

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 10 日現在

機関番号: 83901

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2010～2012

課題番号: 22591473

研究課題名(和文) 胃癌腹腔洗浄液中微小癌細胞の検出と遺伝子発現解析による
抗癌剤感受性予測法の確立

研究課題名(英文) Detection of free intraperitoneal cancer cells and chemosensitivity testing
using gene expression analysis for gastric cancer patients

研究代表者

伊藤 誠二 (ITO SEIJI)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍病理学部・研究員

研究者番号: 50393129

研究成果の概要(和文):

本研究では、遺伝子診断による腹膜微小転移の検出と、生物学的特性にもとづいた効果的な治療法とを一体として開発することを目的とする。CEA 低発現胃癌細胞株を用いた網羅的解析により、新規遺伝子を同定、高精度に腹膜微小転移の有無を判定する統計モデルを構築した。パクリタキセルの感受性細胞株、抵抗性細胞株を作成、その遺伝子発現を網羅的解析により親株と比較、臨床検体を用いた validation を経て、パクリタキセル抵抗性予測遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文):

This study aimed at integrated development of the genetic detection of peritoneal micrometastases and effective therapy based on biological characteristics of peritoneal micrometastases. Microarray analysis was performed for the cell lines with low CEA expression and new marker genes were identified. The predicting model for peritoneal metastasis was constructed. Both sensitive and resistant cell lines for paclitaxel were established and gene expression profiling was compared with parent cell line. The selected genes were validated by clinical samples and identified as paclitaxel-resistance related genes.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野: 生物系 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: 癌・微小転移・抗癌剤受性

1. 研究開始当初の背景

胃癌の死亡者数は年間5万人にのぼり、我が国における癌死亡の第2位を占めている。胃癌死亡の半数以上は腹膜転移・再発によるもので

あり、この克服は胃癌の診療上、最重要の課題である。現在、日常臨床で広く行われている腹腔洗浄細胞診の陽性所見 (CY1)は、腹膜転移陽性と同様に StageIV を意味し、ほぼ非治癒切

除と同義である根治度 C と判定されるが、その感度は 30% 程度と低い。申請者らは 1998 年に定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いた微小転移に対する高感度検出法を確立し(Int J Cancer, 2000)、洗浄細胞診陰性で、本遺伝子診断によりはじめて検出される腹腔内の少数の遊離癌細胞が、根治手術後の腹膜再発の原因になりうることを明らかにした(Ann Surg, 2002)。次いで 2000 年度から高度先進医療として前向き研究を行い、本法が細胞診陰性患者の腹膜再発予測およびリスク評価に有用であることを明らかにしてきており(Br J Cancer, 2005)、本法は 2007 年度から固形癌の DNA 診断として保険適用となっている。更に、従来の CEA を用いた定量的リアルタイム RT-PCR 法で問題となっていた、CEA 陰性胃癌による偽陰性を克服するために、cDNA マイクロアレイを用いた網羅的解析により CEA を補完する新規遺伝子マーカーの同定を行うとともに、約千個の遺伝子を搭載した腹腔洗浄液用オリゴ DNA チップを作成し、バイオインフォマティクス(学習機械マシンの SVM)の手法を用いて数十個の遺伝子よりなる高精度の診断法の確立にも着手してきたところである。

また、2000 年には、腹膜微小転移が化学療法に対して感受性が高く、微小転移段階で化学療法を開始することにより、少なくともその一部では再発阻止が可能であることを GFP 遺伝子を導入して作成したマウス微小転移モデルを用いて実験的に明らかにし(Cancer Sci, 2003)、遺伝子診断により腹膜転移を微小転移の段階で発見し、早期に適切な治療を開始することにより腹膜再発の予防をめざす新しいテイラーメイドの治療戦略を数年前から提唱してきた(Nova Scientific Publishers, 2007)。

この治療戦略に基づき、腹膜微小転移陽性胃癌に対して、経口抗癌剤である S-1 による補助化学療法の臨床試験を行ってきたが、全国規模の補助療法の臨床試験(ACTS-GC)の結果から、ある程度進行した胃癌症例に対しては S-1 による補助化学療法が標準治療となっているにもかかわらず、微小転移陽性胃癌症例に対する S-1 補助化学療法の効果は十分とはいえなかった。

一方、マウス微小転移モデルを用いた実験的検討では、パクリタキセルの腹腔内化学療法が腹膜微小転移に対して特に有効性が高いことを見出しており(Int. J. Oncol, 2005)、今後は腹膜微小転移に対する治療効果の増強を目指して、パクリタキセル腹腔内投与の意義が全国規模の

臨床試験で検証されようとしている。しかしながら、腹腔内投与には、術後腹腔内にポートを設置しなければならず、特有の手技の煩雑さやコスト、リスクが存在し、経口抗癌剤のように一律に全対象症例に行うことには異論もある。そこで、補助療法を行うべき腹膜微小転移症例絞り込みのために、微小転移検出精度の更なる向上が必要であり、更に、補助療法使用薬剤決定のための抗癌剤感受性予測法の確立が不可欠であると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに我々が開発してきた高精度な遺伝子診断による腹膜微小転移の検出と、腹膜微小転移の生物学的特性にもとづいた効果的な治療法とを一体として開発することにより、胃癌の再発形式として最も頻度の高い腹膜再発を予防し、胃癌患者の生存率を大幅に改善することを目的とする。そのために、(1) 遺伝子診断精度の更なる向上、(2) 補助療法使用薬剤決定のための腹腔洗浄液中微小癌細胞の遺伝子発現解析による抗癌剤感受性予測法の確立、(3) 抗癌剤腹腔内投与の臨床試験の推進を目指す。

3. 研究の方法

(1) 高精度の遺伝子診断を可能とするための新規遺伝子マーカーの探索

CEA 低発現胃癌細胞株を用いた網羅的解析により CEA を補完する新規遺伝子マーカーが同定されており、これら新規遺伝子を用いた統計モデルを確立することにより、Multiplex RT-PCRを開発する。定量 Multiplex RT-PCRには Universal probe library probe を用いる。これにより同一条件下で PCR を行えるため、一回の RT-PCR(2-3時間)で相互干渉の問題なく簡便かつ正確な測定が可能である。これにより偽陰性を減らし、陽性的中率の向上が期待できる。

(2) パクリタキセル腹腔内化学療法に対する感受性予測法の開発

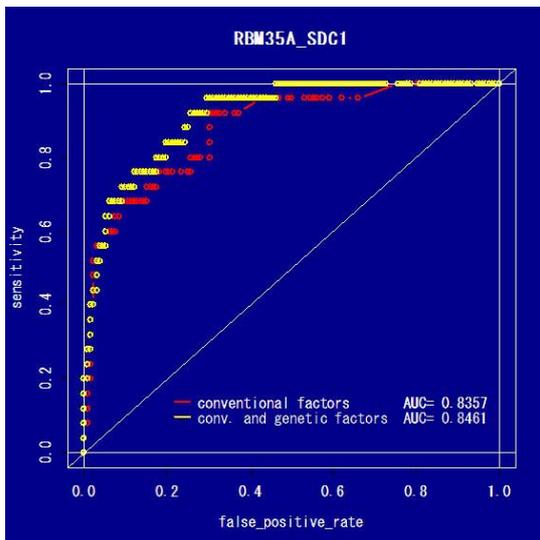
パクリタキセルの感受性あるいは抵抗性に関連する遺伝子を探索するために、パクリタキセルの腹腔内化学療法に対して感受性を示す細胞株と抵抗性を示す胃がん細胞株の作成を行い、in vivo selection により既に 1 株の抵抗性株を樹立している。3種類の由来の異なる抵抗性株を作成し、これらの細胞株の遺伝子発現をマイクロアレイなどを用いた網羅的解析により親株と比

較、感受性細胞株あるいは抵抗性細胞株で高発現、あるいは低発現する共通の遺伝子を同定する。

4. 研究成果

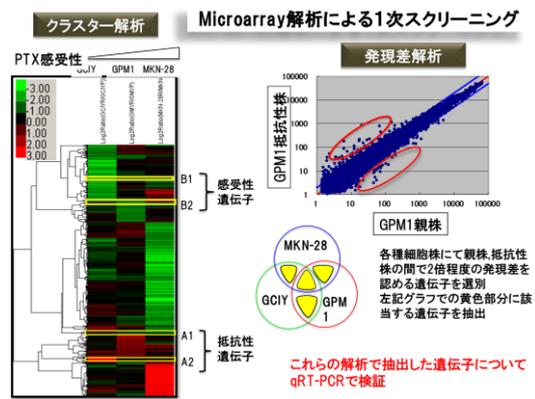
(1) 高精度の遺伝子診断を可能とするための新規遺伝子マーカーの探索

cDNA マイクロアレイを用いた網羅的解析により、SPINK、RegIV、PKP3、RBM35A、SDC1などの新規遺伝子を同定、これら個々の遺伝子の予後予測能を確認すると同時に、従来からの臨床病理学的因子も加え、高精度に腹膜微小転移の有無を判定する統計モデルを構築した。腹膜転移再発を予測するこのモデルのROC curve解析を行い、従来からの臨床病理学的因子のみによるモデルではROC curveのAUC=0.8357に対し、遺伝子発現を加えたモデルのAUC=0.8461と改善が得られた。



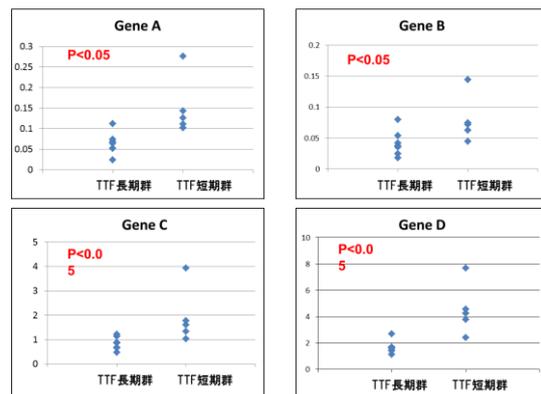
(2) パクリタキセル腹腔内化学療法に対する感受性予測法の開発

パクリタキセル腹腔内化学療法に対する感受性予測法の開発について、昨年度までにパクリタキセルの腹腔内化学療法に対して感受性を示す細胞株と抵抗性を示す胃癌細胞株の作成を行い、3種類の由来の異なる抵抗性株を作成、これらの細胞株の遺伝子発現をマイクロアレイを用いた網羅的解析により親株と比較、パクリタキセル抵抗性に相関し発現亢進する遺伝子を1次選別し、これらのうち9個の遺伝子についてqRT-PCRにより発現差を確認した。さらに発現低下する遺伝子についても検討し、5個のパクリタキセル感受性遺伝子候補を同定した。



TTF(time to treatment failure)をもとに PTX 高感受性群、低感受性群に二分した臨床検体(新鮮凍結切除材料)を用いて validationを行い、微小管関連遺伝子や EMT 関連遺伝子(KIF23, ATAD2, PHF19, SNAI1, ERBB2IP)など 5 個の遺伝子を PTX 抵抗性予測遺伝子として選別した。これらの遺伝子は PTX 治療抵抗性を示す検体で有意に高値を示し、胃癌臨床検体でも有用性が検証された。

qRT-PCR



(3) 抗癌剤腹腔内投与の臨床試験の推進

当初、本期間中に、高精度の遺伝子診断法、抗癌剤感受性予測を反映した、腹腔内化学療法の臨床第2相試験を計画する予定であったが、別組織で薬剤の保険適応を目指した臨床試験が行われており、本期間中の着手は困難な状況であった。

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 4 件)

①Murakami H, Nakanishi H, Tanaka H, Ito S, Misawa K, Ito Y, Ikehara Y, Kondo E, Kodera Y.

Establishment and characterization of novel gastric signet-ring cell and non signet-ring cell poorly-differentiated adenocarcinoma cell lines with low and high malignant potential Gastric Cancer, 査読有, 16(1)74-83, 2013 DOI「10.1007/s10120-012-0149-2」

②Kodera Y, Ito S, Mochizuki Y, Ohashi N, Tanaka C, Kobayashi D, Kojima H, Matsui T, Kondo K, Fujiwara M.
Long-term follow up of patients who were positive for peritoneal lavage cytology final report from the CCOG0301 study Gastric Cancer, 査読有, 15, 335-337, 2012 DOI「10.1007/s10120-012-0156-3」

③Fukagawa T, Sasako M, Ito S, Nakanishi H, Iinuma H, Natsugoe S, Katai H, Shimoda T.
The prognostic significance of isolated tumor cells in the lymph nodes of gastric cancer patients Gastric Cancer 査読有, 13(3)191-196, 2010 DOI「1007/s10120-010-0556-1」

④Ito S, Kodera Y, Mochizuki Y, Kojima T, Nakanishi H, Yamamura Y
Phase II clinical trial of postoperative S-1 monotherapy for gastric cancer patients with free intraperitoneal cancer cells detected by real-time RT-PCR World Journal of Surgery 査読有, 34(9)2083-2089, 2010 DOI「10.1007/s00268-010-0573-6」

〔学会発表〕(計9件)

①高張大亮、石神浩徳、福島亮治、梨本篤、藪崎裕、小寺泰弘、伊藤誠二、今本治彦、今野元博、藤原義之、田中淳二、上之園芳一、山口拓洋、山口博紀、北山丈二
腹膜播種を伴う胃癌に対する腹腔内投与併用化学療法の有用性を検証する第III相試験(PhoenixGC試験)
第99回日本消化器病学会総会/かごしま県民交流センター(鹿児島)2013/03/23

②廣野靖夫、石神浩徳、小寺泰弘、福島亮治、今本治彦、今野元博、梨本篤、藪崎裕、上之園芳一、川崎普司、藤原義之、伊藤誠二、山口博紀、北山丈二

腹膜播種陽性胃癌に対するパクリタキセル腹腔内投与併用化学療法の有用性を検証する第III相試験(Phoenix-GC試験)
第74回日本臨床外科学会総会/新宿NSビル(東京)2012/11/29

③Yusa A, Masuda T, Yamamoto S, Niimi M, Douke H, Okochi M, Toneri M, Ito S, Honda H, Arai F, Nakanishi H.
Development of rapid isolation device for circulating tumor cells (CTCs) using size-based filtration method and its application for single cell gene expression analysis
3rd Annual Meeting World CTC/Hyatt Regency (Boston, USA) 2012/11/13

④伊藤誠二、伊藤友一、三澤一成、清水泰博、木下平
胃癌治療の過去と未来胃癌の集学的治療の近未来
第50回日本癌治療学会学術集会/パシフィコ横浜(横浜)2012/10/25

⑤中西速夫、近藤千紘、伊藤誠二、伊藤友一、室圭、近藤英作
ハーセプチン抵抗性を示す新規日本人胃癌由来HER2陽性IHC2+/FISH+胃癌細胞株の樹立とその耐性機構
第71回日本癌学会学術総会/札幌市教育文化会館(札幌)2012/09/21

⑥中西速夫、田中晴成、伊藤誠二、近藤英作
HER2陽性胃癌細胞のTrastuzumab耐性株におけるp95HER2およびMUC4の発現
第84回日本胃癌学会総会/大阪国際会議場(大阪)2012/2/9

⑦Murakami H, Ito S, Tanaka H, Ohashi N, Nakayama G, Koike M, Fujiwara M, Kodera Y, Kondo E, Nakanishi H.
Comprehensive analysis of predictive markers for paclitaxel-resistance against peritoneal metastasis of gastric cancer
第70回日本癌学会学術総会/名古屋国際会議場(名古屋)2011/10/4

⑧Nakanishi H, Ito S, Tsuchida D, Kodera Y.
Molecular aspect of peritoneal metastasis
A new diagnostic and therapeutic strategy in

gastric cancer
9th International Gastric Cancer Congress
Coex Center(Seoul)2011/04/22

⑨中西速夫、大島由記子、伊藤誠二、三澤一成、小寺泰弘、近藤英作
HER2 過剰発現胃癌細胞に対する分子標的治療の検討
第 83 回日本胃癌学会総会/古牧温泉青森屋
(三沢市)2010/3/5

[図書](計 2 件)

①中西速夫、舎人誠、村上弘城、伊藤友一、三澤一成、伊藤誠二
“胃癌腹腔内微小転移のメカニズムとその検出“
臨床外科 68(6)636-640,120,2013

②Nakanishi H,Ito S, Matsui M, Misawa K, Kodera Y.
“In Vivo Imaging” Methods and Protocols,
Hoffman, R. M. (ed.), Non invasive and real-time
fluorescence imaging of peritoneal metastasis in
nude mice
Humana Press, Totowa, NJ(872)85-95,269,2012

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)
名称:微粒子分離用マイクロ流路チップ、該チップを用いた微粒子分離用システム及び微粒子分離方法
発明者:新井史人、益田泰輔、新美京、中西速夫、伊藤誠二
権利者:名古屋大学、愛知県がんセンター
特許番号:2012-227717
出願年月日:2012 年 10 月 15 日
国内外の別:国内
○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 誠二 (ITO SEIJI)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍病理学部・
研究員

研究者番号:50393129