(SM)	1	0	1
T2(MP)	3	1	2
T3(SS)	12	4	8
T4a(SE)	18	13	5
Histologic type			
Intestinal	10	3	7
Diffuse	25	15	10
Lymph node metastasis			
Positive	29	17	12
Negative	6	1	5

## ②免疫組織化学染色・メチル化

### A) 生検組織

生検組織において、治療効果群は抵抗群に比して、有意( $P<0.05$ )に LAT1 score が高値であった (Fig1)。Ki-67LI, ssDNA LI, Bax score に有意差は見られなかった。

### B) 手術組織

手術組織において、治療効果群では有意に Ki67LI が低値であった (Fig2)。

手術組織において治療効果群では有意に LAT1 score が高値であった (Fig3)。

### C) 生検組織と手術組織

手術組織と生検組織間では、治療効果群において、有意に手術組織で Ki-67LI が低値を示した (Fig4)。

### D) 転移巣における LAT1 の発現

上記結果から LAT1 が治療効果関連因子になる可能性が推察された為、転移巣における LAT1 の発現を検討した。術前化学療法未施行の進行胃癌の原発巣とリンパ節転移巣で LAT1 の発現を検討したところ、転移巣においても LAT1 の高発現が確認され、原発巣と相関関係があることが分かった。

Figure 1

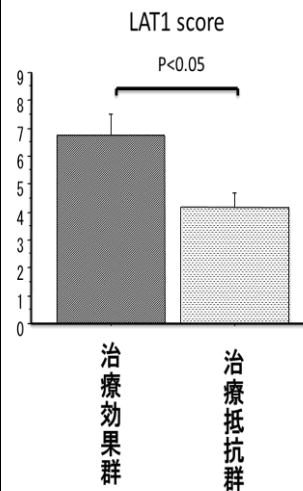


Figure 2

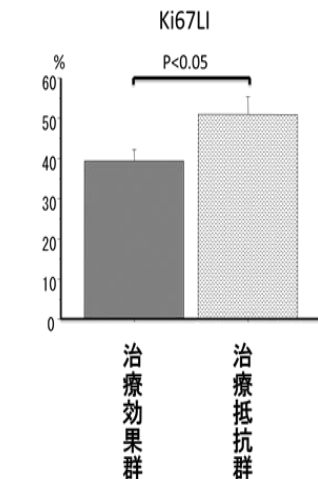


Figure 3

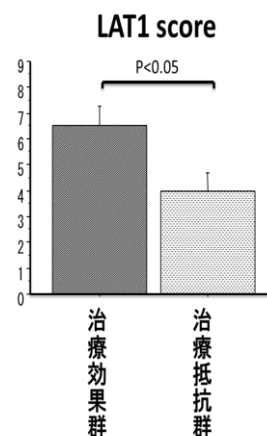
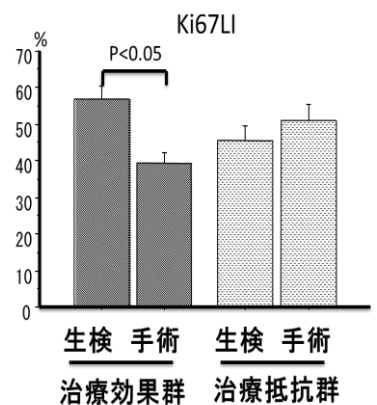


Figure 4



### E) DNA の抽出とメチル化

生検組織と手術組織から癌細胞を Arcturus 社 Pixcell II e を用いて Laser Captured Microdissection (LCM) を行い、分離・採取し、DNA を各々抽出した。抽出した DNA を用い MSP (methylation specific PCR) を施行したが、PCR が上手くかからない症例が多く、差異は確認できなかった。

## ③結果のまとめ

治療効果群では、腫瘍部の Ki-67LI が低値を示しており、腫瘍細胞の細胞増殖能が有意に

低下している可能性が示唆された。まだ他の免疫染色の検討が終了していないが、現時点では生検組織における LAT1 の発現は、術前 DCS 療法進行胃癌に対する治療効果を予測する上で、有用なマーカーになりうる可能性が示唆された。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

### ①第 102 回日本病理学会総会

進行胃癌に対する術前化学療法の治療効果関連因子の探索：癌タイプアミノ酸トランスポーターの有用性、2013 年 6 月 6 日 札幌 一戸昌明、三上哲夫、仲田典弘、東瑞智、花樹代美、梅沢敦子、遠藤仁、岡安勲、村雲芳樹

### ②第 101 回日本病理学会総会

胃癌リンパ節転移巣における腫瘍型アミノ酸トランスポーターLAT1 の発現：原発巣との比較 2012 年 4 月 26 日 東京 一戸昌明、三上哲夫、柳澤信之、仲田典広、花樹代美、松本俊英、遠藤仁、岡安勲

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

一戸昌明 (ICHINOE MASA AKI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80365163