

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：18K08700

研究課題名(和文)胃癌における臓器特異性転移におけるエピゲノムのあらたな役割解明

研究課題名(英文)The mechanistic exploration of epigenetic change as for organ specific metastasis in gastric cancer

研究代表者

川村 幹雄(Kawamura, Mikio)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00722589

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)：他の癌種において異常発現が報告されておりプライマー配列が解明されている Circular RNAであるCirc0000892に関して、胃癌組織ならびに正常粘膜より抽出したRNA(n=138)を用いてqRT-PCR法にて発現定量をおこなった。結果としてCirc0000892の発現値は胃癌組織では正常粘膜と比べて著明に低発現であった(p<0.001)。またCirc0000892低発現群は高発現群と比べて生存予後ならびに無再発予後が著明に不良であった(p<0.05)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌腹膜播種進展に關与するcircular RNAはバイオマーカーとしての有用性には大きな期待が寄せられると考えられる。本研究ではCirc0000892が胃癌進展ならびに予後マーカーとして有用となりうる可能性を証明した。今後はcircular RNAの網羅的プロファイリングをおこない特に腹膜播種進展に關してのバイオマーカー的意義を検証していく予定だが、本研究成果はその試金石として重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we decided to quantify the expression level of Circ0000892 using GC tissues and adjacent normal mucosa (n=138, respectively) by qRT-PCR method. As a result, the expression level of Circ0000892 was significantly low in GC tissues compared with adjacent normal mucosa (p<0.001). Furthermore, the low expression group of Circ0000892 showed significantly poorer overall survival and disease free survival (p<0.05) compared with high expression group.

研究分野：上部消化管悪性腫瘍

キーワード：胃癌 腹膜播種 circular RNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は日本、中国、韓国など東アジアや南米に患者が多い疾患であり、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年度の本邦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)。とりわけ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。近年の画像診断の発達も著しいが、高度進行胃癌の腹膜播種や術後腹膜播種再発の正確な診断には難渋することが多く、審査腹腔鏡も必要に応じて導入されているが麻酔を含めた侵襲など改善すべき点も多い。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というべき治療法は存在していないのが現状である。

したがって腹膜播種診断と治療は胃癌治療の中でも非常に重要な位置を占め、腹膜播種診断目的の新たなバイオマーカーの確立ならびに播種転移機序解明からの新規治療法開発の確立が急がれる現状である。

2. 研究の目的

Circular RNA(CircRNA)は、従来理解されてきた線状 RNA と異なるループ型形状の long ncRNA であり、1990年代から CircRNA の存在は認識されていたがその生理的意義は不明であった。Memczak らの研究では、ヒト細胞内に多数の CircRNA が存在し、高速シーケンサーにより転写産物を網羅的解析すると、一部の CircRNA では特定の miRNA に対する標的配列が多数含まれていることが判明した(Memczak S, et al. Nature2013)。さらに CircRNA は自身の配列に特定の miRNA を結合させることで miRNA の機能を抑制させる miR sponge としての機能を持つことが報告され、CircRNA の癌進展における役割が近年着目されてきており(Hansen TB, Nature 2013)、今後さらなる飛躍が望まれる領域である。CircRNA の特徴として興味深いのは、その特徴的な形状によりエキソヌクレアーゼによる分解から免れるため生体内安定性が非常に高く、新たな血清バイオマーカーとしての可能性が示唆されている点である。

本研究では、胃癌患者で同時性腹膜播種を認めた症例の原発巣との播種巣、ほぼ同一深達度で腹膜播種を認めなかった患者の原発巣、加えて健常粘膜の4群間の profiling を行い、胃癌腹膜播種で異常発現する候補 CircRNA の同定を行う。さらに同一患者の血清を利用して、腫瘍組織、血清ともに profiling をおこない胃癌腹膜播種で異常発現する分泌血清 CircRNA を同定し、胃癌腹膜播種に関する非侵襲バイオマーカーを確立し、さらに腹膜播種進展機序解明からの新規治療法を開発する事を目的とする。本研究はバイオマーカー研究として斬新的で、また治療への応用を考慮した腹膜播種進展機序解明を行う点は、学術的にも意義深いものであり、腹膜播種転移に苦しむ多くの進行胃癌患者に対し、臨床的償却に直結した研究を遂行できる可能性がある」と期待している。

3. 研究の方法

(1)胃癌腹膜播種関連 CircRNA の検索

胃癌患者で同時性腹膜播種(PM)を認めた症例(PM+)の原発巣との播種巣、ほぼ同一深達度で腹膜播種を認めなかった患者(PM-)の原発巣、健常粘膜の計4群で RNA later sample から total RNA を抽出。次世代シーケンスで得た生データを比較解析する

(2)候補 CircRNA の少数サンプルでの検証

・(2-) : PM+例の原発巣 VS PM-例の原発巣 VS 健常粘膜間で著明な発現差のある CircRNA を生物統計学的手法で narrow down して絞り込む。

・(2-) : PM+例の原発巣 VS PM+例の播種巣。特に播種巣で著明発現亢進する CircRNA を同定する。

・(2-)と(2-)で同定された候補 CircRNA を少数サンプルで qRT-PCR 法で発現定量をおこない群間の発現量の差を統計学的に解析する。

(3)候補 CircRNA の多数サンプルでの検証

前述の(2-)と(2-)で同定された候補 CircRNA に関して、多数サンプルで qRT-PCR 法で発現定量をおこないデータ解析する。特に(2-)に関してはあらかじめ予後が判明しているサンプルを用い、候補 CircRNA の発現量が臨床病理学的、異時性再発の有無、予後と相関を認めるか否かも解析する。

(4)候補 CircRNA の血液、腹水サンプルでの検証

(2)(3)で同定された候補 CircRNA が胃癌 PM+症例の血清で異常発現するか、さらには術中腹水で異常発現するか否かを検証する。

(5)候補 CircRNA の In Vitro での機能解析

候補 CircRNA の siRNA を胃癌細胞株に lipofectamine で transfection させて候補 CircRNA を knockdown し、各種 In vitro assay で癌進展に関する機能変化を解析する。

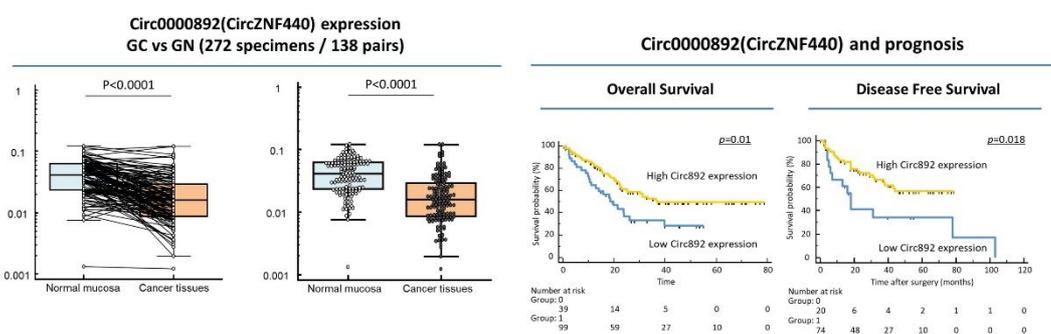
(6)候補 CircRNA の In Vivo での機能解析

(5)で有用な結果が出た胃癌細胞株を用いて、ヌードマウスに腹腔内投与し腹膜播種形成能の変化を評価する。

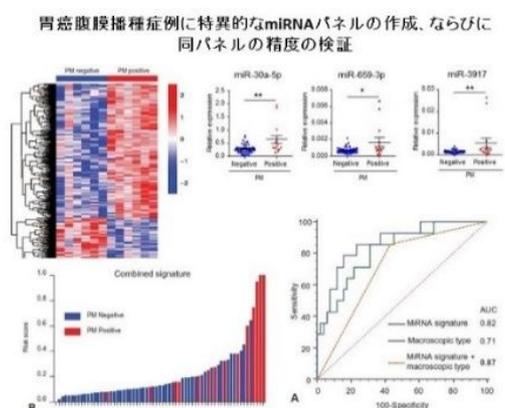
4. 研究成果

前述に示した計画のもと、まず他の癌種において異常発現が報告されておりプライマー配列が解明されている Circular RNA である Circ0000892 に関して、胃癌組織ならびに正常粘膜より抽出した RNA (n=138) を用いて qRT-PCR 法にて発現定量をおこなった。結果として Circ0000892 の発現値は胃癌組織では正常粘膜と比べて著明に低発現であった ($p < 0.001$)。また Circ0000892 低発現群は高発現群と比べて生存予後ならびに無再発予後が著明に不良であった ($p < 0.05$) (下図)。この preliminary data をもとに、Circ0000892 発現と胃癌腹膜播種に関する相関を検証し、Circ0000892 発現が胃癌腹膜播種進展において key player となり得るか否かを胃癌細胞株/マウスモデルで検証していく予定である (ongoing experiments)。

Circ0000892の胃癌診断マーカー、予後予測マーカーとしての意義



また随伴する研究に関してだが、我々は胃癌腹膜播種で異常発現する miRNA 群を網羅的解析で同定し、そのバイオマーカーとしての意義を検証した。胃癌腹膜播種陽性/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する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例を同定できる可能性を報告した (右図、Shimura T, Toiyama Y, Okugawa Y, et al. Ann Surg. 2019 Oct 28. Epub ahead of print)



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 circular RNA や他の ncRNA に関してそのバイオマーカーとしての有用性には大きな期待が寄せられると考える。特に circular RNA の網羅的プロファイリングをおこなう上で circular microarray をおこなう場合が多いが、近年では circular RNA specific next generation sequencing (NGS) を行う報告も増加しつつある。NGS においては生データの解析の上で、十分な経験に基づいた pipeline の構築が重要となってくるため、当講座において本研究領域は発展途上な点は否めないが、他施設とのコラボレートによる生物統計学のアプローチを進展させていき、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6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ichikawa Takashi, Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Tanaka Koji, Yin Chengzeng, Kitajima Takahito, Kondo Satoru, Shimura Tadanobu, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato	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 British Journal of 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 Shimura Tadanobu, Toden Shusuke, Kandimalla Raju, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Kanda Mitsuro, Baba Hideo, Kodera Yasuhiro, Kusunoki Masato, Goel Ajay	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 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
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 該当する
1. 著者名 Omura Yusuke, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Yamamoto Akira, Yin Chengzeng, Kusunoki Kurando, Kusunoki Yukina, Shigemori Tsunehiko, Ide Shozo, Kitajima Takahito, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Hiro Junichiro, Yoshiyama Shigeyuki, Ohi Masaki, Kusunoki Masato	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 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	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 Shigemori Tsunehiko, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Yamamoto Akira, Yin Chengzeng, Narumi Aya, Ichikawa Takashi, Ide Shozo, Shimura Tadanobu, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Hiro Junichiro, Yoshiyama Shigeyuki, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato	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 Annals of Surgical Oncology	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 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.	4. 巻 53
2. 論文標題 Colony-stimulating factor-1 and colony-stimulating factor-1 receptor co-expression is associated with disease progression in gastric cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Oncol.	6. 最初と最後の頁 737-749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4406.	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 Toiyama Y, Okugawa Y, Fleshman J, Richard Boland C, Goel A.	4. 巻 1870
2. 論文標題 MicroRNAs as potential liquid biopsy biomarkers in colorectal cancer: A systematic review.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Rev Cancer.	6. 最初と最後の頁 274-282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbcan.2018.05.006.	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 該当する

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

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 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
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 奥川喜永、問山裕二、井出正造、北嶋貴仁、志村匡信、廣 純一郎、田中光司、楠 正人
2. 発表標題 胃癌におけるL1CAM発現解析の臨床的意義とその癌進展における機能
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会、京都
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	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	安田 裕美 (Yasuda Hiromi) (60586767)	三重大学・医学部附属病院・助教 (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
---------	---------