

令和元年5月21日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10497

研究課題名(和文) snoRNAを用いたあらたな胃癌診断・予後マーカーの確立

研究課題名(英文) Development of novel epigenetic marker in gastric cancer

研究代表者

今岡 裕基 (Imaoka, Hiroki)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：70762938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌腹膜播種に關与するエピゲノム変化を同定することを目的に研究をおこなった。その結果いくつかのmiRNAをもちいたパネル検査が、原発組織を用いて腹膜播種の有無を同定することが可能となることが判明し、新規バイオマーカーになり得ると考えられた。また、遺伝子発現レベルにおいて注目すると、接着分子の一種であるL1CAMが、癌組織特異的に発現増加するのみならず、病期進展に伴い発現増加し、リンパ節転移・腹膜播種進展と相関し、有用な予後予測マーカーとなることのみならず治療標的にもなりうることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果を用いることで、学術的意義としては、腹膜播種を早期に診断・同定し、治療方針の決定に有用となる可能性が考慮された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify clinically relevant epigenetic markers for presence of peritoneal dissemination in gastric cancer. Array-based comprehensive analysis demonstrated that miRNA panel could identify GC patients harboring peritoneal dissemination. Furthermore, gene expression analysis demonstrated that increased L1CAM expression was deeply involved in peritoneal metastasis and poor prognosis in gastric cancer patients.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 腹膜播種 バイオマーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【胃癌治療の現状と腹膜播種】

胃癌は中国、日本、韓国などアジアや南米に患者が多い疾患であり、近年、胃癌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、**2012**年度の日本における胃癌の死者数は**49,129**人(男**32,206**人、女**16,923**人)で、男性では肺癌に次いで第**2**位、女性では大腸癌に次いで第**2**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)。とりわけ、腹膜播種は胃癌の転移再発形式として最も頻度の高く、漿膜浸潤を伴う未分化型癌では特に高率に認められる病態である。播種が進行すると癌性腹膜炎に伴う腸閉塞や水腎症、腹水貯留を併発し、全身状態は急速に悪化する。したがって、腹膜播種の治療は胃癌治療の中でも非常に重要な位置を占め、その成績は胃癌の予後を大きく左右するといえる。近年、**TS-1**、シスプラチン、タキサン系薬剤などの使用と分子標的剤(**trastuzumab**)の併用により、胃癌全体に対する全身化学療法の効果が期待できるようになったが、薬剤の腹膜移行性が不良であることから、胃癌腹膜播種症例に対して**TS-1**に**Paclitaxel**の腹腔内/経静脈併用療法が試みられており、現在、**S1+CDDP**併用療法との比較試験(**PHOENIX-GC**)が進行中である。しかしながら、胃癌腹膜播種に対しては、近年の化学療法の進歩を考慮に入れても、いまだに標準的治療と言うべき治療法は存在しないのが現状である。また進行胃癌患者において、治癒切除したにもかかわらずリンパ節転移陽性は術後の再発の高リスク因子であり、より強力な術後補助化学療法のレジメン開発が急務である一方で、腹膜転移を術前に診断するのみならず、根治手術後の転移再発高リスク患者を選別する新たなバイオマーカーの確立や、転移そのもののメカニズムを解明することによる転移抑制の新たな治療法の開発が急がれる。

【胃癌における epigenetic 変化】

胃癌は他の多くの癌と同様に遺伝子の異常が蓄積して発生する多段階発癌の経過をとる。遺伝子の異常には突然変異や染色体欠損などの **Genetic** な遺伝子構造異常だけでなく、後天的 **DNA** 修飾による遺伝発現制御である **epigenetic** な異常があげられる。**Epigenetic** な変化として、**DNA** 塩基のメチル化による遺伝子発現の変化・ヒストンの化学修飾による遺伝子発現の変化、そして **microRNA** や **long non-coding RNA(ncRNA)** などといった蛋白質をコードしない **ncRNA** による遺伝発現制御がある。中でも、**ncRNA** の分野はこの数年、著しい飛躍を遂げており、とりわけ長さ **20-25** 塩基ほどの **microRNA(miRNA)** が生体内の維持から発癌の機序に至るまで幅広い範囲で大きな役割を担っていることが証明されてきた。また **miRNA** は血清からでも検出可能であり、早期胃癌に対する新たな非侵襲性バイオマーカーとしてすでに脚光を浴びている。

2. 研究の目的

癌進展メカニズムの解明と克服法の確立は生命予後改善に大きく貢献する。癌細胞原発巣からの遊離、転移巣での接着、浸潤と生着、増殖、血管新生の各過程に多数の転移促進・抑制分子群が関与している。そこで本研究では、様々な観点から、**snoRNA** を含むさまざまな癌進展関連エピゲノム変化の同定を行う。さらに、血液からの診断・転移バイオマーカー検索を行い、さらに胃癌患者の組織と血液がマッチしたサンプルを使用することにより、胃癌分泌血清バイオマーカーを直接的に解明することは本研究の斬新的な点と言え、早期胃癌患者から転移性胃癌患者に至るまで幅広い患者層への臨床的償却に直結した研究を遂行することを目的とする。

3. 研究の方法

・ Non-coding RNA・遺伝子発現網羅的解析

腹膜播種転移陽性胃癌 5 例、リンパ節転移陽性胃癌 5 例、リンパ節転移陰性胃癌 5 例、正常胃粘膜 5 例を使用し、cDNA アレイ、メチル化アレイを施行した

・ RNA 抽出(組織)、cDNA 化

胃癌組織 150 例の原発腫瘍、近傍正常胃粘膜より採取した RNA later 保存凍結標本から RNA を miRNeasy RNA extraction kit(Qiagen)を利用して抽出し、cDNA を random hexamer を使用して合成した

・ RNA 抽出(血清)

胃癌患者の術前血清 200ul より miRNeasy serum/plasma RNA extraction kit(Qiagen)を使用して RNA を抽出した。また RNA 抽出過程において cel-miR-39 を添加し、定量 PCR の際の normalizer に使用した。

・ 定量的 PCR

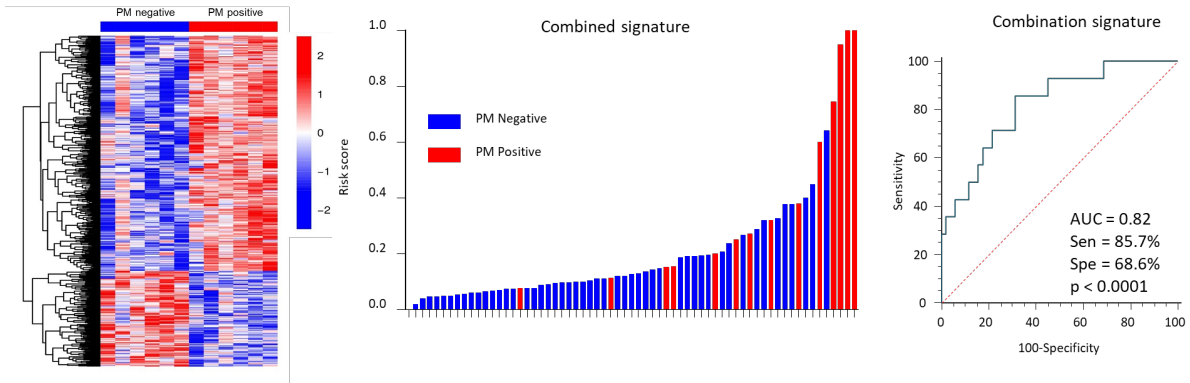
胃組織より抽出した cDNA は、Standard curve method を使用し、Step-One Plus リアルタイム PCR システム(Thermo scientific)で GAPDH を normalizer として qPCR を施行した。また miRNA の定量解析は、Taqman primer と Taqman microRNA RT kit を利用して microRNA-specific な逆転写を施行したうえで、qPCR を同様に施行した。また normalizer には miR-16 を使用した。

・ In vitro 解析:

胃癌細胞株を使用し、候補遺伝子を siRNA transfection で遺伝子発現抑制を行ったうえで、MTT assay、Invasion assay、migration assay などをおこない、遺伝子発現調節による phenotype の変化を評価した。

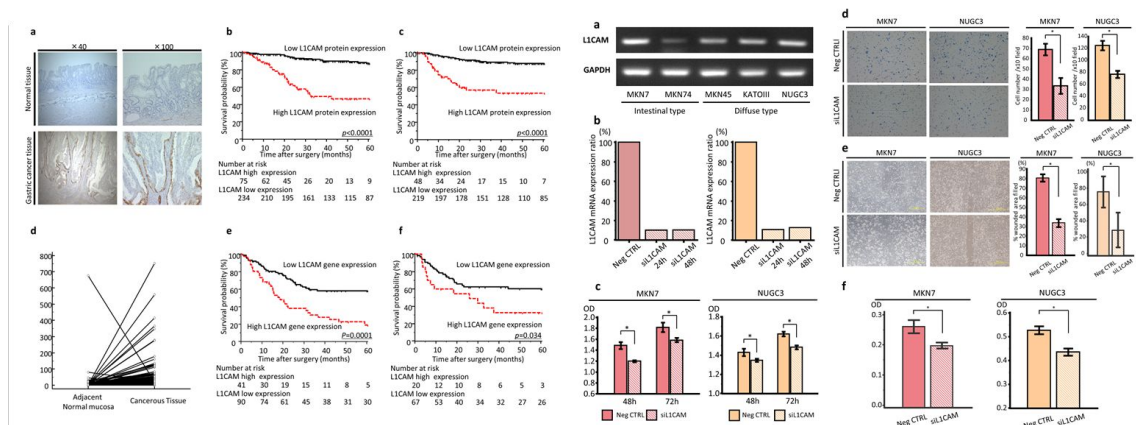
4 . 研究成果

腹膜播種進展にかかわる可能性のある Non-coding RNA を同定するために、腹膜播種転移陽性・陰性症例における胃癌組織の網羅的発現を行ったところ、有望な snoRNA は同定されなかったが、本解析に伴い、いくつかの miRNA が同定された。この miRNA の発現解析を、原発組織を用いておこなうと、腹膜播種を同定可能である可能性が示唆されたため、その combination score が、腹膜播種患者を高率に同定しうることを確認した(下図)。



さらに遺伝子発現レベルにおいても同様の解析を進めると、細胞接着分子の一種である L1-adhesion molecule (L1CAM) が、癌進展に非常にかかわる可能性が示唆されたため、解析を進めたところ、免疫染色解析で、L1CAM は正常粘膜と比較し、胃癌組織の癌細胞に有意に発現増加をみとめるほか、胃癌組織における L1CAM 高発現群は、低発現群と比較し有意に予後不良となることが分かった。

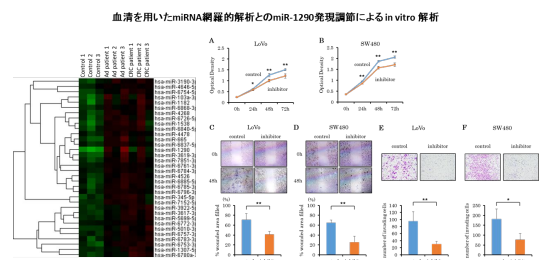
臨床病理学的因子との相関では、リンパ節転移のほか腹膜播種転移陽性症例とも相関し、全生存期間、無再発生存期間において有意に予後不良となることがわかった。さらにこれを臨床病理学的因子の交絡を除去した Propensity score matching をおこなっても L1CAM 高発現自身が有意な予後マーカーとなる他、生検サンプルを視野に入れた手術摘出標本での凍結標本を用いた qPCR 解析でも同様の結果になることを確認した。さらにその機能解析を進めたが、L1CAM が、増殖能のほか、遊走能や浸潤能、さらにはアノキス抑制性に深く関与することを胃癌細胞株で確認した。



またさらに本研究計画を大腸癌にもす野を広げて解析を進めたところ、大腸癌患者と健常人血清の比較検討で同定できた miR-1290 に着目し、まずはこの miR-1290 の癌進展における機能解析を優先する方向とした(下図)。

miR-1290 を miRNA Inhibitor を使用して siRNA transfection を行うと、増殖能、遊走能、浸潤能は抑制されることがあきらかとなり、miR-1290 は癌進展に深くかかわる Oncgenic miRNA である可能性が示唆された。

さらに大腸癌組織と正常粘膜の発現比較を行う

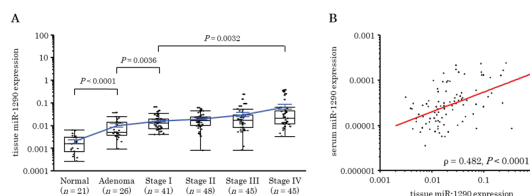


と miR-1290 は有意に癌組織で発現上昇をみとめた。さらに癌組織における miR-1290 は病期進展に伴い発現上昇をきたすことが明らかとなった(下図)。

以上の背景から、miR-1290 は、がん遺伝子で大腸癌組織特異的に発現増加をきたすることから、血清を用いた非侵襲的バイオマーカーになる可能性があるため、血清より抽出した RNA を利用し、miR-1290 の発現解析を行った。

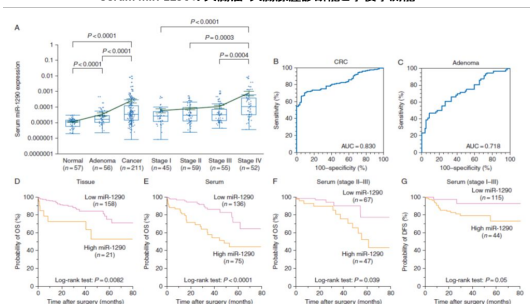
興味深いことに、血清 miR-1290 は、癌組織発現と有意な正の相関を認め、さらに病期進展に伴い、発現上昇をきたすため、有用な予後予測・再発予測マーカーとなるほか、大腸癌診断マーカーとなりうるということがわかった。さらに癌組織と血清 miR-1290 発現と臨床病理学的因子との相関解析を行うと、癌組織ではなく、血清中 miR-1290 発現が、腹膜播種陽性大腸癌症例で有意に序章していることが明らかとなり ($p < 0.0001$)、腹膜播種診断非侵襲バイオマーカーへの転用の可能性も考慮された (Imaoka H, Fujikawa H et al. *Ann Oncol.* 2016 Oct;27(10):1879-86)

癌組織miR-1290の病期進展に伴う発現変化と血清miR-1290との発現相関



再発予測マーカーとなるほか、大腸癌診断マ

Serum miR-1290の大腸癌・大腸腺腫診断能と予後予測能



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Enhanced AZIN1 RNA editing and overexpression of its regulatory enzyme ADAR1 are important prognostic biomarkers in gastric cancer.

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.

J Transl Med. 2018 Dec 18;16(1):366. doi: 10.1186/s12967-018-1740-z.11 査読有

Colony-stimulating factor-1 and colony-stimulating factor-1 receptor co-expression is associated with disease progression in gastric cancer.

Okugawa Y, [Toiyama Y](#), Ichikawa T, Kawamura M, Yasuda H, Fujikawa H, Saigusa S, [Ohi M](#), Araki T, Tanaka K, Inoue Y, Tanaka M, Miki C, [Kusunoki M](#).

Int J Oncol. 2018 Aug;53(2):737-749. 査読有

Prognostic Impact of Preoperative Albumin-to-Globulin Ratio in Patients with Colon Cancer Undergoing Surgery with Curative Intent.

Fujikawa H, [Toiyama Y](#), Inoue Y, [Imaoka H](#), Shimura T, Okigami M, Yasuda H, Hiro J, [Yoshiyama S](#), Saigusa S, Kobayashi M, [Ohi M](#), Araki T, [Mohri Y](#), [Kusunoki M](#).

Anticancer Res. 2017 Mar;37(3):1335-1342. 査読有

MicroRNA-7 Is Associated with Malignant Potential and Poor Prognosis in Human Colorectal Cancer.

Nagano Y, [Toiyama Y](#), Okugawa Y, [Imaoka H](#), Fujikawa H, Yasuda H, [Yoshiyama S](#), Hiro J, Kobayashi M, [Ohi M](#), Araki T, Inoue Y, [Mohri Y](#), [Kusunoki M](#).

Anticancer Res. 2016 Dec;36(12):6521-6526. 査読有

Circulating microRNA-1290 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in human colorectal cancer.

[Imaoka H](#), [Toiyama Y](#), Fujikawa H, Hiro J, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, [Mohri Y](#), Mori T, Kato T, Toden S, Goel A, [Kusunoki M](#).

Ann Oncol. 2016 Oct;27(10):1879-86. doi: 10.1093/annonc/mdw279 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Yoshinaga Okugawa, [Yuji Toiyama](#), [Yasuhiko Mohri](#), Akira Yamamoto, Tsunehiko Shigemori, Chengzeng Yin, Aya Narumi, Shozou Ide, Takahito Kitahima, Hiromi Yasuda, Hiroyuki Fujikawa, Junichiro Hiro, [Shigeyuki Yoshiyama](#), [Masaki Ohi](#), Koji Tanaka, Toshimitsu Araki, and [Masato Kusunoki](#). L1CAM as a pivotal mediator for disease progression and prognostic biomarker in gastric cancer patients. AACR Annual Meeting 2018

奥川喜永 [問山裕二](#) 森浩一郎 市川崇 川村幹雄 安田裕美 藤川裕之 三枝晋 [吉山繁幸](#) [大井正貴](#) 荒木俊光 田中光司 井上靖浩 三木誓雄 [楠正人](#) 胃癌における

奥川喜永、問山裕二、田中光司、井出正造、今岡裕基、志村匡信、北嶋貴仁、近藤哲、廣純一郎、毛利靖彦、三木誓雄、楠正人 胃癌における AZIN1 RNA 修飾と ADAR1/ADAR2 発現の臨床的意義 第 76 回日本癌学会学術総会 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：問山 裕二

ローマ字氏名：(**Toiyama, Yuji**)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁) : **00422824**

研究分担者氏名：大井 正貴

ローマ字氏名：(**Ohi, Masaki**)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁) : **40418752**

研究分担者氏名：楠 正人

ローマ字氏名：(**Kusunoki, Masato**)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : **50192026**

研究分担者氏名：吉山 繁幸

ローマ字氏名：(**Yoshiyama, Shigeyuki**)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：リサーチアソシエイト

研究者番号 (8 桁) : **60444436**

研究分担者氏名：毛利 靖彦

ローマ字氏名：(**Mohri, Yasuhiko**)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：客員准教授

研究者番号 (8 桁) : **70345974**

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。