

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	消化器外科	大学院4年	小松周平
研究の 名称	食道扁平上皮癌患者の血漿中の遊離DNAを指標にした新規バイオマーカーの探索		
研究のキ ーワード	食道扁平上皮癌 遺伝子増幅 血漿遊離DNA バイオマーカー		
研究の 概要	<p>固形癌で高頻度にみられるゲノム1次構造変化、特に遺伝子増幅に注目して血漿中の遊離DNAのコピー数を解析し、癌組織のgenome statusを血漿で評価するシステムを開発した。具体的には、食道扁平上皮癌で高頻度にみられる増幅遺伝子CCND1(11q13)に注目し、血漿の遊離DNA中のCCND1コピー数を評価した。1)患者血漿中の遊離DNAは健常人の血漿中の遊離DNAに比べCCND1コピー数が有意に高く(p<0.05)かった。高コピー数群の73.7%で癌部でもコピー数高値を認めた。2)96例の癌患者の血漿中の遊離DNAの解析では高コピー数群42例(44.8%)、低コピー数群54例(55.2%)で、前者でリンパ節転移(p=0.055)再発(p=0.096)が多い傾向を認め、CCND1高コピー数群は有意に予後不良(p=0.019)であった。多変量解析でも独立した予後因子となった。また術前高コピー数患者の術後血漿では有意に低下していた(p=0.049)。食道扁平上皮癌において増幅遺伝子に注目した血漿バイオマーカーの報告はなくこれらの研究から得られる知見は極めて有用であると考えられた。</p>		
研究の 背景	<p>近年、担癌患者の血清または血漿中の遊離DNAは癌細胞のgenome statusを反映し、極めて有用性が高いとの報告が散見される。癌組織の癌抑制遺伝子(p53、APC他)で同定した点突然変異に注目し、血清の遊離DNAから癌組織由来のDNAを検出し、再発時や化学療法後の腫瘍の変化をリアルタイムにモニタリングする方法(Diehl F and Vogelstein B et al. Nature Med 2008 他)の報告や、分子標的治療薬の効果判定のために、従来の癌組織のKRAS gene mutationを同定するかわりに血清遊離DNA中のKRAS gene mutationで評価が十分に可能との報告などがある(Yen LC et al. Clin Cancer Res. 2009)。我々の施設でも、p16、E-カドヘリン、RUNX3などの癌抑制遺伝子に対し、MSP(メチレーション特異的PCR)法を用いて癌組織由来の血漿中の遊離DNAのメチル化を評価してきた(Ichikawa D. J Surg Oncol 2000, Nishida S. Anticancer Res 2000, Koike H. J Surg Oncol 2004, Ikoma H. Anticancer Res 2006, Sakakura C. Anticancer Res 2006)。しかし、同定できるメチル化の頻度が低く、さらに顕著に癌の存在診断や、腫瘍量、療効果のモニタリング、予後や治療感受性の予測が可能な手法や分子の探索が必要であった。今回、遺伝子増幅に注目することにした。</p>		

研究手法	<p>(1)採取した術前血液、術後血液、再発治療時血液を用いる。血液採取後、速やかに3回の遠心分離によって赤血球及び有核細胞を除いた血漿を採取し、-80度で保存する。DNA抽出時は4度で溶解し、QIAGEN QIAamp® DNA Mini Blood Mini Kitで血中の遊離DNAの抽出を行う。</p> <p>(2)癌組織のDNAは、パラフィン凍結切片からDEXPAT (TaKaRa, Kyoto, Japan)を用いて抽出を行う。</p> <p>(3)抽出した血清中の遊離DNAや癌組織DNAを用いてApplied Biosystems社のTaqMan® Copy Number Assays によるreal time PCR法を行い、目的増幅遺伝子のコピー数変化を測定しバイオマーカーとしての有用性を検討する。染色体あたりのコピー数を評価するために、内在性コントロールとしては、同じ染色体上でかつゲノムデータベースで増幅の報告ない領域の遺伝子を選択する(例:CCND11q13に対してDRD211q23)。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>新規の血漿のバイオマーカーとして、食道扁平上皮癌の有望な増幅遺伝子候補のうち、増幅頻度が高く、コピー数も多いCCND1遺伝子に注目した。先ず、血漿中の遊離DNAを用いてReal time PCR法でCCND1コピー数を測定し、癌患者と非癌患者を比較した。次に、癌患者のCCND1コピー数の程度と臨床病理学的因子との相関や予後予測分子としての有用性を検討した。現在、食道扁平上皮癌で報告済みの癌組織で診断や治療上有望と考えられている様々な増幅遺伝子を用いて、治療のモニタリングや予後予測の可能な血漿のバイオマーカーとなる分子の更なる探索を進めている。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>従来、血清のSCC、CEA、CA19-9などの腫瘍マーカーは癌の存在診断や治療効果判定などに用いられこれまで癌治療に大きく寄与してきた。しかし、担癌患者であるにも関わらずこれらのマーカーが陰性でありそのために診断が遅れることがある。今後、血漿中の遊離DNA中のCCND1のような診断及び予後の予測マーカーの開発により患者個別の医療へ貢献できる可能性がある。</p>
今後の期待	<p>治療の効果判定や方針の決定の指標となる個々の患者に応じたバイオマーカーや治療標的分子があれば、診断が正確になり治療の個別化が可能である。食道扁平上皮癌における CCND1 増幅遺伝子に注目した血漿のバイオマーカーは実地臨床において有用な可能性がある。今後様々な増幅遺伝子を評価することでオーダーメイドの血漿バイオマーカーの使用が可能となり、治療方針の決定や治療成績・QOLの改善に貢献にできると考えられる。現在、様々な分子で検討を進めている。</p>
研究発表	<p>(1) The Plasma CCND1 Amplification as a Potential Prognostic Biomarker in Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC).The 6th International Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS) 9-11 November, 2009 in Hong Kong.</p> <p>(2) Prediction of CCND1 amplification using plasma DNA as a prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer. 2010 in press.</p>