

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17501  
研究種目：基盤研究 (C)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24591952  
研究課題名 (和文) 食道癌における新規抗癌剤効果規定遺伝子の同定と抗癌剤効果予測モデルの確立  
研究課題名 (英文) Identification of novel drug-response determinants in esophageal squamous cell carcinoma  
研究代表者  
野口 剛 (NOGUCHI TSUYOSHI)  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号：20264335  
交付決定額 (研究期間全体) (直接経費)：4,100,000 円

研究成果の概要 (和文)：二値化に基づく新規マイクロアレイデータ解析法により、食道癌における新規抗癌剤効果規定遺伝子候補として、5-FU に対して3遺伝子 (*CARD8*, *TMUB2*, and *EMX2*)、CDDP に対して6遺伝子 (*orf97*, *CCDC90B*, *IFITM1*, *TARBPI*, *TTYH2*, and *MARK1*) を抽出し得た。また、同遺伝子群を用い、予測性の高い臨床効果予測モデルの設定に至った。

研究成果の概要 (英文) : A novel statistical analysis, a two-dimensional mixed normal model, provided 3 (*CARD8*, *TMUB2*, and *EMX2*) and 6 candidates (*C10orf97*, *CCDC90B*, *IFITM1*, *TARBPI*, *TTYH2*, and *MARK1*) respectively for 5-FU and CDDP, as novel sensitivity marker genes in esophageal cancer. And we developed highly predictive formulae *in vitro* and *in vivo* using expression data of a set of the all selected marker genes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：テイラード医療・効果予測システム・マイクロアレイ・抗癌剤・食道癌

### 1. 研究開始当初の背景

網羅的遺伝子発現解析を用いた新規抗癌剤効果規定遺伝子の同定は、世界中で注目、期待されているが、そのデータ解析法、ならびに候補遺伝子抽出法は未だ確立されていない。申請者らのグループでは、網羅的遺伝子発現解析及び MTT assay による感受性評価を用いた抗癌剤効果予測遺伝子の同定、並びに同遺伝子群を用いた効果予測モデルの確立に継続的に取り組んで来ている (*Int. J. Cancer*, 111, 617-626, 2004, *Int. J. Oncol.*, 28(5), 1153-1162, 2006, *Mol. Cancer Ther.*, 5(3), 767-775, 2006, *Int. J. Oncol.*, 32: 413-423, 2008)。その中で、抗癌剤効果との関連が既に報告されている既知遺伝子群、ならびに異なるプラットフォーム (cDNA と oligonucleotide microarray) を組み合わせにより抽出された遺伝子群に比し、二値化 (数理モデルに基づく新規マイクロアレイデータ解析法) により抽出された新規候補遺伝子群において、より精度の高い臨床効果予測モデルの設定が可能であることを示し、さらに同遺伝子群のうち、*IFITM1* 遺伝子が CDDP 感受性効果規定遺伝子のひとつであることを報告した。しかしながら、さらに画期的な

未知の抗癌剤効果規定遺伝子の存在も示唆され、その同定が望まれる。本申請研究では、網羅的遺伝子発現解析の新規データ解析法 (二値化) を改良し、より有用な新規効果予測遺伝子を抽出、さらに抽出された遺伝子について、抗癌剤効果規定遺伝子としての機能解析を行うとともに、臨床検体における抗癌剤効果予測モデルを設定するという発想に至った。

### 2. 研究の目的

Stag II、III 食道扁平上皮癌においては術前化学療法が標準治療となり、化学療法に対する期待が増している。しかし、その効果には大きな個人差がある。ゆえに、有効な症例のみを選択する投与前効果予測系の確立が求められているが、未だ決定的なマーカー遺伝子は乏しく、その同定は急務である。一方、新たなマーカー遺伝子を抽出する手法として網羅的遺伝子発現解析が応用されているが、未だ確立した抽出法はない。本申請研究では、数理モデルに基づく新規マイクロアレイデータ解析法の応用により、有用な新規効果予測遺伝子を抽出、さらに抽出された遺伝子について、抗癌剤効果規定遺伝子としての機能

解析を行うとともに、臨床検体における抗癌剤効果予測モデルを設定することにより、効率的な食道癌化学療法の実現を目指す。

### 3. 研究の方法

**(1) 抗癌剤効果予測遺伝子の抽出:** ヒト食道扁平上皮癌細胞株 20 株を用いたオリゴヌクレオチドマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析と MTT アッセイによる 5-FU、CDDP に対する感受性 ( $IC_{50}$  値) 評価は既に済んでいる。そこで、各細胞株における全遺伝子発現レベルと  $IC_{50}$  値について順位相関解析を行い、順位相関係数が有意 ( $P < 0.01$ ) であり、かつ、遺伝子の発現状態に発現と非発現を仮定した新規統計解析手法により、 $IC_{50}$  値の変化と強い関連性が認められた遺伝子を効果予測遺伝子候補として抽出、さらに、Real-time RT-PCR による遺伝子発現レベルにおいても回帰分析で関連性が確認された遺伝子 ( $P < 0.05$ ) を最終的な抗癌剤効果予測遺伝子候補として抽出する。

**(2) 候補遺伝子の強制発現クローンの樹立:** 各候補遺伝子のクローニング、さらに発現ベクターへの組込みを行う。次に、作製されたコンストラクトをヒト培養食道癌細胞株に導入し、Real-time RT-PCR を用いた mRNA の発現量及びウエスタンブロット法を用いたタンパク質発現の確認を行う。

**(3) 樹立クローンを用いた抗癌剤感受性評価:** 各候補遺伝子を過剰発現させたヒト培養食道癌細胞株に対して MTT assay を行い、抗癌剤感受性効果規定遺伝子としての可能性を検討する。予想通りの抗癌剤感受性変化が確認されれば、候補遺伝子の発現抑制を目的とした siRNA のヒト食道癌細胞株への導入による抗癌剤感受性変化も確認する。

**(4) 抗癌剤効果規定遺伝子の薬剤感受性に関わる分子機構の解明:** 抗癌剤感受性変化を来たした候補遺伝子強制発現クローンとコントロールベクター導入クローンを用い、オリゴヌクレオチドマイクロアレイによる遺伝子プロファイリング解析を行う。さらに、抗癌剤感受性に差がある強制発現クローンが樹立できれば、このクローン間の遺伝子プロファイルも比較する。この結果を Ingenuity Pathways Analysis (IPA) によるパスウェイ解析で解析し、関連遺伝子及び分子機構を明らかにする。

**(5) 抗癌剤効果予測遺伝子群を用いた臨床効果予測モデルの設定 (後ろ向き試験):** 複数の抽出遺伝子を用いた効果予測については、各候補遺伝子の発現量を説明変数、 $IC_{50}$  値の対数変換値を目的変数とした重回帰分析を行うことにより設定する。また、解析には、外れ値を考慮した頑強な重回帰分析を行うために開発された解析ソフト NLReg を用いる。

具体的には、食道扁平上皮癌症例 (術前 5-FU/CDDP 療法施行症例を対象) における化学療法施行前の生検癌組織の各候補遺伝子発現レベルを説明変数、臨床効果 (化学療法施行後の腫瘍縮小率) の対数変換値を目的変数とした重回帰分析を行うことにより臨床効果予測式を作成し、さらにテストサンプルを用いて予測精度の確認作業を行う。

### (6) 研究総括と前向き臨床試験への展開:

抽出された抗癌剤効果予測遺伝子のうち、効果規定遺伝子としての機能が証明され、さらに同遺伝子の薬剤感受性に関わる分子機構の解明に至れば、効果予測マーカーとしてのみならず、新たな抗癌戦略となりうるものが期待される。また、抗癌剤効果予測遺伝子群を用い、予測性の高い臨床効果予測モデルを設定に至れば、前向き臨床試験への展開を目指してゆく予定である。

### 4. 研究成果

**(1) 抗癌剤効果予測遺伝子の抽出:** 新規抗癌剤効果予測マーカー遺伝子として、5-FU については、*CARD8*、*TMUB2*、*EMX2* の 3 遺伝子、CDDP については *FAM188A*、*CCDC90B*、*TARBP1*、*TTYH2*、*IFITM1*、*MARK1* の 6 遺伝子が抽出された。

**(2) 候補遺伝子の強制発現クローンの樹立:** 抽出遺伝子のうち複数の候補遺伝子について、様々な発現レベルを呈する強制発現クローンを樹立し得た。

**(3) 樹立クローンを用いた抗癌剤感受性評価:** 複数の遺伝子については、抗癌剤効果規定遺伝子としての機能も証明し得た。

**(4) 抗癌剤効果規定遺伝子の薬剤感受性に関わる分子機構の解明:** 抽出された候補遺伝子のうち、複数遺伝子に関し、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) によるパスウェイ解析にて解析を行い、関連遺伝子群及び分子機構について検索を行った。抗癌剤の薬剤感受性に関わる分子機構の解明につながりうる情報、結果を得る事が出来た。

**(5) 抗癌剤効果予測遺伝子群を用いた臨床効果予測モデルの設定 (後ろ向き試験)、及び**

**(6) 研究総括と前向き臨床試験への展開:** 食道扁平上皮癌症例 (術前 5-FU/CDDP 療法施行症例を対象) における化学療法施行前の生検癌組織の各候補遺伝子発現レベルを説明変数、臨床効果 (化学療法施行後の腫瘍縮小率) の対数変換値を目的変数とした重回帰分析を行うことにより臨床効果予測式を作成し、さらにテストサンプルを用いて予測精度の確認作業を行った。現在、前向き臨床試験への展開を目指して検討を進めている。

## 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5件)

- ① TSPAN8, identified by Escherichia coli ampicillin secretion trap, is associated with cell growth and invasion in gastric cancer. Katsuhiko Anami, Naohide Oue, Tsuyoshi Noguchi. (他6名, 3番目), Gastric Cancer. 査読有, Epub ahead of print, DOI: 10.1007/s10120-015-0478-z, (2015)
- ② Comparing incidence of enterocolitis after laparoscopic and open low anterior resection for stage II/III rectal cancer. Masafumi Inomata, Tsuyoshi Noguchi, Seigo Kitano. (他8名, 9番目), Asian J Endosc Surg. 査読有, 7(3):214-21, (2014)
- ③ *NRDI*, which encodes nardilysin protein, promotes esophageal cancer cell invasion through induction of MMP2 and MMP3 expression. Naohiro Uraoka, Tsuyoshi Noguchi, Wataru Yasui. (他5名, 7番目), Cancer Science. 査読有, 105(1):134-140, (2014)
- ④ MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2. Mitsuhiro Matsuo, Tsuyoshi Noguchi, Masatsugu Moriyama. (他5名, 4番目), Mol Cancer. 査読有, DOI: 10.1186/1476-4598-12-15, (2013)
- ⑤ Morphology of the epithelium of the lower rectum and the anal canal in the adult human. Eiichi Tanaka, Tsuyoshi Noguchi, Kaoruko Nagai. (他3名, 2番目), Med Mol Morphol. 査読有, 45(2):72-9, (2012)

[学会発表] (計9件)

- ① 柴田 智隆, 胸部食道癌患者における体成分分析装置を用いた栄養状態の評価. 第40回九州代謝・栄養研究会, 2015. 3. 7, 沖縄県市町村自治会館(沖縄県・那覇市).
- ② 麓 祥一, 進行食道癌に対する術前 DCF 療法の短期成績. 第76回日本臨床外科学会総会, 2014. 11. 22, ビッグパレットふくしま(福島県・郡山市).
- ③ 麓 祥一, 進行食道癌症例に対する術前 docetaxel/cisplatin/5-fluorouracil (DCF) 療法の短期成績. 第42回九州食道癌合併療法談話会, 2014. 7. 12, ホテルニューオータ

ニ博多(福岡県・福岡市).

- ④ Shoichi Fumoto, Empty spiracles homeobox 2 (EMX2) gene is a novel candidate as a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. 2013 Congress of the European Society for Diseases of the Esophagus, 2013. 11. 1, Erasmus MC (Netherlands・Rotterdam).
- ⑤ 麓 祥一, 食道癌における新規予後診断マーカーとしてのEMX2の同定. 第24回日本消化器癌発生学会総会, 2013. 9. 5, 石川県立音楽堂(石川県・金沢市).
- ⑥ 麓 祥一, 食道癌における新規予後マーカー・癌幹細胞関連候補遺伝子としてのEMX2の同定. 第68回日本消化器外科学会総会, 2013. 7. 17, シーガイアコンベンションセンター(宮城県・宮崎市).
- ⑦ 麓 祥一, 食道癌個別化化学療法: 新規抗癌剤効果予測マーカーの同定と臨床効果予測モデルの確立. 第99回日本消化器病学会総会, 2013. 3. 21, 城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市).
- ⑧ Shoichi Fumoto, Identification of EMX2 as a potential cancer stem cell (CSC)-related gene for esophageal squamous cell carcinoma. 13rd World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus (ISDE), 2012. 10. 17, Venice Convention (Italy・Venice).
- ⑨ 麓 祥一, 食道癌における新規抗癌剤感受性及び予後マーカー因子の同定とその臨床応用. 第66回日本食道学会学術集会, 2012. 6. 22, 軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県・北佐久郡軽井沢町).

[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]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野口 剛 (NOGUCHI TSUYOSHI)  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号: 20264335

### (2) 研究分担者

塚本 善之 (TSUKAMOTO YOSHIYUKI)  
大分大学・医学部・助教

研究者番号：00433053

柴田 智隆 (SHIBATA TOMOTAKA)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：20566905

麓 祥一 (FUMOTO SHOICHI)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00532631