

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 6月20日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591468

研究課題名（和文） 胃癌の腹水微量癌細胞の分子生物学的診断法の開発

研究課題名（英文） Development of molecular diagnostic of minimal residual disease of gastric cancer in peritoneal fluids.

研究代表者

菊池 史郎（KIKUCHI SHIRO）

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：30161417

研究成果の概要（和文）：

独自に同定した胃癌特異的メチル化遺伝子 CD01 を用いて微量癌細胞診断を試みた。CD01 の癌組織における異常の頻度は高く、これまでわれわれが同定していた HOPX, Reprimo より有望なマーカーと考えられた。30 例の洗浄細胞診検体を用いて HOPX メチル化を検討した結果腹水癌細胞の検出ができなかったため、CD01 を標的とした癌検出を試みた。CD01 を用いた微量癌細胞の検出の検討では 1000 分の 1 の陽性細胞の存在は検出可能であり、またその感度は血液中の微量癌細胞の感度としては進行癌の 30%程度でありこれまでの検出感度を超えないことが判明した。よって、癌細胞の鋭敏な感度の検討として nested PCR や DNA 抽出条件の改良が必要であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We have identified cancer-specific methylation genes as HOPX, Reprimo, and CD01. HOPX was not detected in peritoneal fluids of advanced gastric cancer, so we started to examine CD01 potential for minimal residual disease. CD01 could be detected for cancer cells with CD01 methylation by 1/1000 dilution. Plasma of cancer patients showed poor quality of DNA, because sensitivity of beta-actin exhibited so. DNA detection in plasma of cancer patients showed in 30% of advanced gastric cancer, which is similar with classical tumor marker. So, we think that novel device is required for clinical application of DNA methylation by nested PCR or acquisition of good quality DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃癌、腹水、DNA診断、CD01、メチル化

1. 研究開始当初の背景

癌では Epigenetic な遺伝子変化の一つとして遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドの cytosine メチル化が生じている。癌特異的に生じる cytosine メチル化は癌抑制遺伝子のプロモーターに特徴的に認められ、癌組織でのメチル化頻度の高い遺伝子は癌検出マーカーとして体液診断に威力を発揮すると考えられる。われわれは独自に HOP/OB1/NECC1 遺伝子のメチル化の食道扁平上皮癌における臨床的意義を明らかにし、胃癌においても臨床的意義を検討してきた。HOP はこれまでに報告されている胃癌の既存癌抑制遺伝子 DNA メチル化の中で、Reprimo とともにもっとも高頻度に癌特異化メチル化を示し、胃癌の体液診断に特に有用な Biomarker であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胃癌の腹膜微小存在診断の感度を現在の細胞診レベルから DNA レベルに上げることにある。われわれは、独自の方法で同定した HOPX 遺伝子が胃癌において高いメチル化頻度を示し、その癌特異性も高いことを示してきた。これまで同様に高頻度メチル化が報告されている 10 個のメチル化遺伝子と比較しても HOPX は最も優れたバイオマーカー候補であり、それ以外に Reprimo も次点に良い遺伝子であることが証明されている。今後これからのメチル化バイオマーカーを組み合わせ、高い頻度で微量癌細胞存在診断を達成していくことが本研究の目的である。

具体的には胃癌の正確なステージ診断能を上げるため腹水洗浄細胞診の微量癌細胞

検出法の開発を目的として研究を企画した。微量癌細胞由来の DNA のメチル化を Methylation specific PCR (MSP) を用いて調べ、その臨床的意義を明らかにする。これまで DNA 定量の意義を明らかにするために、Real time PCR の感度を確認し、検体からの DNA を抽出することに成功している。その結果、感度としては 1000 分の 1 程度の微量癌細胞を検出できることが可能となったことを明らかにし、また DNA 検体としては 100 例分の bisulphite 処理が行われた。PCR をかけて検出率および臨床的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 2009 から 2012 年度の研究期間中に開腹手術を受けるすべての胃癌の開腹あるいは腹腔鏡下手術症例を対象とする。また、コントロールとして良性疾患—胆石症、クローン病、潰瘍性大腸炎でも開腹手術症例の場合は検体を集積する。検体採取例は全例細胞診に提出しその結果を得る。具体的には 200ml の生理食塩水を上腹部に投与しその後 head up にして douglas に貯留した洗浄液を 100ml 集める。これを 50ml ずつにわけて一方を DNA 診断にあてる。進行胃癌 300 例、早期胃癌 100 例、良性疾患 50 例を目標とする。

(2) 洗浄液は回収して DNA を抽出する。回収後は -80 度にいったん凍結保存し DNA 抽出時に再度融解する。洗浄液に存在する細胞由来の DNA を中心に集めるため、融解した洗浄液は遠心して細胞成分を沈殿させ上清は破棄する。細胞成分から DNA を抽出する。

DNA に関しては QIAamp DNA Mini Kit (QUIAGEN) を用いる。

(3) 抽出した DNA を 2 マイクログラム用いて、buislfate 処理を行う。Wizard DNA clean up kit で生成した一本鎖 DNA を得 PCR 解析まで -80 度で冷凍保存する。PCR 解析の際は plate ごとに同じ陽性コントロール、陰性コントロールを置くようにする。

4. 研究成果

(1) メチル化遺伝子としては前述の理由から HOP/OB1/NECC1 ではなく CD01 を用いた。CD01 遺伝子の陽性コントロールは DLD1、陰性コントロールは HepG2 とし、DLD1 を用いてメチル化レベルを標準化した。

(2) DLD1 を倍数あるいは 10 倍数希釈し検出感度の限界を測定したところ、1000 倍が限界感度であることが判明した。用いた検出用は TaqMan MSP を利用した Real time PCR であった。

(3) 進行癌 50 例の検討で、beta-actin の検出レベルが細胞株由来の DNA より 10 倍から 100 倍低いことが判明した。これは血漿中の DNA が degradation 産物など由来のため感度が低くなっていることを示唆する。したがって、より多くの DNA を用いて Nested PCR で癌由来 DNA を増幅させて後 TaqMan MSP を応用することがふさわしいと考えられた。実際に進行癌における CD01 メチル化 DNA の検出感度は 30%程度にとどまり、古典的腫瘍マーカーの感度を超えないことが判明した。

(4) 現在血漿を 8ml 採取して DNA を抽出する DNA 大量抽出法を用いた血液分析に向け

て倫理委員会に申請中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件) (すべて査読有)

- ① Sakuramoto S, Yamashita K, Kikuchi S, Futawatari N, Katada N, Watanabe M, Okutomi T, Wang G, Bax L. Laparoscopy versus open distal gastrectomy by expert surgeons for early gastric cancer in Japanese patients: short-term clinical outcomes of a randomized clinical trial. Surg Endosc. 2013 May;27(5):1695-705.
- ② Yamashita K, Sakuramoto S, Shibata T, Nemoto M, Mieno H, Katada N, Kikuchi S, Watanabe M. Survival outcome of laparoscopic gastrectomy for clinical early (cT1) gastric cancer. Surg Today. 2012 Oct 28. [Epub ahead of print]
- ③ Katada N, Sakuramoto S, Yamashita K, Shibata T, Moriya H, Kikuchi S, Watanabe M. Recent trends in the management of achalasia. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2012;18(5):420-8. doi: 10.5761/atcs.ra.12.01949
- ④ Yamashita K, Sakuramoto S, Nemoto M, Shibata T, Mieno H, Katada N, Kikuchi S, Watanabe M. Trend in gastric cancer: 35 years of surgical experience in Japan. World J Gastroenterol. 2011 Aug 7;17(29):3390-7. doi: 10.3748/wjg.v17.i29.3390
- ⑤ Kikuchi S, Futawatari N, Sakuramoto S, Katada N, Yamashita K, Shibata T, Nemoto M, Watanabe M. Comparison of staging between the old (6th edition) and new (7th edition) TNM classifications in advanced gastric cancer. Anticancer Res. 2011 Jun;31(6):2361-5.
- ⑥ Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, Sakuramoto S, Katada N, Waraya M, Kawamata H, Nishimiya H, Nakamura K, Watanabe M. Therapeutic potential of PRL-3 targeting and clinical significance of PRL-3 genomic

amplification in gastric cancer. BMC Cancer. 2011 Apr 6;11:122.
doi:10.1186/1471-2407-11-122

⑦ Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, Sakuramoto S, Katada N, Kokubo K, Kobayashi H, Kim MS, Sidransky D, Watanabe M. Potential utility of HOP homeobox gene promoter methylation as a marker of tumor aggressiveness in gastric cancer. Oncogene. 2010 Jun 3;29(22):3263-75.

doi: 10.1038/onc.2010.76

⑧ Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, Sakuramoto S, Katada N, Watanabe M. Phosphatase of regenerating liver-3 as a convergent therapeutic target for lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2010 Aug 1;127(3):543-54.

doi: 10.1002/ijc.25082

⑨ Sakuramoto S, Kikuchi S, Futawatari N, Moriya H, Katada N, Yamashita K, Watanabe M. Technique of esophagojejunostomy using transoral placement of the pretilted anvil head after laparoscopic gastrectomy for gastric cancer. Surgery. 2010 May;147(5):742-7.

doi: 10.1016/j.surg.2009.06.016

[学会発表] (計4件)

① 山下継史、桜本信一、片田夏也、柴田智隆、三重野浩朗、根本昌之、菊池史郎、渡邊昌彦 胃癌に対する腹腔鏡下胃全摘術:安全性と有効性について (ワークショップ) 第84回日本胃癌学会, 大阪, 2012.2.10

② 江間玲、山下継史、桜本信一、柴田智隆、三重野浩朗、根本昌之、片田夏也、菊池史郎、渡邊昌彦 進行胃癌術後化学療法 of 個別化を目指したリンパ節転移密度 (ND値) の予後的意義 (シンポジウム) 第84回日本胃癌学会, 大阪, 2012.2.10

③ 山下継史、桜本信一、三重野浩朗、柴田智隆、根本昌之、片田夏也、菊池史郎、渡邊昌彦 腹腔鏡下胃切除術前の 32-MDCT

Angiography を用いた肝動脈走行の評価 (要望演題) 第24回日本内視鏡外科学会, 大阪, 2011.12.7

④ Yamashita K., Sakuramoto S., Mieno H., Nemoto M., Shibata T., Katada N., Kikuchi S., and Masahiko Watanabe M. Preoperative 3D CT Angiography Assessment of Right Hepatic Artery Before Laparoscopic Gastrectomy, IASGO (Symposium), Tokyo, Japan, 2011.11.10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 史郎 (KIKUCHI SHIRO)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号: 30161417