

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08674

研究課題名(和文) 遊離癌細胞の生着能を利用した転移機形成序解明とあらたなHIPEC治療適応の確立

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of metastasis formation using the engraftment ability of free cancer cells and establishment of new indications for HIPEC therapy

研究代表者

安田 裕美 (Yasuda, Hiromi)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60586767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：進行胃癌の腫瘍組織をmicroarrayで網羅的解析し、同定された候補miRNA5つのうち3miRNA(miR-30a-5p, -659-3p, -3917)はtesting cohortにおいて腹膜播種陽性症例で有意に高発現で、この3miRNAの複合パネルスコアは腹膜播種同定能でAUC:0.82であった。validationとEvaluation cohortにおいてもこの結果は再現され、多変量解析で3miRNAパネルスコアとともに抽出された内視鏡的肉眼型を組み合わせたりスコアの高値例は、各cohortにおいてAUC：0.87,0.76,0.79と高精度に腹膜播種陽性例を同定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網羅的解析ならびに生物統計学的手法で同定した胃癌腹膜播種症例で特異的に異常発現するmiRNAパネルが胃癌腹膜播種同定において有用なバイオマーカーとなりうる可能性を証明した。今後はさらに該当する症例の腫瘍組織/血液/腹水/術中洗浄液を適切にサンプリング、保管管理し、miRNAパネルが胃癌個別化治療の効果予測因子として有用か否かを検証していく方向であり、今回の研究で得られた成果は臨床償却の上で大きな意義を成すと考える。

研究成果の概要(英文)：We performed a systematic biomarker discovery by analyzing miRNA expression profiles in primary tumors from GC patients with and without PM. Among 5 miRNA, 3 of which (miR-30a-5p, -659-3p, and -3917) were significantly overexpressed in the primary tumors from PM-positive patients in the testing cohort, and distinguished patients with the value of AUC of 0.82. The efficacy of the combination miRNA signature was subsequently validated in an independent validation cohort (AUC = 0.74). Finally, our miRNA signature when combined together with the macroscopic Borrmann's type score offered a much superior diagnostic in all 3 cohorts (AUC = 0.87, 0.76, and 0.79, respectively).

研究分野：上部消化管悪性腫瘍

キーワード：胃癌 遊離癌細胞 腹膜播種

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胃癌は本邦含めて東アジアや南米に患者が多い疾患で、近年検診や胃内視鏡などの普及もあり、死者数は年々減少傾向にあるものの、2018年度の日本における胃癌の死者数は44,192人(男28,843人、女15,349人)で、肺癌、大腸癌に次いで第3位と依然、死亡者数の多い疾患である(厚生労働省人口動態統計より)。腹膜播種は胃癌の転移再発形式として最も高頻度で、腹膜播種の増悪にて腹水貯留、癌性腹膜炎に伴う腸閉塞や水腎症を発症し全身状態を著しく悪化させる。近年進行胃癌全体に対する全身化学療法が発達してきたが、薬剤の腹膜移行性が不良であることから胃癌腹膜播種に対する標準的治療は存在していないのが現状である。

近年腹膜切除+腹腔内温熱化学療法 HIPEC の有用性が報告され本邦でも一部の施設で導入されているが、侵襲性が高く術後の生活の質も著しく低下するため治療適応を決めるあらたなバイオマーカーの確立が急がれる現状である。

### 2. 研究の目的

細胞が細胞外マトリクスへ接着できずアポトーシスへ至る現象を"Anoikis"というが、癌細胞が周囲との接触を失っても生存を続け生着する"Anoikis"抵抗性獲得は、腹膜播種巣の形成過程でも重要な機序と考えられ、前述の腹膜播種に対する腹腔内温熱化学療法はその機序からもAnoikis抵抗性を獲得した遊離癌細胞に対する治療とも考えられAnoikis関連分子は、HIPECの治療適応を決める上で新たなバイオマーカーになりうると思われる。

また遺伝子配列変異を伴わず遺伝子発現調節を来すEpigenetic変化の中でも代表的なDNAメチル化や非コードRNA(ncRNA)は、癌進展に深く関与する事が最近の研究で判明しておりLiquid biopsyの有用な候補として注目される。本研究では、洗浄腹水中の遊離癌細胞ならびに血中の循環癌細胞(CTC)を初代培養し、Anoikis抵抗能の程度と臨床的意義を明らかにし、Anoikis抵抗能と関与するmolecular profileをDNAメチル化とncRNAを含めて発現解析し、腹膜播種関連遺伝子の同定とその機序解明を行い、さらにHIPECの治療効果予測因子としての応用を考慮した臨床研究へと発展させる事を目的とする。本研究は学術的に意義深く、胃癌腹膜播種根絶への試金石ともなり得る治療戦略につながる可能性があり、臨床的償却に直結した研究を遂行することが実現する事も期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1)胃癌洗浄腹水からのEpiCAM陽性遊離癌細胞の抽出と初代培養

遊離癌細胞からDNA抽出、RNA抽出を施行。また遊離癌細胞はRPMI-1640培養液を用いて継代をおこない、クラスター形成生着群と非生着群を区別する。

#### (2)胃癌術前血漿からのEpiCAM陽性血中循環癌細胞CTCの抽出と初代培養

CTCからDNA抽出、RNA抽出を施行。またCTCはRPMI-1640培養液を用いて継代をおこない、クラスター形成生着群と非生着群を区別する。

#### (3)生着群と非生着群の網羅的解析による分子プロファイリング

(1)と(2)で生着群と非生着群の遊離癌細胞/CTCから抽出したDNA/RNAを用いて次世代シーケンズ法にてDNAメチル化や発現遺伝子/ncRNAに関して網羅的プロファイリングを施行。

#### (4)胃癌組織を用いた臨床サンプルでのDNAメチル化や発現遺伝子/ncRNAの臨床的意義の検証

(3)で同定されたDNAメチル化や発現遺伝子/ncRNAに関して多数サンプルで検証し、生存や再発との関連を探索

#### (5)胃癌腹膜播種進展における上記候補遺伝子の機能解析

In-vitro study:胃癌細胞を用いて(3)(4)で同定された候補遺伝子をsiRNAsでknockdownし、各種in-vitro実験で増殖/浸潤/anoikis抵抗能を検証。

In-vivo study:胃癌細胞を用いてIn-vitroで興味深い結果が得られた候補遺伝子においてはCRISPR/Cas9を用いてstable knockdownし、ヌードマウスに腹腔内投与/尾静注し、腫瘍形成能/播種形成能を検証。

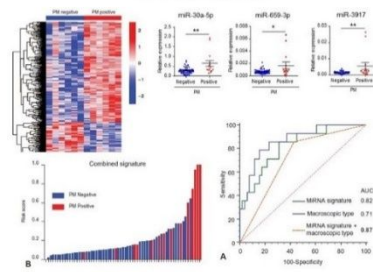
#### (6)腹膜切除+HIPECの効果予測因子としての検討

前述の過程で同定したDNAメチル化や発現遺伝子/ncRNAを、前向きの手術症例の術中腹腔洗浄液で定量測定しHIPEC適応症例を迅速同定し得るバイオマーカーとしての有用性を検討する。

#### 4. 研究成果

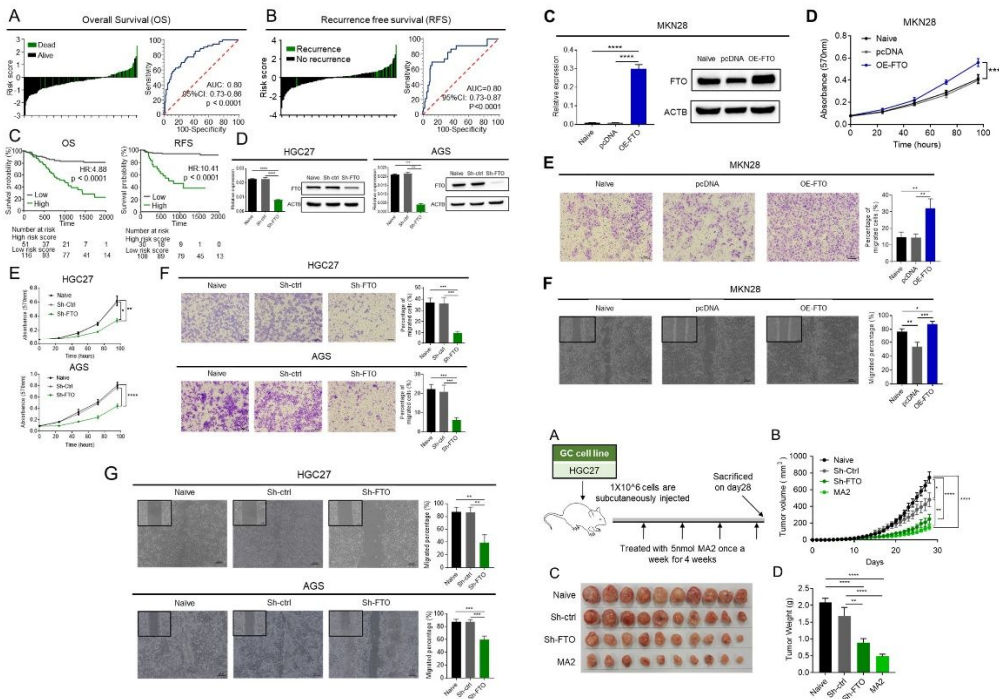
我々は腹膜播種陽性/陰性胃癌患者の癌組織から抽出した RNA で microRNAarray を施行し、腹膜播種陽性症例に異常高発現の候補 miRNA を生物統計学的手法より 5 つに narrow down して選定、うち 3miRNA(miR-30a-5p, -659-3p, -3917)は qRT-PCR 法で testing cohort において腹膜播種陽性症例で有意に高発現であり、この 3miRNA の発現値をもとに作成した複合パネルスコアを用いると、AUC:0.82 と高精度に胃癌腹膜播種症例を識別しうる結果が得られた。また validation cohort と Evaluation cohort においても同パネルスコアはそれぞれ AUC:0.74,0.67 と高精度に腹膜播種陽性症例を識別し、多変量解析では 3miRNA パネルスコアならびに内視鏡的肉眼型 type3/4 は腹膜播種陽性に関しての独立したリスク因子であり、両リスク因子を組み合わせると新たにリスクスコアを作成すると、3 つの cohort においてリスクスコア高値例はそれぞれ AUC : 0.87,0.76,0.79 と高精度に腹膜播種陽性症例を同定できる可能性を報告した (右図、Shimura T, Toyama Y, Okugawa Y, et al. Ann Surg. 2019 Oct 28. Epub ahead of print)

胃癌腹膜播種症例に特異的なmiRNAパネルの作成、ならびに同パネルの精度の検証



また本研究に随伴しての研究だが、近年転写された RNA に起きる後天的修飾の一種である m6A RNA メチル化が癌進展/転移に重要な役割を示す事が報告されており、胃癌において m6A メチル化に関与する分子(writer, eraser, reader)のバイオマーカーとしての可能性、癌進展における機序を検証した。結果として m6A 脱メチル化に関与する FTO は高発現例では予後不良で腹膜播種陽性例と関与し、FTO の stable knockdown/overexpression はレンチウイルスベクターを用いておこない in-vitro、in-vivo で機能解析し、FTO が癌進展において重要な役割を果たす分子である事を証明した。また FTO が上皮間葉移行に関与する可能性を証明したが、FTO が脱メチル化する標的の下流分子に関しては今後更に検証中である (下図 Shimura T, Okugawa Y, Ohi M, Toyama Y, et al. under review)。

胃癌におけるm6A RNAメチル化関連分子のバイオマーカーとしての意義、癌進展/転移の機序の解明



研究成果として示した通り、胃癌腹膜播種進展に関与する分子に関してのバイオマーカー研究、ならびに胃癌個別化治療を選択する上でのバイオマーカー研究はさらなる発展を遂げていく可能性を有すると考え、今後は胃癌腹膜播種患者の血清、術中に採取した腹水/腹腔洗浄液を用いて、これまで有用な結果が得られた分子に関して後ろ向き更には前向きに検証し、胃癌個別化治療の効果予測因子となる有用なバイオマーカーを同定、検証していく必要がある。新規症例数に限りがある問題点があるものの該当症例においては適切にサンプルの採取、保管管理を継続し、今後も研究を継続していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ichikawa T, Okugawa Y, Toiyama Y, Tanaka K, Yin C, Kitajima T, Kondo S, Shimura T, Ohi M, Araki T, Kusunoki M	4. 巻 121
2. 論文標題 Clinical significance and biological role of L1 cell adhesion molecule in gastric cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 1058-1068
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-019-0646-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimura T, Toden S, Kandimalla R, Toiyama Y, Okugawa Y, Kanda M, Baba H, Koderi Y, Kusunoki M, Goel A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Genomewide Expression Profiling Identifies a Novel miRNA-Based Signature for the Detection of Peritoneal Metastasis in Patients With Gastric Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SLA.0000000000003647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Omura Y, Toiyama Y, Okugawa Y, Yamamoto A, Yin C, Kusunoki K, Kusunoki Y, Shigemori T, Ide S, Kitajima T, Fujikawa H, Yasuda H, Hiro J, Yoshiyama S, Ohi M, Kusunoki M.	4. 巻 27
2. 論文標題 Crohn's-Like Lymphoid Reaction is Associated with Oncological Prognosis and Nutritional Status in Patients with Pathological Stage II/III Gastric Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 259-267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-019-07709-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shigemori T, Toiyama Y, Okugawa Y, Yamamoto A, Yin C, Narumi A, Ichikawa T, Ide S, Shimura T, Fujikawa H, Yasuda H, Hiro J, Yoshiyama S, Ohi M, Araki T, Kusunoki M	4. 巻 26
2. 論文標題 Soluble PD-L1 Expression in Circulation as a Predictive Marker for Recurrence and Prognosis in Gastric Cancer: Direct Comparison of the Clinical Burden Between Tissue and Serum PD-L1 Expression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 876-883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-018-07112-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okugawa Y, Toiyama Y, Shigeyasu K, Yamamoto A, Shigemori T, Yin C, Ichikawa T, Yasuda H, Fujikawa H, Yoshiyama S, Hiro J, Ohi M, Araki T, Kusunoki M, Goel A.	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Enhanced AZIN1 RNA editing and overexpression of its regulatory enzyme ADAR1 are important prognostic biomarkers in gastric cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Transl Med.	6. 最初と最後の頁 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12967-018-1740-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大井正貴、吉山繁幸、安田裕美、市川 崇、浦谷 亮、重盛恒彦、藤川裕之、大北喜基、奥川喜永、廣 純一郎、問山裕二、荒木俊光、楠 正人
2. 発表標題 胃上部癌に対する術式選択の取り組み～センチネルリンパ節の分布からみた検討～
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会、大阪
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志村匡信、問山裕二、奥川喜永、Raju Kandimala、今岡裕基、北嶋貴仁、安田裕美、横江 毅、大井正貴、荒木俊光、楠 正人、Ajay Goel
2. 発表標題 RNAメチル化制御遺伝子パネルの胃癌患者における予後・再発マーカーとしての意義
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会、福岡
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大村悠介、問山裕二、奥川喜永、楠 蔵人、尹 成増、山本 晃、市川 崇、重盛恒彦、井出正造、北嶋貴仁、安田裕美、藤川裕之、廣 純一郎、吉山繁幸、大井正貴、荒木俊光、楠 正人
2. 発表標題 Stage / 胃癌におけるCrohn's-Like Lymphoid Reactionの腫瘍学的予後と栄養指標に関する検討.
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会、大阪
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田裕美、浦谷 亮、重盛恒彦、吉山繁幸、大井正貴、北嶋貴仁、藤川裕之、奥川喜永、大北喜基、廣 純一郎、問山裕二、荒木俊光、楠正人
2. 発表標題 食道癌術後肺炎のリスク因子についての検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会、大阪
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	問山 裕二 (Toiyama Yuji)  (00422824)	三重大学・医学系研究科・教授  (14101)	
研究分担者	奥川 喜永 (Okugawa Yoshinaga)  (30555545)	三重大学・医学部附属病院・講師  (14101)	
研究分担者	吉山 繁幸 (Yoshiyama Shigeyuki)  (60444436)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト  (14101)	
研究分担者	大井 正貴 (Ohi Masaki)  (40418752)	三重大学・医学部附属病院・准教授  (14101)	
研究分担者	楠 正人 (Kusunoki Masato)  (50192026)	三重大学・医学系研究科・寄附講座大学教員  (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------