

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590533

研究課題名（和文） 消化器癌患者の血中遊離核酸を用いた新たな診断法の開発と個別化バイオマーカーの試み

研究課題名（英文） New diagnostic method and personalized biomarker using circulating nucleic acids in patients with digestive system cancer

研究代表者

市川 大輔 (ICHIKAWA DAISUKE)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：20347446

研究成果の概要（和文）：

消化器癌患者の末梢血液中に、遊離 DNA のみならず microRNA も安定して存在することが明らかになった。血液中の循環核酸を用いた腫瘍特異的異常の検出が、腫瘍動態を反映することも明らかとなり、末梢血液中の遊離核酸を用いた染色体・遺伝子増幅領域や異常 microRNA の検出の癌の存在診断としての有用性が示唆された。また、臨床病理学的因子との比較検討で、同手法の悪性度診断としての有用性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study found that cell-free DNA and microRNA stably exist in the peripheral blood of patients with digestive tract cancers, and detections of tumor-specific abnormalities in the circulating nucleic acids reflect tumor dynamics of primary lesions to some degree. This study also indicated that detection of tumor-specific amplification and microRNA in the peripheral blood could be useful as not only complementary tumor markers but also prognostic markers for digestive tract cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：バイオマーカー、腫瘍マーカー、microRNA、消化器癌

1. 研究開始当初の背景

細胞の壊死やアポトーシス、また、能動的分泌等を介して、様々な核酸が細胞外へ放出されており、これら遊離核酸が血液中においても比較的安定した状態で存在することが明らかになってきた。一方で、癌患者の予後を改善する上で、癌の原発ならびに再発の早期発見は極めて重要であり、新たなバイオマーカーの検索が行われているが、これら体液中の遊離核酸は、種々の分子生物学的検索から判明した新知見を実地臨床に応用するトランスレーショナルリサーチにおいて鍵となる分子である。

2. 研究の目的

消化器癌の二次予防ならびに癌患者の術後フォローアップにおける低侵襲で鋭敏な新たな診断手法を開発し、原発・再発癌の早期発見ならびに早期の治療開始を実現し、消化器癌の治療成績向上を目指す。具体的には、消化器癌患者の末梢血液中の遊離核酸を用いた染色体・遺伝子増幅領域定量解析ならびに microRNA 定量解析を行い、一方で、切除標本を用いた個々の症例におけるアレイ解析から、症例特異的な染色体・遺伝子異常を検出し、新たな概念のオーダーメイド個別化バイオマーカーの有用性を検討する。

3. 研究の方法

本研究は京都府立医科大学の倫理委員会の審査を受け、承認を得た後に行われた。当施設附属病院において検査・治療を施行された消化器癌患者を対象として、採取血液から遠心分離によって細胞成分の混入を防ぎ、Cell-free genomic DNA 断片及び Cell-free micro RNA の抽出を行った。また、組織からの核酸抽出は、パラフィン切片上で癌部・非

癌部を確認の後、行った。

(1) 染色体・遺伝子増幅領域の解析

担癌患者・健常者における末梢血液中遊離 DNA 断片を用いた遺伝子増幅領域（食道癌:CCND1 遺伝子領域、胃癌: HER2 遺伝子領域）の定量解析を試みた。DNA の絶対濃度上昇など他の要因によるバイアスを避ける目的で、同一染色体上に位置する Single copy gene（食道癌の CCND1 では 11q22-23 の DRD2 を選択）を参照遺伝子として設け、増幅遺伝子増幅指数 = 領域増幅遺伝子領域濃度 / 参照遺伝子領域濃度を算出し、種々の臨床病理学的因子との比較検討を行った。

(2) Micro RNA 解析

血液中 microRNA の安定性の検討を行った後、担癌患者ならびに健常者における末梢血中遊離 microRNA の定量解析を行った（食道癌:miR-18a, 21, miR-184, miR-221, miR-375, 胃癌:miR-16, miR-17-5p, miR-21, mir106a, miR-106b、膵癌:miR-18a, 221）。同様に切除標本癌部においても同解析を行い、腫瘍動態の反映性 (tumor dynamics) についても検討を加えた。また、種々の臨床病理学的因子との比較検討から、その臨床意義についても検討を加えた。

4. 研究成果

(1) 染色体・遺伝子増幅領域の解析

Reference sequence として DRD2 遺伝子を用いることによって、血漿中遊離核酸を用いた解析でも、食道癌における CCND1 領域同遺伝子増幅領域コピー数の増加が測定可能であった。得られた結果と臨床病理学的因子との比較検討から、食道癌患者における血漿中 CCND1 増幅検出が、癌の存在診断のみならず予後悪性度診断としても有用であることが判明した。

胃癌に関しても同様に HER2 遺伝子増幅の解析を試みたが、安定した結果は得られず、今後更なる検討が必要と思われた。

(2) Micro RNA 解析

①胃癌

まず最初に遊離 microRNA が血漿中においても、exosome 内で極めて安定した状態で存在することを確認した。続いて、胃癌患者において既に異常の報告が多い microRNA を対象とした解析を行い、血漿 microRNA106b 濃度や microRNA106a/let7a 比が、胃癌の存在診断として有用であることを報告した。

②食道癌

胃癌での検討と同様に、食道癌担癌患者でも解析を行い、血漿中 miR-21 が、健常人に比較して高い傾向にあることを発見し、この値が、術前に比較して術後サンプルで有意に低下することも確認し、これら血漿中の miRNA が組織中の発現状況にある程度反映していると結論付けた。ROC 解析による存在診断としての有用性の検討では、miR-21/miR-375 比で良好な結果が得られた。

また、miR17-92 クラスターに存在する miR-18a についても解析を行った。miR-18a が食道癌細胞株や癌組織において、健常組織に比較して高値を示すことを確認し、続いて、食道癌担癌患者の血漿中 miR-18a が健常人に比較して有意に高値であることも確認した。ROC 解析でも血漿中 miR-18a 解析の診断的有用性が確認された。

③膵臓癌

膵臓癌でも同様に、miR17-92 クラスターに存在する miR-18a について解析を行った。miR-18a が膵臓癌細胞株や膵臓癌組織において、健常組織に比較して高値を示すことを確認した後、膵臓癌担癌患者の血漿中 miR-18a が健常人に比較して有意に高値であることを確認した。これらの値が術後に有意に低下

することも確認し、健常者との ROC 解析で膵臓癌に対する血漿中 miR-18a 解析の診断的有用性を確認した。

miR-221 ならびに miR-375 についての解析も行なった。miR-221 が膵臓癌細胞株や癌組織において、健常組織に比較して高値を示すことを確認した後、膵臓癌担癌患者における血漿中 miR-221 が、良性膵腫瘍や健常人血漿に比較して高い傾向であり、一方で miR-375 が低値であることを確認した。この値が、術前に比較して術後サンプルで有意に低下することも確認した。これら miR-221 解析は、遠隔転移症例や切除不能症例で高い傾向にあり、同解析の膵臓癌患者に対する存在診断としての有用性のみならず進行度予測にも有用であ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)

[雑誌論文] (計 10 件)

①Hirajima S, Ichikawa D, (他 14 名, 3 番目): Clinical impact of circulating miR-18a in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer, (in press) 査読有 doi: 10.1038/bjc.2013.148.

②Kawaguchi T, Ichikawa D, (他 13 名, 3 番目): Clinical impact of circulating miR-221 in plasma of patients with pancreatic cancer. Br J Cancer, 108;361-369(2013) 査読有 doi: 10.1038/bjc.2012.546.

③Komatsu S, Ichikawa D, (他 12 名, 2 番目): Prognostic impact of circulating miR-21 in the plasma of patients with gastric carcinoma. Anticancer Res, 33; 271-276(2013) 査読有

④ Ichikawa D, Komatsu S, (他 2 名, 1 番 目): Circulating microRNA in digestive tract cancers. *Gastroenterology*, 142; 1074-1078(2012) 査 読 有 doi: 10.1053/j.gastro.2012.03.008.

⑤ Konishi H, Ichikawa D, (他 12 名, 2 番 目): Detection of gastric cancer-associated microRNAs on microRNA microarray comparing pre- and post-operative plasma. *Br J Cancer*, 106; 740-747(2012) 査 読 有 doi: 10.1038/bjc.2011.588.

⑥ Komatsu S, Ichikawa D, (他 10 名, 2 番 目): Prognostic impact of circulating miR-21 and miR-375 in plasma of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Expert Opin Biol Ther*, 12(Suppl); S53-59(2012) 査 読 有 doi: 10.1517/14712598.2012.681373.

⑦ Komatsu S, Ichikawa D, (他 11 名, 2 番 目): Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 105;104-111(2011) 査 読 有 doi: 10.1038/bjc.2011.198.

⑧ Morimura R, Ichikawa D, (他 11 名, 3 番 目): Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 105: 1733-1740(2011) 査 読 有 doi: 10.1038/bjc.2011.453.

⑨ Tsujiura M, Ichikawa D, (他 10 名, 2 番 目): Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer*, 102;1174-1179(2010) 査 読 有 doi: 10.1038/sj.bjc.6605608.

⑩ Takeshita H, Ichikawa D, (他 10 名, 2 番 目): Prediction of CCND1 amplification using plasma DNA as a prognostic marker in

oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 102;1378-1383(2010) 査 読 有 doi: 10.1038/sj.bjc.6605657.

[学会発表] (計 4 件)

① 市川大輔 他: 基礎研究知見の臨床応用への翻訳 - 循環遊離 microRNA のバイオマーカーとして有用性 -. 第 67 回日本消化器外科学会総会 2012 年 7 月 富山

② 市川大輔 他: 胃癌における基礎研究知見の臨床応用 - 循環遊離 microRNA のバイオマーカーとしての有用性と問題点 -. 第 44 回胃病態機能研究会 2012 年 8 月 熊本

③ 市川大輔 他: 肺癌患者における血漿中 microRNA-18a 測定の意義についての検討. 第 70 回日本癌学会総会 2011 年 10 月 名古屋

④ 市川大輔 他: Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. 第 69 回日本癌学会総会 2010 年 10 月 大阪

[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]

特に無し.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 大輔 (ICHIKAWA DAISUKE)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号: 20347446