

## 16-16 生検組織を用いた消化器がん・肺がんの治療感受性予知法および治療効果判定法の確立に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 落合 淳 志

### 研究成果の要旨

生検組織を対象にした病理形態学的情報・ゲノム情報・遺伝子発現情報・タンパク情報の採取における問題点を明らかにし、生検組織からの情報取得技術の確立によるがん治療の感受性予知及び効果判定に有効な新しい病理診断学の確立を目指すものである。平成16年・17年度の研究成果として以下のことを明らかにした。1) ヒト生検組織を用いた治療法の選択や抗がん剤感受性の予知のための条件の検討と同一症例の生検と手術材料を用い比較した。2) ゲノムワイド発現解析に基づく生検サンプルによる遺伝子診断と治療感受性予知法の確立を試みた。3) 生検組織を用いたプロテオーム解析による治療関連分子の解析のため、発現タンパク質のプロファイリングと、抗体の作製を行った。4) 肝細胞がん術前の肝障害度の評価および残肝再発の予測を、極細生検針からのRNA採取材料による確立を試みた。5) 直腸がんに対する術前補助療法における感受性予測法の確立を行い、生検組織を用いた予知診断の可能性を示すことが出来た。

### 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
落合 淳 志	国立がんセンター東病院臨床開発センター 部長	生検組織を用いた治療感受性予知法
佐々木博己	国立がんセンター研究所 室長	各種生検組織の分子生物学的多様性に基づく遺伝子診断法の至適化技術の開発
佐藤 雄 一	北里大学医療衛生学部 助教授	生検組織を用いたプロテオーム解析による治療関連分子の解析のための検討
大上 直 秀	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助手	SAGE-based microarray を用いた微小検体の遺伝子発現解析と薬剤感受性の評価
宇都 宮 徹	広島赤十字原爆病院外科 部長	肝細胞がん術前の非癌部肝生検による肝障害度の評価および残肝再発の予測
西堀 英 樹	慶応大学医学部 助手	内視鏡下生検材料を用いた進行・再発大腸癌に対する化学療法の影響性予測法の確立

## 総合研究報告

## 1 研究目的

がん患者から採取される生検組織から得られる信頼できる情報は個人化医療の確立のために重要である。生検組織は微小検体であり、このため微小検体からの様々な情報採取技術の確立が必須である。本研究の目的は生検組織を対象にした病理形態学的情報、ゲノム情報、遺伝子発現情報、タンパク情報の採取における問題点を明らかにし、生検組織からの情報取得技術の確立を目指す。そして、生検組織からの情報を基にしたがん治療の感受性予知及び効果判定に有効な新しい病理診断学の確立基礎となる研究成果及び現在までの研究状況の概要を目指すものである。

## 2 研究成果

本年度の研究成果として以下のことを検討し明らかにした。

生検組織を対象にした遺伝子情報や蛋白発現情報を明らかにする目的で、今年度は胃がん、肺がんおよび大腸がんの薬剤治療効果判定に関わる分子の評価について検討した。

1) 非小細胞性肺がん(72例)の化学療法の治療効果予測に5種類のABCトランスポーター分子の発現を検討した。72症例の抗がん剤治療後肺がん症例を用いて、5種類のABCトランスポーター(Pgp(P-glycoprotein), MRP1, MRP2, MRP3, BCRP(breast cancer resistant gene))の発現を免疫組織化学染色により検索し、抗がん剤耐性について検討を行った。用いた症例はいずれもCDDPを基礎にした5種類(VNR, DOC, CPT, GEM, PTX)の化学療法が行われており、組織型は腺がん50症例、扁平上皮がん18症例、他の非小細胞肺がん4症例であった。発現率ではPgpは腺がんが扁平上皮がんより有意に発現が高かったが、その他のABCトランスポーターでは発現率に変化は認められなかった。

2) 今年度は生検組織が組織全体を代表するかを分子の組織内における分布パターンにより1)びまん性、2)結節性、ならびに3)結節性に分類し、それぞれの分子変化の分布パターンにより生検による判定が可能かどうかを検証した。p53、Ki67分子発現は生検組織2個採取することにより、十分手術材料と同等な陽性所見を得られることが理論的に示された。実際に手術前に採取されたc-erbB-2蛋白発現ならびに遺伝子増幅をFISH法により生検組織と200症例の胃癌手術材料を用いて検討し

たところ、遺伝子変異を伴う分子ならびに免疫組織化学的染色による評価は生検組織においても可能であることが示された。

3) 放射線治療感受性を予測する生検組織を用いた画像解析法の確立：腫瘍組織内における新生血管密度を画像解析装置で客観的に測定するシステムを構築した。この画像解析システムを用いて、放射線化学療法を受けた食道がん症例の治療反応性を測定したところ、腫瘍血管における総血管周囲径ならびに腫瘍内血管数が最も放射線化学療法の感受性に相関することが示された。

2. ゲノムワイド発現解析に基づく内視鏡切除(生検)サンプルによる遺伝子診断へ向けたサンプルの評価法の確立

1) ゲノムワイドな遺伝子発現解析に基づく生検組織を用いた治療感受性予知を明らかにする目的で、食道がんの生検と外科的手術材料のマイクロアレイデータを比較することにより、治療前診断に必要な生検組織の遺伝子発現が手術材料の遺伝子発現同じかを検討した。食道がん、胃がんのゲノムワイド発現解析に基づく内視鏡切除サンプルによる遺伝子診断へ向けたサンプルの評価法の確立を目指し、マイクロアレイ解析によって得た食道扁平上皮がんの生検と外科的切除サンプルの遺伝子発現プロファイルの比較を行った。生検と外科的切除サンプルの発現プロファイルは大きく異なることを示された、特に、外科的切除サンプルで発現が高いものが80%以上も占めていた。

2) 非がん部の生検5サンプルと外科的切除症例の非がん部5サンプルの遺伝子発現プロファイルの比較を行った。両グループにおける各遺伝子の発現量の平均値を比較し、3倍以上発現量の違う遺伝子を選抜したところ、187遺伝子が選抜された(がん部間の比較では、257遺伝子)。がん部において選抜された257遺伝子と一致した遺伝子は、27遺伝子であった。どのようなシグナルネットワークが含まれるかを最新のシグナルネットワーク比較ソフトで解析したところ、非がん部、がん部ともにNFkBおよびPU.1のシグナルネットワークに関与する遺伝子が集積されていた。炎症反応は共通しているものと推察された。また、がん部で変動しやすいものと思われる257遺伝子を除去してクラスター解析を行うと、上記生検と外科的切除サンプルは2つのグループを形成しにくくなることが示された。

3) SAGE法および、そのデータを基盤に作成したオリゴヌクレオチドアレイを用いて、胃がんを含む多種類のが

んの遺伝子発現を包括的に解析し、がんの薬剤感受性を評価する系を確立することを当初の目的とし以下の検討を行った。

SAGE 法および、そのデータを基盤に作製した cDNA microarray を用いて、胃がんを含む多種類のがんの遺伝子発現を包括的に解析し、Taxol resistance-associated gene-3 (TRAG3) と MAGE 遺伝子群の発現が胃がんで高発現していることが明らかとなった。タキサン系抗がん剤の感受性が明らかとなっている胃がんを対象に MAGE-A1 遺伝子の発現を免疫染色で解析したところ、MAGE-A1 遺伝子の発現が認められた 4 例は、すべて Progressive disease (PD) であり、No change (NC) と Partial response (PR) では MAGE-A1 の発現は全く認められなかった ( $P = 0.0230$ )。MAGE-A1 の DNA 脱メチル化は 25%に見られ、DNA の脱メチル化と発現には有意な関連 ( $P = 0.0023$ ) が認められ、DNA メチル化と薬剤感受性に明らかな関連は見い出されなかった。MAGE-A1 の発現はタキサン系抗がん剤の抵抗性を予知しうる、有用なマーカーであると考えられた。

胃がん 5 サンプルを SAGE 法で解析した結果、Regenerating islet-derived family, member 4 (Reg IV) が胃がんで極めて高発現していることが明らかとなった。Reg IV に対するラビットポリクローナル抗体を作製し、本抗体を用いて 5FU の抵抗性が明らかになっている胃がん組織を免疫染色したところ、Reg IV の発現は 6 例に認められ、すべて 5FU に対し PD であったのに対し、NC と PR の症例では Reg IV の発現は全く認められなかった ( $P = 0.0237$ )。胃がん細胞株 TMK-1 に Reg IV を導入し、5FU 誘導性のアポトーシスを解析したところ、Reg IV 導入株ではアポトーシスが著明に抑制された。Reg IV による EGF receptor のリン酸化をその特異抗体を用いて Western blot で検討したところ、EGF receptor の 992 と 1068 のチロシンは、Reg IV 導入株でリン酸化されていることを確認した。

### 3. 生検組織を用いたプロテオーム解析による治療関連分子の解析のための検討

1) SCLC, LCNEC と反応する単クローン性抗体の作製：SCLC や LCNEC 細胞株をそのまま、もしくはソニケーションや AMex 固定した細胞標本を用いてマウスに免疫し、細胞融合法を用いて単クローン性抗体を作製している。この方法で精製抗原での免疫法では獲得出来ない腫瘍化に伴い未知の修飾を受けたタンパク質に対する有用な抗体の作製を目指し、650 を超える抗体を作製した。

2) SCLC, LCNEC 細胞株培養上清中の分泌、変性タンパク質、ペプチドの検索：SCLC, LCNEC 細胞株を無血清培地で培養、維持している。この培地と細胞を飼った培養上性を図で示した方法で比較検討している。分子量 5,000 以下のペプチドは逆相クロマト、MALDI-TOF-MS と MALDI-TOF/TOF-MS を組み合わせることにより、神経細胞や神経内分泌細胞にのみ発現し、神経疾患患者の髄液中に存在するペプチドを同定した。これは SCLC の腫瘍マーカーとして広く使用されている pro-GRP とは異なる新たな分子であり、現在、このペプチドに対する抗体を作製中である。

### 4. 肝細胞がん術前の非癌部肝生検による肝障害度の評価および残肝再発の予測

多様化した肝細胞癌（肝癌）に対する治療方針決定のためには肝癌進行度のみならず肝障害度の正確な把握が必要である。22G 以下細径生検針にて採取した非癌部肝組織の網羅的遺伝子解析を行うことで、(1) 正確で客観性のある肝障害度の分子遺伝学的評価法を確立し、(2) 多中心性発生肝癌のリスク予測や interferon (IFN) 療法の治療効果予測を試みる。

1) 傷害度の評価：対象は、肝癌切除 86 例の非癌部肝組織。組織学的に Azan 染色を行い、全面積に対する肝線維化領域の面積比を肝線維化率 (HF: Histological fibrosis) としてコンピューター画像解析により算出した。この HF 値と従来の血液生化学的肝機能検査 (白血球数、血小板数、アルブミン値、総ビリルビン値、プロトロンビン時間、ヘパプラスチンテスト、ICGR15、IV 型コラーゲン・7S、ヒアルロン酸など) および遺伝子発現に基づく肝線維化率 (GF: Genetic Fibrosis) との相関を評価した。HF 値と良く相関する血液検査は、上位よりプロトロンビン時間 ( $R=0.53$ )、血小板数 ( $R=0.52$ )、ICGR15 ( $R=0.49$ )、IV 型コラーゲン ( $R=0.48$ ) などであった。一方、遺伝子発現パターンよりいずれの肝機能検査より正確に肝線維化の程度を評価できることが明らかとなった。

2) 肝癌多中心性発生の予測：対象は、Hepatitis C virus (HCV) 抗体陽性肝細胞癌切除 40 例の非癌部肝組織。原発性肝癌取扱い規約 (第 4 版) に準じて判定可能な多中心性発生 (MC 群: 12 例と単発 (SN 群: 28 例) の 2 群に分け、予後を含めた臨床病理学的因子と遺伝子発現パターンとの関連を検討した。予測スコアにより 4 群に分けてスコアを比較したところ、スコア化による肝癌多中心性発生の分類が可能であることが示された。

3) IFN 療法の治療効果予測：今回、非癌部肝組織の DNA

マイクロアレイ解析を行った 86 例中、24 例が IFN 療法を受けていた。そこで、効果のあった responder; R 群 (n=7) と効果を認めなかった non-responder: NR 群 (n=17) の 2 群に分け両群間の遺伝子発現パターンを比較し、クラスター解析を行った。治療効果を認めた R 群にて有意に高発現する 1078 遺伝子と低発現する 812 遺伝子を用いてクラスター解析を行うと 2 つの大きなクラスターに分かれ、R 群の 7 例は全て 10 例で構成する一つのクラスターに分類された。さらに、R 群で有意に低発現する遺伝子群の中には、G1P3, OAS3, IFIT1, MX1 など IFN 感受性関連遺伝子として既に報告されたものが含まれていた。

3) 細径針にて採取した微量肝組織による評価: これまでの検討にて 22G、23G の肝生検針で  $4.9 \pm 0.9 \mu\text{g}$ 、 $3.5 \pm 0.4 \mu\text{g}$  の total RNA を採取可能であることを確認した。またオリゴ DNA マイクロアレイ (17,000 遺伝子解析) では  $0.2\text{--}0.5 \mu\text{g}$  の total RNA で解析可能であることも確認した。また、28 日間冷凍保存による RNA 品質管理への影響を検討したところ、28 日後でも RNA の質は良好に保たれることが明らかとなった。したがって、検査センターに集積してまとめて解析することは十分可能と考えられた。

#### 5. 直腸がんに対する術前補助療法における感受性予測法の確立

ヒト大腸癌細胞株 (LoVo, HCT15, WiDr, HCT116, HT-29, SW480) における HSP27 蛋白の発現をウェスタンブロット法により検討した。それぞれの発現量は densitometry で計測し、control である  $\beta$ -actin との比で求めた。それぞれの細胞を 5-FU に 48 時間連続接触させ、MTT assay 法により対照群と比較して 50% の細胞増殖抑制効果を引き起こす 5-FU 濃度 (IC50) を求めた。これを 5-FU 感受性の指標とし、HSP27 蛋白の発現量との関連性について検討した。6 種のヒト大腸癌細胞株 (LoVo, HCT15, WiDr, HCT116, HT-29, SW480) における HSP27 蛋白の発現量と IC50 との間に有意な相関を認めた ( $p=0.010$ )。

HCT15 における HSP27 蛋白の発現を RNA 干渉法によりノックダウンした。1) と同様に蛋白レベルの変化をウェスタンブロット法により定量し、IC50 の変化との相関について検討した。HSP27 を標的とする siRNA を HCT15 に導入すると、HSP27 蛋白発現は濃度依存性に抑制され、それぞれの IC50 は HSP27 蛋白の発現量と有意に相関した ( $p=0.039$ )。5-FU を中心とした術前化学療法 (5-FU/LV/CPT-11) を施行された直腸癌症例を対象とし、化学療法の組織学的奏効度と治療前生検組織を用いた免疫組織化学法による HSP27 蛋白発現度との関連性につい

て検討したが、臨床検体による検討では化学療法の組織学的奏効度と HSP27 発現度に有意な相関は認められなかった。

5-FU 耐性株 HCT15 において HSP27 蛋白の siRNA を用いたノックダウンにより 5-FU に対する感受性を増強することが可能であった。

#### 3 倫理面への配慮

本研究においては、患者より採取された試料を使用する場合、医学研究に関する指針、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針に準じ、各施設の倫理委員会の規定に従い研究を行った。特に患者プライバシー保護ならびに個人情報の機密保持に十分に配慮し、患者材料を用いた研究を行う場合インフォームドコンセントの取得または患者情報との連絡不可能匿名化を行った材料を用うことにより、患者情報の保持に最大限の注意を払い研究を行った。