

「テラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」
平成 16 年度採択研究代表者

森 正樹

九州大学 生体防御医学研究所 教授

大腸癌の発生、進展および治療感受性に関わる因子の解析

1. 研究実施の概要

本研究の目的は発生頻度が急増している大腸癌の発生、進展および治療感受性に関わる因子を明らかにすることで、大腸癌のテラーメイド医療を具現化し、もって予後改善に寄与することである。解析は腫瘍側因子、宿主側因子、環境側因子の 3 面から多数例(5000 例)を用いて精密に行うことが、本研究の特徴である。平成 19 年度 7 月には大腸癌、コントロール群の集積数を合計 5200 例(予定数の 104%)まで増加させることができた。解析結果としては(1)機能多型解析を 733 例(大腸癌 362 例、コントロール群 371 例)に施行し 50 万 SNPs アレイを用いた大規模多型解析を行い染色体 14 番および 16 番に有望な関連多型部位を見いだしたので、現在 2 次スクリーニングを施行中である。また(2)遺伝子発現解析では癌発生に強く関連する遺伝子として 70 個の遺伝子を抽出し、それぞれの遺伝子について二次スクリーニングを行い有意な所見を得たためこれを論文報告した。(3)ゲノムアレイ解析も 80 例について行った。更に(4)3800 例(大腸癌 1800 例、コントロール群 2000 例)を対象とした疫学的解析(主として食生活因子解析)を開始しいくつかの所見を得た。以上、症例の集積、腫瘍側因子、宿主側因子、環境側因子の 3 面からの解析は順調に推移している。平成 19 年度に予定の 5000 例症例集積が完了し、現在 50 万 SNPs アレイ解析、腫瘍遺伝子発現解析、ゲノム変異解析、疫学解析を精力的に行っているところである。平成 20 年度は、それぞれの解析で結果を出すとともに、三位一体の検索に研究の焦点を移行させる予定である。

2. 研究実施内容

研究3年度目の平成18年には研究協力7機関の研究体制を確立し、疫学的要因解析のためのアンケートおよび遺伝子多形解析用の血液サンプルを平成19年7月時点で5200例収集した。内訳はコントロール群3043例、大腸癌群2157例である。予定症例数の収集が完了している。このうち4300例はすでに多型解析用にDNA化が完了した。腫瘍側の因子解析のための腫瘍サンプルは320例収集した。これは予定症例数の80%である。アンケートのデータベース化も進行しており現在4300例が終了している。また腫瘍サンプルについてもLMD法による腫瘍細胞のみの回収法の確立、DNA、RNAの高効率回収法、高精度の核酸品質検定等々が可能となり、マイクロアレイ発現解析(122例)、アレイCGH法によるゲノム解析(100例)を行った。アンケート解析も3800例を対象に検討を進めている。

(A) 多型解析

(1) 機能多型解析：大腸癌患者300例、対照300例の末梢血由来DNAについて施行した。欧米で大腸癌発癌に関与すると報告されている機能的多型を持つ20遺伝子多型(SMYD3、PPARG、TP53、STK15、IGFBP3等々)をTaqMan PCRあるいはmicrosatellite法で解析し、シーケンスで確認した。その結果(1)単一遺伝子多型解析ではSMYD3のVNTR多型について遺伝子型(1/2)subtype頻度が対照群16%、大腸癌群22%と有意な差を認めた($p=0.05$)。その他の遺伝子多型には有意な差を認めなかった。(2)2遺伝子による複合多型解析ではSMYD3、STK15、ADPRT遺伝子のうちいずれの2つの組み合わせでもp値0.019~0.041の有意な差を認めた。日本人大腸癌で多型を認める遺伝子が少ないことが明らかになったが、これは日本人特有な遺伝的均一性に原因があるのか、あるいは本研究の症例集積に原因があるのか現時点では不明であるが、今後研究を進展させ明らかにしていきたい。

(2) 包括的多型解析：平成18年度以降多型解析法としてアフィメトリクス社の500K SNPs arrayを用いた包括的で大規模なスクリーニングを開始した。平成19年度は(1)一次スクリーニングとして733例(大腸癌362例、コントロール群371例)の末梢血由来DNAによる50万カ所SNPsスクリーニングを行い、この中から大腸癌発癌関連多型を50カ所抽出した。(2)二次スクリーニングとして新たな大腸癌患者305例、対照433例についてこの大腸癌発癌関連多型を検討し、関連多型を絞り込んでいったところ染色体14番と16番に有力な多型部位を見いだした。20年度は更に残りのコントロール2000例、症例1000例について検索を進める予定である。

(B) 腫瘍因子解析

(1) 発現解析：19年度は切除腫瘍サンプルのLMD+マイクロアレイ発現解析は122例の解析が終了し、これらについての統合解析を進めた。遺伝子発現解析では癌発生に強く関連する遺伝子として70個の遺伝子を抽出した。この中でCOL12A1L, PSK-J3, BLP1,

TM2D2, OCT3, SOX4, HFH1, MMP-7, MAD2, EIF2 については細胞生物学的実験を行ったが、これらについては大腸癌発生に強く関連する遺伝子を二次スクリーニングしたところいくつかの有意な遺伝子を確認したので論文報告した。

20 年度はこの解析を 150 例まで進めたいと考えている。

(2) ゲノム解析：19 年度までに切除腫瘍サンプルの LMD+マイクロアレイゲノム解析は 100 例の解析が終了した。染色体ごとの詳しいマッピングを現在行うと共に (1) における発現プロファイルとの関連も現在解析中である。20 年度はこの解析を 130 例まで進めたいと考えている。

(C) 生活習慣アンケート解析：アンケートのデータベース化は現在 4300 例が終了している。喫煙、飲酒、体重(BMI)等々に興味深い結果を得ている。20 年度は 5000 例について詳細な疫学的解析を進めるとともにほかの因子(遺伝子情報)との連関についても検討したい。

(D) 20 年度は 3 つの検討項目を統合した三位一体研究を推進する予定である。

3. 研究実施体制

(1) 九州大学生体防御医学研究所 細胞機能制御学部門グループ (森 正樹)

①研究者名：森 正樹(九州大学)

②研究項目

- 1.大腸癌 DNA・RNA 標本の蒐集・データベース作成
- 2.大腸癌患者における SNPs 解析
- 3.大腸癌患者における DNA マイクロアレイ法による発現プロファイル・データベース作成

(2) 九州大学生体防御医学研究所 ゲノム機能制御学部門グループ (山本 健)

①研究者名：山本 健(九州大学)

②研究項目

- 1.大腸がん患者、検診被検者検体を対象とした候補遺伝子 SNP 解析とデータベース構築
- 2.新しい診断用 SNP 解析システムの開発

(3) 北里大学外科グループ (渡邊 昌彦)

①研究者名：渡邊 昌彦(北里大学)

②研究項目

- 1.日本人 SNPs データベースの作成
- 2.大腸癌患者における SNPs 解析

(4) 国立がんセンター中央病院外科グループ (森谷 亘皓)

①研究者名：森谷 亘皓(国立がんセンター中央病院)

②研究項目

- 1.日本人 SNPs データベースの作成
- 2.大腸癌患者における SNPs 解析

(5) 昭和大学横浜市北部病院消化器センターグループ (工藤 進英)

①研究者名：工藤 進英(昭和大学)

②研究項目

- 1.大腸癌検診被検者による SNPs データベースの作成
- 2.大腸癌患者における SNPs 解析

(6) 東京医科歯科大学外科グループ (杉原 健一)

①研究者名：杉原 健一(東京医科歯科大学)

②研究項目

- 1.大腸癌検診被検者による SNPs データベースの作成
- 2.大腸癌患者における SNPs 解析

(7) 防衛医科大学校第1外科グループ (望月 英隆)

①研究者名：望月 英隆(防衛医科大学)

②研究項目

- 1.大腸癌検診被検者による SNPs データベースの作成
- 2.大腸癌患者における SNPs 解析

(8) 三重大学第2外科グループ (楠 正人)

①研究者名：楠 正人(三重大学)

②研究項目

- 1.大腸癌検診被検者による SNPs データベースの作成
- 2.大腸癌患者における SNPs 解析

(9) 埼玉県立がんセンター外科グループ (西村 洋司)

①研究者名：西村 洋司(埼玉がんセンター)

②研究項目

- 1.大腸癌検診被検者による SNPs データベースの作成
- 2.大腸癌患者における SNPs 解析

(10) 高野病院グループ (山田 一隆)

①研究者名：山田 一隆(社団 高野会 高野病院)

②研究項目

- 1.大腸癌検診被検者による SNPs データベースの作成
- 2.大腸癌患者における SNPs 解析

(11) 名古屋市立大学大学院医学研究科予防・社会医学専攻健康科学・環境生態学講座健康増進・予防医学分野グループ (徳留 信寛)

①研究者名：徳留 信寛 (名古屋市立大学)

②研究項目

- 1.健康調査表の作成・疫学的解析・統計解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. Yoshinaga K, Yamashita K, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Mori M. Activin a causes cancer cell aggressiveness in esophageal squamous cell carcinoma cells. **Ann Surg Oncol** 2008;15(1):96-103.
2. Yokoe T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Ohmachi T, Kusunoki M, Mori M. Efficient identification of a novel cancer/testis antigen for immunotherapy using three-step microarray analysis. **Cancer Res** 2008;68(4):1074-82.
3. Sasaki A, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Kai S, Shibata K, Ohta M, Kitano S, Mori M. Prognostic value of tumor-infiltrating FOXP3+ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma. **Eur J Surg Oncol** 2008;34(2):173-9.
4. Ohta M, Mimori K, Fukuyoshi Y, Kita Y, Motoyama K, Yamashita K, Ishii H, Inoue H, Mori M. Clinical significance of the reduced expression of G protein gamma 7 (GNG7) in oesophageal cancer. **Br J Cancer** 2008;98(2):410-7.
5. Motoyama K, Tanaka F, Kosaka Y, Mimori K, Uetake H, Inoue H, Sugihara K, Mori M. Clinical significance of BMP7 in human colorectal cancer. **Ann Surg Oncol** 2008;15(5):1530-7.

6. Kita Y, Mimori K, Tanaka F, Matsumoto T, Haraguchi N, Ishikawa K, Matsuzaki S, Fukuyoshi Y, Inoue H, Natsugoe S, Aikou T, Mori M. Clinical significance of LAMB3 and COL7A1 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma. **Eur J Surg Oncol** 2008.
7. Ieta K, Tanaka F, Haraguchi N, Kita Y, Sakashita H, Mimori K, Matsumoto T, Inoue H, Kuwano H, Mori M. Biological and genetic characteristics of tumor-initiating cells in colon cancer. **Ann Surg Oncol** 2008;15(2):638-48.
8. Yokoe T, Ohmachi T, Inoue H, Mimori K, Tanaka F, Kusunoki M, Mori M. Clinical significance of growth differentiation factor 11 in colorectal cancer. **Int J Oncol** 2007;31(5):1097-101.
9. Tanaka F, Sonoda H, Okamoto M, Mimori K, Utsunomiya T, Inoue H, Hanai T, Mori M. TIMP-3 and Phosphatidylinositol 3-kinase Genes Were Found to Be Related to the Progression of Colon Cancer in a Comparison of Pneumoperitoneum and Laparotomy in a Murine Model. **Surg Today** 2007;37(3):220-5.
10. Nakamura Y, Tanaka F, Haraguchi N, Mimori K, Matsumoto T, Inoue H, Yanaga K, Mori M. Clinicopathological and biological significance of mitotic centromere-associated kinesin overexpression in human gastric cancer. **Br J Cancer** 2007;97(4):543-9.
11. Mimori K, Nishida K, Nakamura Y, Ieta K, Yoshikawa Y, Sasaki A, Ishii H, Alonso MA, Mori M. Loss of MAL expression in precancerous lesions of the esophagus. **Ann Surg Oncol** 2007;14(5):1670-7.
12. Mimori K, Kosaka Y, Hirasaki S, Kita Y, Moriyama N, Mori M. Disseminated isolated tumor cells in bone marrow of esophageal cancer cases. **Esophagus** 2007;4(1):29-33.
13. Kosaka Y, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Watanabe M, Mori M. Clinical significance of the loss of MATS1 mRNA expression in colorectal cancer. **Int J Oncol** 2007;31(2):333-8.
14. Kosaka Y, Mimori K, Fukagawa T, Ishikawa K, Etoh T, Katai H, Sano T, Watanabe M, Sasako M, Mori M. Identification of the high-risk group for metastasis of gastric cancer cases by vascular endothelial growth factor receptor-1 overexpression in peripheral blood. **Br J Cancer** 2007;96(11):1723-8.
15. Kosaka Y, Inoue H, Ohmachi T, Yokoe T, Matsumoto T, Mimori K, Tanaka F, Watanabe M, Mori M. Tripartite Motif-Containing 29 (TRIM29) Is a Novel Marker for Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer. **Ann Surg Oncol** 2007;14(9):2543-9.
16. Ishikawa K, Sasaki A, Haraguchi N, Yoshikawa Y, Mori M. A case of an alpha-fetoprotein-producing intrahepatic cholangiocarcinoma suggests probable cancer stem cell origin. **The oncologist** 2007;12(3):320-4.
17. Ishikawa K, Ishii H, Murakumo Y, Mimori K, Kobayashi M, Yamamoto K, Mori M, Nishino H, Furukawa Y, Ichimura K. Rad9 modulates the P21WAF1 pathway by direct association with p53. **BMC molecular biology** 2007;8:37.

18. Ieta K, Ojima E, Tanaka F, Nakamura Y, Haraguchi N, Mimori K, Inoue H, Kuwano H, Mori M. Identification of overexpressed genes in hepatocellular carcinoma, with special reference to ubiquitin-conjugating enzyme E2C gene expression. ***Int J Cancer*** 2007;121(1):33-8.
19. Hirasaki S, Noguchi T, Mimori K, Onuki J, Morita K, Inoue H, Sugihara K, Mori M, Hirano T. BAC clones related to prognosis in patients with esophageal squamous carcinoma: an array comparative genomic hybridization study. ***Oncologist*** 2007;12(4):406-17.