

## 16-10 がんの早期診断およびに予後診断に役立つ腫瘍マーカーの開発

主任研究者 国立病院機構大阪医療センター 中森 正二

### 研究成果の要旨

がんの早期診断に応用可能である腫瘍マーカーとして、大腸がん早期診断に尿中ジアセルスペルミンが有用であること、遺伝子のメチル化異常を指標とした便中の DNA 診断による消化器癌の早期診断の可能性を明らかにした。さらに、肺がん、膵がん、食道がん、乳がんにおいて、それぞれのがん特異的発現遺伝子群をクラスター解析法により選別し、新たな腫瘍マーカーとして利用可能な遺伝子候補を見いだした。新技術の応用として、質量分析装置を利用した網羅的蛋白解析や網羅的ペプチド解析技術を確立し、新たな腫瘍マーカー選別法としての可能性を明らかにした。予後診断に役立つ腫瘍マーカーの開発として、がんの発生あるいは進展に関与する遺伝子群を網羅的遺伝子発現解析の技術を利用して選別し、臨床例において検証し、予後推測腫瘍マーカー候補を選別した。また、網羅的遺伝子発現解析により、各種がんに対する化学療法の効果予測関連する遺伝子群を選別し、治療効果予測式を確立、臨床例における抗癌剤効果予測の可能性を検証し、がんの個別化治療の指標として応用可能であることを明らかにした。

### 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
中森 正二	* <sup>1</sup> 大阪大学大学院医学系研究科 助教授 * <sup>2</sup> 国立病院機構大阪医療センター 部長	がんの早期診断およびに予後診断に役立つ腫瘍マーカーの開発
渡邊 昌彦	北里大学医学部 教授	癌と細胞外マトリックスの相互作用を担う新しい生体内物質の同定とその臨床的意義
井上 裕	九州大学生体防御医学研究所 助教授	消化器がんの術前遺伝子診断法とその応用としての腫瘍マーカーの開発
西山 正彦	広島大学原爆放射線医科学研究所 教授	がん化学療法の個別化に資する治療応答予測マーカー
山本 博幸	札幌医科大学医学部 助手	消化器がんの早期および予後診断に役立つ遺伝子診断の開発
梁 幾勇	東京大学医科学研究所 講師	がんの転移浸潤に関わる分子の解析およびそれを利用した予後予測マーカーの開発

\*1：平成16年4月1日～平成16年8月31日

\*2：平成16年9月1日～平成18年3月31日

## 研究報告

### 1 研究目的

腫瘍マーカーの意義は、非侵襲的に採取された生体材料から検出される物質で、がんの早期発見や治療方針の決定に寄与する事にある。本研究班では、がん患者の体液（血液、尿等）や生検組織や切除組織などの生体材料の解析から得られたがん特異的あるいは病態特異的な遺伝子やその産物、酵素、糖鎖抗原、生理活性物質から腫瘍マーカーとして有用な分子を新たに見だし、それらを新たながん治療体系の構築に反映させることを目的とした。さらに、本研究班では、近年の新たな分子生物学的解析技術を腫瘍マーカー開発のための手法として確立することも目的とした。

### 2 研究方法

研究方法として、早期診断のための腫瘍マーカーの開発をめざして、従来の腫瘍マーカーの対象である血液ではなく、尿や便に着目した。尿では、ジアセチルスペルミンに着目し、大腸がんを中心に多数症例において早期診断の腫瘍マーカーとして利用可能かを検証した。さらに、便を対象とした腫瘍マーカーとして、便中 DNA に着目し、消化器がんの早期診断マーカーに成り得るかを検討した。また、新しい技術を利用した早期診断腫瘍マーカーの開発のために、尿中ペプチドの網羅的解析技術の開発を行った。予後診断のための腫瘍マーカー開発に関しては、数多くのがん組織やがん細胞を用いて行ったがん網羅的遺伝子解析結果から得られた成果を臨床例において検証し、腫瘍マーカーとしての利用の可能性を検討した。

### 3 研究成果

#### 1) 早期診断マーカー開発と新技術の応用

がんと関連性が報告されているジアセチルスペルミン (DiAcSpm) に着目し、大腸がん患者 250 例および大腸良性疾患 51 例を対象に尿中 DiAcSpm 濃度を測定した。その結果、早期がんと考えられる stage0 と I 大腸がんの 60% 以上の陽性率を示し、尿中 DiAcSpm が早期大腸がん診断マーカーと成り得ることを明らかにした。これとは別に、DNA メチル化異常スクリーニング法を開発し、消化器がん便中 DNA を対象にがんのスクリーニングが可能かを検討し、いくつかの遺伝子断片におけるメチル化異常を指標とすることで、大腸がんや膵がんなどの消化器がんスクリーニングが可能であることを明らかにした。

さらに、質量分析装置を利用した網羅的蛋白解析装置

やペプチド解析装置を用いて、新たな腫瘍マーカーの開発に取り組んだ。生体材料として採取が最も容易な尿を利用した新たな腫瘍マーカー開発の基礎的検討を行い、大量の代謝産物や塩など複雑な混合物が存在する中から、微量の蛋白質およびペプチドの網羅的解析を迅速におこなえる方法を確立し、早期診断の困難な膵がんにおいて、がん特異的ペプチドが検出されることを明らかにし、この特異的ペプチドをマーカーとした検出法の確立を行った。また、肝臓がん、肺がん、膵がん、食道がん、乳がんの臨床材料を用いて、網羅的遺伝子発現解析の結果を利用して、それぞれのがん特異的発現遺伝子群をクラスター解析法により選別し、新たな腫瘍マーカーとして利用可能な遺伝子候補を見いだした。

#### 2) 治療方針の決定に関わる腫瘍マーカーの開発

難治がんの一つであるスキルス胃がんにおいて、繊維化に関与すると考えられるコラーゲン産生に特異的な分子シャペロンである heat shock protein 47 (HSP47) がスキルス胃がんを高率に発現していることを明らかにし、スキルス胃がん患者および大腸がん患者において HSP47 が予後推測のための新たな腫瘍マーカーになり得る可能性を示した。また、脂質キナーゼ PIK3CA に着目し、食道がんの発生に関与するかその突然変異を調べた。その結果、PIK3CA が食道がん発生に関与している可能性を示した。この他、肝切除時の非がん部肝組織の網羅的遺伝子発現解析により、肝細胞がんの再発や多中心発生に関わる遺伝子群を選別し、それらを用いて、残肝再発リスクの予測スコア式を作製し、肝細胞がん治療後の治療方針決定に利用できる可能性を示した。

治療のための分子標的としては、インスリン様増殖因子-1 受容体 (IGF-1r) を介したシグナル伝達が食道がんの予後因子および分子標的と成り得ることを明らかにした。

#### 3) 治療の個別化のための腫瘍マーカーの開発

高度進行肝細胞がんに対して、有効な治療であるインターフェロン  $\alpha$  併用 5-FU 動注療法施行例において、その感受性を規定する遺伝子群を網羅的遺伝子発現解析法にて選別し、スコア化によって、本治療法の高感受性群および予後良好群選別の可能性を示した。また、難治がんの代表である膵がんに対して唯一有効性が認められている抗癌剤である gemcitabine の感受性に関わる分子を網羅的遺伝子発現解析から見出し、膵がん治療の個別化治療のためのマーカーとなる可能性を明らかにした。

さらに、ヒト腫瘍細胞株を用い、網羅的遺伝子発現解析を行い、抗がん剤 8 種の感受性に関連する遺伝子群を

求め、効果予測に有用な遺伝子を明らかにし、これら遺伝子を用いて効果予測系を作成した。

#### 4 倫理面への配慮

本研究における患者材料を用いた検討は、すべて各研究者の所属施設の倫理委員会の審査の承認を得た後に行われたものである。

#### 研究成果の刊行発表

##### 外国語論文

1. Kurokawa, Y., Nakamori, S., et al., Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers. *Int. J. Oncol.*, 28:383-391, 2006.
2. Yamamoto, S., Nakamori, S., et al., Expression level of valosin-containing protein (p97) is associated with prognosis of esophageal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 10(16): 5558-5565, 2004.
3. Kurokawa, Y., Nakamori, S., et al., Molecular-based prediction of early recurrence in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 41: 284-291, 2004.
4. Kurokawa, Y., Nakamori S, et al., Molecular prediction of response to 5-fluorouracil and interferon-alpha combination chemotherapy in advanced hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 10:6029-6038, 2004.
5. Komori T, Nakamori S, et al., Identification of differentially expressed genes involved in colorectal carcinogenesis using a cDNA microarray. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 23:521-527, 2004.
6. Hashiguchi, N., Watanabe, M., et al., TZT-1027 elucidates antitumor activity through direct cytotoxicity and selective blockade of blood supply. *Anticancer Res.*, 24: 2201-2208, 2004.
7. Mimori K., Inoue H., et al., FHIT is up-regulated by inflammatory stimuli and inhibits prostaglandin E2-mediated cancer progression. *Cancer Res.*, 66: 2683-2690, 2006.
8. Sonoda, H., Inoue H., et al., Significance of skp2 expression in primary breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 12: 1215-1220, 2006.
9. Ogawa, K., Inoue H., et al., Differential gene expression profiles of radioresistant pancreatic cancer cell lines established by fractionated irradiation. *Int. J. Oncol.*, 28: 705-713, 2006.
10. Ogawa, K., Inoue, H., et al., Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11: 2889-2893, 2005.
11. Nagahara, H., Inoue, H., et al., Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 11: 1368-1371, 2005.
12. Shimokuni, T., Nishiyama M., et al., Chemosensitivity prediction in esophageal squamous cell carcinoma: Novel marker genes and efficacy-prediction formulae using their expression data. *Int. J. Oncol.*, 28: 115301162, 2006.
13. Komatsu, M., Nishiyama M., et al., Prediction of individual response to platinum/paclitaxel combination using novel marker genes in ovarian cancers. *Mol. Cancer Ther.*, 5: 767-775, 2006.
14. Miyazu, YM., Nishiyama M., et al., Telomerase expression in noncancerous bronchial epithelia is a possible marker of early development of lung cancer. *Cancer Res.*, 65: 9623-9627, 2005.
15. Ukon, K., Nishiyama, M., et al., Activator protein accelerates dihydropyrimidine dehydrogenase gene transcription in cancer cells. *Cancer Res.*, 65: 1055-1062, 2005.
16. Hiyama, K., Nishiyama, M., et al., Differentially expressed genes throughout the cellular immortalization processes are quite different between normal human fibroblasts and endothelial cells. *Int. J. Oncol.*, 27: 87-95, 2005.
17. Kurokawa, S., Yamamoto, H., et al., Tumour matrilysin expression predicts metastatic potential of stage I (pT1) colon and rectal cancers. *Gut*, 54: 1751-1758, 2005.
18. Noshio, K., Yamamoto, H., et al., Laterally spreading tumour in which interstitial deletion of beta-catenin exon 3 was detected. *Gut*, 54: 1504-1505, 2005.
19. Taniguchi, H., Yamamoto, H., et al., Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene*, 24: 7946-7952, 2005.
20. Noshio, K., Yamamoto, H., et al., Gene expression profiling of colorectal adenomas and early invasive carcinomas by cDNA array analysis. *Br. J. Cancer*, 92: 1193-200, 2005.