

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を明らかにするとともに、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検討した。さらに、早期診断のために網羅的ペプチド解析の手技を用いた尿検体解析技術を確立し、がん特異的分子の尿中からの検出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、網羅的遺伝子発現解析により、進行肝臓がんに対する 5-FU+INF 治療の効果予測関連する遺伝子群を選別し、治療効果予測式を明らかにした。また、網羅的遺伝子発現解析に基づいた遺伝子群の設定により、胃癌化学療法にあたっての抗癌剤効果予測系を確立した。この他、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。難治がんである膵がんの化学療法感受性に関わる分子を薬剤耐性株を用いて明らかにし、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	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

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ている。さらに、近年、分子生物学的解析により、発生・進展といったがんの生物学的特性に関連する分子が数多く見いだされており、それに付随して、さまざまな解析技術の進歩が見られる。本研究班では、このような新たな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ている。新たに開発した腫瘍マーカーが早期診断、治療効果の予測因子として機能すれば、個別化したがん治療が可能となり、治療成績の向上が期待できるものと考えられる。

2 研究方法

本年度の研究方法として、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、従来からがん関連のポリアミンとして知られていた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。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。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。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

現時点において、血液を対象とした腫瘍マーカーを用いたがんとくに消化器がんの早期診断あるいはスクリーニングは難しいとされている。そこで、血液以外に対象となり得る尿、便に着目して、がんの早期診断あるいはスクリーニングのマーカーを開発する事を試みた。まず、がんとの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

上の陽性率を示した。一方、良性疾患の陽性率は、腺腫や腸閉塞、痔疾患で 0-13%であるものの、炎症性腸疾患では、50-100%の陽性率で、高度異形腺腫や活動性炎症において、陽性となる傾向を認めしたが、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、渡邊班員らは、SELEX 法によって得た新規ヒトホメオボックス蛋白質 ESXR1 が新規がん精巢抗原であることを明らかにして、新規腫瘍マーカーとしての可能性を明らかにした。さらに西山班員らは、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

がんの生物学的な特徴、浸潤や転移の程度、再発の可能性や再発形式を予測することは、治療方針決定において必須である。渡邊班員らは、難治がんの一つであるスキルス胃がんにおいて、びまん性浸潤と著しい間質の繊維化に着目し、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) がスキルス胃がんで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、肝硬変患者において HSP47 血中濃度を測定した。その結果、肝硬変など繊維化の生じた病態では HSP47 陽性率は低いにもかかわらず、スキルス胃がん患者、大腸がん患者における血液中 HSP47 陽性率は高く、病勢とも相関することを明らかにし、HSP47 がスキルス胃がんや大腸がんの新たな腫瘍マーカーになり得る可能性を示した。

井上班員らは、悪性腫瘍の発生・進展に関わるとされ脂質キナーゼ 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、36%の食道がんに突然変異が存在することを明らかにし、PIK3CA が食道がん発生・進展に関与している可能性を示し、その進展度指標および治療のための分子標的となり得ることを示した。また、中森班員らは、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。

山本班員らは、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いくつかの消化器がんにおいて発生。進展に関与していることを明らかにし、IGF-1r 発現が食道がんの予後因子となり得ること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

がん治療において、抗がん剤を利用した治療は重要な部分を占めるが、副作用や感受性の点から、個別化した治療が今後重要となる。中森班員らは、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 α 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の抗がん剤耐性株を樹立し、膵がんに対して唯一有効性が認められている抗がん剤である 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、臨床例においてその検証を行い、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。

西山班員らは、ヒト腫瘍細胞株 60 株を用い、網羅的遺伝子発現解析を行い、対象細胞株における全遺伝子の発現量と抗がん剤感受性との順位相関によって抗がん剤 8 種の感受性に関連する遺伝子群を求め、そのなかから機能の証明された遺伝子群を抽出、個々の遺伝子の発現量の再現性確認を経て、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予測式、すなわちそれら遺伝子の発現量を代入すると効果が定量的に算出される効果予測系を作成した。さらに、このように細胞実験系で選出された遺伝子を用い、臨床症例を用いた照合研究によって高度進行胃がんを対象とした 5-FU 化学療法の効果予測式を確立し、抗がん剤治療の個別化の可能性を示した。

梁班員らは、がん細胞の浸潤とそれに伴う血管新生に

着目し、浸潤や血管新生に関与する細胞膜酵素: MT1-MMP の発現制御メカニズムと、がん治療における分子標的の可能性について検討した。その結果、動物実験において、がんの進展する早期に一過的 MT1-MMP 発現を伴う脈管新生が生じ、その後局所の循環系の構築と共にその発現は消失することを明らかにし、MT1-MMP ターゲットにした抗腫瘍療法を展開する場合、がん浸潤早期における使用が重要であることを明らかにした。

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。また、動物実験は、各所属施設に定める動物実験倫理規定に従って進められたものである。

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. Morimoto, O., Nakamori S, et al., Association Between Recurrence of Hepatocellular Carcinoma and alpha-Fetoprotein Messenger RNA Levels in Peripheral Blood. *Surg. Today*, 35:1033-1041, 2005.
3. Damdinsuren, B., Nakamori, S., et al., Expression of Id proteins in human hepatocellular carcinoma: Relevance to tumor dedifferentiation. *Int. J. Oncol.*, 26: 319-327, 2005.
4. Kondo, M., Nakamori, S., et al., Combination of IFN-alpha and 5-fluorouracil induces apoptosis through IFN-alpha/beta receptor in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.*, 11: 1277-1286, 2005.
5. Ota, H., Nakamori, S., et al., Treatment of hepatocellular carcinoma with major portal vein thrombosis by combined therapy with subcutaneous interferon-alpha and intra-arterial 5-fluorouracil; role of type 1 interferon receptor expression. *Br. J. Cancer*, 93: 557-564, 2005.
6. 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.
7. Yamamoto, S., Nakamori, S., et al., Valosin-containing protein (p97) and Ki-67 expression is a useful marker in detecting malignant behavior of pancreatic endocrine neoplasms. *Oncology*, 66: 468-475, 2004.
 8. Kurokawa, Y., Nakamori, S., et al., Molecular-based prediction of early recurrence in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 41: 284-291, 2004.
 9. 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.
 10. Yamamoto T, Nakamori S, et al., Partial contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/TRAIL receptor pathway to antitumor effects of interferon-alpha/5-fluorouracil against Hepatocellular Carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 10: 7884-7895, 2004.
 11. 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.
 12. 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.
 13. Kikuchi, S., Watanabe, M., et al., Role of Endoscopic clipping for determining the resection line for tumors located in the middle or upper corpus of the stomach: experience with 100 gastrectomies for early gastric cancer. *Anticancer Res.*, 24: 4163-4168, 2004.
 14. Ueno, T., Watanabe, M., et al., Effect over time of endotoxin adsorption therapy in sepsis. *Ther. Apher. Dial.* 9: 128-136, 2005.
 15. 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.
 16. Sonoda, H., Inoue H., et al., Significance of *skp2* expression in primary breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 12: 1215-1220, 2006.
 17. 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.
 18. Ogawa, K., Inoue H., et al., Genomic screens for genes upregulated by demethylation in colorectal cancer: possible usefulness for clinical application. *Int. J. Oncol.*, 27: 417-426, 2005.
 19. Nishida, K., Inoue, H., et al., Global analysis of altered gene expressions during the process of esophageal squamous cell carcinogenesis in the rat: a study combined with a laser microdissection and a cDNA microarray. *Cancer Res*, 65: 401-409, 2005.
 20. Tsutsui, S., Inoue, H., et al., Reduced expression of PTEN protein and its prognostic implications in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncology*, 68: 398-404, 2005.
 21. 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.
 22. Mimori, K., Inoue, H., et al., Clinical significance of enhancer of zeste homolog 2 expression in colorectal cancer cases. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 31: 376-380, 2005.
 23. Utsunomiya, T., Inoue, H., et al., Clinicopathologic and prognostic values of apolipoprotein D alterations in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer*, 116: 105-109, 2005.
 24. Nagahara, H., Inoue, H., et al., Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 11: 1368-1371, 2005.
 25. Sudo, T., Inoue H., et al., Clinicopathological significance of *EZH2* mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer*, 92: 1754-1758, 2005.
 26. Utsunomiya, T., Inoue H, et al., Expression of cancer-testis antigen (CTA) genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol*, 11: 934-940, 2004.
 27. Yamaguchi H, Inoue H, et al., Identification of HLA-A24-restricted CTL epitope from cancer-testis antigen, NY-ESO-1, and induction of a specific antitumor immune response. *Clin. Cancer Res.*, 10: 890-896, 2004.
 28. 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:

- 1153-1162, 2006.
29. 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.
 30. 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.
 31. Ukon, K., Nishiyama, M., et al., Activator protein accelerates dihydropyrimidine dehydrogenase gene transcription in cancer cells. *Cancer Res.*, 65: 1055-1062, 2005.
 32. Nishiyama, M., Cancer pharmacogenomics: progress and obstacles toward the goal. *Int. J. Clin. Oncol.*, 10: 3-4, 2005.
 33. 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.
 34. Noguchi, T., Nishiyama, M., et al., Aberrant methylation of DPYD promoter, DPYD expression, and cellular sensitivity to 5-fluorouracil in cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 10: 7100-7107, 2004.
 35. Kuwai, T., Nishiyama, M., et al., Single nucleotide polymorphism in the hypoxia inducible factor-1 gene in colorectal carcinoma. *Oncol. Rep.*, 12: 1033-1037, 2004.
 36. 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.
 37. Nosho, K., Yamamoto, H., et al., Laterally spreading tumour in which interstitial deletion of beta-catenin exon 3 was detected. *Gut*, 54: 1504-1505, 2005.
 38. Taniguchi, H., Yamamoto, H., et al., Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene*, 24: 7946-7952, 2005.
 39. Nosho, K., Yamamoto, H., et al., Gene expression profiling of colorectal adenomas and early invasive carcinomas by cDNA array analysis. *Br. J. Cancer.*, 92: 1193-1200, 2005.
 40. Nosho, K., Yamamoto, H., et al., Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26: 892-899, 2005.
 41. Yamamoto, H., et al., Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and overexpression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis*, 25: 325-332, 2004.
 42. Yamamoto, H., et al., Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 25: 2353-2360, 2004.
 43. Nosho, K., Yamamoto, H., et al., Interplay of IGF-II, IGF-I, IGF-I receptor, COX-2, and MMP-7 plays key roles in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 10: 7950-7957, 2004.
 44. Domingo, E., Yamamoto, H., et al., Braf screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J. Med. Genet.*, 41: 663-667, 2004.
 45. Nonaka, T., Yana, I., et al., Competitive disruption of the tumor-promoting function of membrane type 1 matrix metalloproteinase/matrix metalloproteinase-14 in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 4:1157-1166, 2005.
 46. Komori, K., Yana, I., et al., Absence of mechanical allodynia and Abeta-fiber sprouting after sciatic nerve injury in mice lacking membrane-type 5 matrix metalloproteinase. *FEBS Lett.*, 557: 125-128, 2004.