

平成 30 年 9 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10094

研究課題名(和文) 胃癌外科的治療テラメード化目的のリンパ節転移同定エピゲノムパネルの確立

研究課題名(英文) Establishment of epigenome panel for identification of lymph node metastasis in gastric cancer

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌リンパ節転移に関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miR-4286が癌進行に伴って発現増加し、リンパ節転移進展に深くかかわることが判明し、新規バイオマーカーになり得ると考えられた。DNAメチル化に関しては網羅的解析では有用なマーカーは同定しえなかったが、遺伝子発現レベルにおいて注目すると、炎症性発癌に深くかかわるとされるAngiopoietin-like protein 2(ANGPTL2)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、リンパ節転移と関連するのみならず、有用な予後予測マーカーとなることを同定した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify clinically relevant epigenetic markers for presence of lymph node metastasis in gastric cancer. Array-based comprehensive analysis demonstrated that miR-4286 expression was significantly increased with disease development and lymph node metastasis in gastric cancer. Although we could not identify appropriate candidates of methylated DNA, gene expression analysis demonstrated that increased ANGPTL2 expression was deeply involved in lymph node metastasis and poor prognosis in gastric cancer patients.

研究分野：悪性腫瘍

キーワード：胃癌 リンパ節転移 遠隔転移 microRNA DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

胃癌は近年検診や胃内視鏡などの普及もあり、死者数は現症傾向にあるものの、日本では依然、死亡者数の多い疾患である。早期胃癌については、内視鏡治療や手術治療で根治が望める可能性が高いが、内視鏡治療で完結できる病変の範囲は狭く、内視鏡治療適応外の病変についてはもれなく予防的なリンパ節郭清を伴う胃切除が勧められる。しかしながら早期胃癌に関してはリンパ節転移頻度が約15%程度であり、残りの85%の患者に対しては、根治性という観点からも過大手術となっている現状がある。過大手術のもたらす患者の胃切除後後遺症などのデメリットは少なくない。リンパ節転移の予測方法を確立することは不必要な胃切除やリンパ節郭清を回避できうる可能性があり、早期胃癌の治療を大きく変革し、個別化治療の選択や患者 QOL の改善に寄与する。

2. 研究の目的

胃癌リンパ節転移に関与するエピゲノム変化を同定し、リンパ節転移メカニズムの解明と、新たな分子診断法の確立や新規治療法の開発をする。これは胃癌の腫瘍学的予後の改善を目的とする一方で、胃癌縮小手術や内視鏡的胃癌治療の適応拡大にも寄与し、胃癌患者の腫瘍学的根治性を担保しつつ QOL の向上をめざす胃癌外科的治療のテーラーメイド化(個別化)を実現することを目的とする。

3. 研究の方法

・DNAメチル化・microRNA・遺伝子発現網羅的解析：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、microRNAアレイ、メチル化アレイ、cDNAアレイを施行した。

・RNA抽出(組織)、cDNA化

・胃癌組織130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。

・DNA抽出、バイサルファイト処理

・胃癌組織130例の原発腫瘍、近傍正常胃粘膜より採取した凍結標本からDNAをQiamp DNA mini kit(Qiagen)を利用して抽出し、EZ Gold Methylation kitを用いて bisulfite DNA 合成した。

・定量的PCR

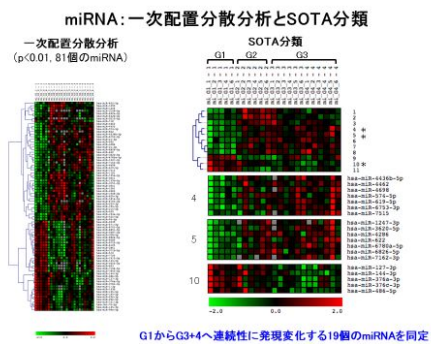
・胃組織より抽出したcDNAは、Standard curve methodを使用し、Step-One Plus リアルタイムPCRシステム(Thermo scientific)でGAPDHをnormalizerとしてqPCRを施行した。またmiRNAの定量解析は、Taqman primerとTaqman microRNA RT kitを利用してmicroRNA-specificな逆転写を施行したうえで、qPCRを同様に施行した。またnormalizerにはmiR-16を使用した。

In vivo 解析:

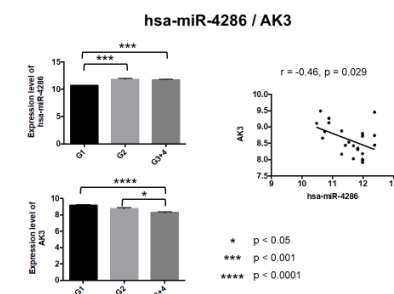
胃癌細胞株を使用し、候補遺伝子をsiRNA transfectionで遺伝子発現抑制を行ったうえで、MTT assay、Invasion assay、migration assayなどをおこない、遺伝子発現調節によるphenotypeの変化を評価した。

4. 研究成果

胃癌リンパ節転移過程に関わるエピゲノム変化(特にmicroRNAならびDNAメチル化)を同定することを目的に、リンパ節転移陰性患者群、リンパ節転移陽性患者群の原発腫瘍、ならびに正常胃粘膜の3群間をprofilingを、網羅的解析を行った。



その結果、miR-4286が段階的に発現増加を認め、またcDNAarrayの結果と統合解析を行うと、miR-4286がAK3と逆相関の関係を保つことが明らかとなった。

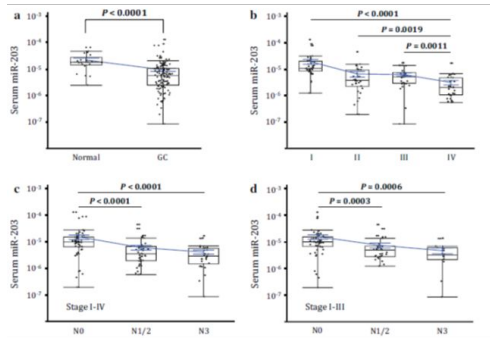


この結果から、has-miR-4286は、癌進行に伴って発現増加し、リンパ節転移進展にも深くかかわるとともに新規バイオマーカーになる可能性もあるため、現在、validationをすすめているが、発現量が少ないこともあり、発現解析方法をdigital PCRなどに変更する方向で、遂行中である。

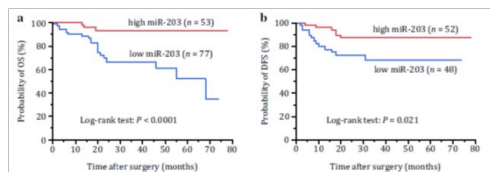
また本研究に付随し上皮間葉移行にかかわ

る miRNA(miR-200a, -200b, -200c, -141, -429, -203)に注目し、胃癌患者 130 例の術前血清より抽出した RNA を利用し、それらの発現解析をしたところ、血清 miR-203 は、病期進展、とりわけリンパ節転移進展にともない有意に発現低下をきたし、また再発予測、予後予測に有用なマーカーであることを報告した(下図、Imaoka H, Yasuda H, et al. Gastric cancer 2016 Jul;19(3):744-53)。

血清miR-203は病期進展とりわけリンパ節転移進展に相関する

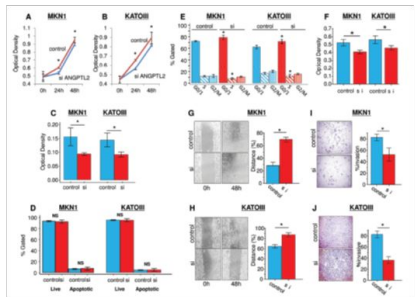


血清miR-203低下は再発予測・予後予測マーカーとなりうる

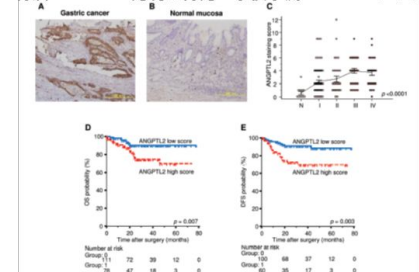


またメチル化に関しては残念ながら現時点までに有用なマーカーは同定できていないが、遺伝子発現レベルにおいて注目すると、炎症性発癌に深くかかわるとされる Angiopoietin-like protein 2(ANGPTL2)が、癌組織特異的に発現増加するのみならず、病期進展に伴い発現増加し、リンパ節転移と相関するのみならず、有用な予後予測マーカーとなることを同定した。さらにこの ANGPTL2 の発現抑制を胃癌細胞株で行うと、増殖能や浸潤能、遊走能を抑制することがあきらかと

ANGPTL2発現抑制は増殖・浸潤能・遊走能を抑制する



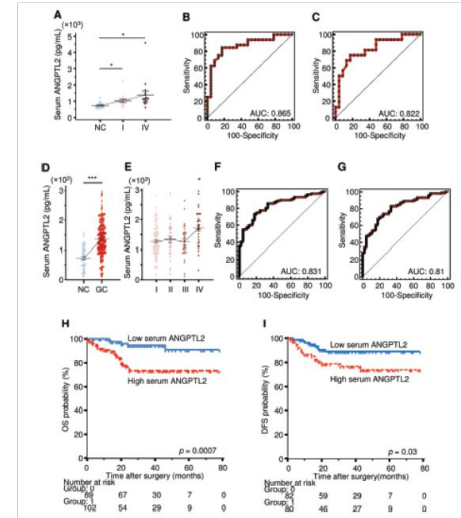
胃癌ANGPTL2発現は再発・予後予測マーカーである



なり、胃癌進展において重要な役割を担っている可能性が示唆された。(Shimura T, Yasuda H, et al. Anticancer Res. 2015 Sep;35(9):4633-9)。

また ANGPTL2 が分泌型蛋白であることから、胃癌患者血清を用いてその発現解析を ELISA 法でおこなうと、血清 ANGPTL2 濃度増加は、有用な胃癌診断マーカーとなりうるほか、予後予測マーカーとなりうる可能性が示唆された(下図: Toiyama Y, Yasuda H et al. Carcinogenesis. 2015 ;36(12):1474-83)。

胃癌血清ANGPTL2は診断・再発・予後予測マーカーとなる



なお、本研究は現在も遂行中であり、今後もあらたなマーカーを同定し、またリンパ節転移進展の一助を解明する可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Toiyama Y, Yasuda H, Ohi M, Yoshiyama S, Araki T, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M.

Clinical impact of preoperative albumin to globulin ratio in gastric cancer patients with curative intent. Am J Surg. 2017 Jan;213(1):120-126 査読有

Toiyama Y, Shimura T, Yasuda H, Fujikawa H, Okita Y, Kobayashi M, Ohi M, Yoshiyama S, Hiro J, Araki T, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M. Clinical Burden of C-Reactive Protein/Albumin Ratio Before Curative Surgery for Patients with Gastric Cancer. Anticancer Res. 2016 Dec;36(12):6491-6498. 査読有

Okugawa Y, Mohri Y, Tanaka K, Kawamura M, Saigusa S, Toiyama Y, Ohi M, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M.

Metastasis-associated protein is a predictive biomarker for metastasis and recurrence in gastric cancer.
Oncol Rep. 2016 Oct;36(4):1893-900
査読有

Imaoka H, Toiyama Y, Okigami M, Yasuda H, Saigusa S, Ohi M, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M.
Circulating microRNA-203 predicts metastases, early recurrence, and poor prognosis in human gastric cancer.
Gastric Cancer. 2016 Jul;19(3):744-53
査読有

Mohri Y, Tanaka K, Toiyama Y, Ohi M, Yasuda H, Inoue Y, Kusunoki M.
Impact of Preoperative Neutrophil to Lymphocyte Ratio and Postoperative Infectious Complications on Survival After Curative Gastrectomy for Gastric Cancer: A Single Institutional Cohort Study.
Medicine (Baltimore). 2016 Mar;95(11):e3125.
査読有

Toiyama Y, Tanaka K, Kitajima T, Shimura T, Imaoka H, Mori K, Okigami M, Yasuda H, Okugawa Y, Saigusa S, Ohi M, Inoue Y, Mohri Y, Goel A, Kusunoki M.
Serum angiopoietin-like protein 2 as a potential biomarker for diagnosis, early recurrence and prognosis in gastric cancer patients.
Carcinogenesis. 2015 Dec;36(12):1474-83.
査読有

Shimura T, Toiyama Y, Tanaka K, Saigusa S, Kitajima T, Kondo S, Okigami M, Yasuda H, Ohi M, Araki T, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M.
Angiopoietin-like Protein 2 as a Predictor of Early Recurrence in Patients After Curative Surgery for Gastric Cancer.
Anticancer Res. 2015 Sep;35(9):4633-9.
査読有

[学会発表](計7件)

Okugawa Y, Toiyama Y, Yasuda H et al :
Novel findings for the clinical significance of RNA editing status of AZIN1 and ADAR 1 and 2 expression levels in gastric cancer patients. AACR Annual Meeting, Washington, D.C., USA, April 4, 2017

問山裕二, 安田裕美 他:根治切除を施行した胃癌患者における術前 CRP albumin ratio (CAR)の意義.第103回日本消化器病学会総会、東京、2017.4.21

Yasuda H : Lymphocyte count is a prognostic marker for recurrence in stage.第89回日本胃癌学会総会、広島、2017.3.9 会総会、2017.3

Mori K, Toiyama Y, Yasuda H et al :
Preoperative prediction of peritoneal metastasis in gastric cancer as an indicator for neoadjuvant treatment. 2016 Gastrointestinal Cancers Symposium, San Francisco, California, Jan 21, 2016

奥川喜永, 毛利靖彦, 安田裕美 他 :胃癌に対する転移関連遺伝子 panel を利用した術前リンパ節転移診断と新たな治療戦略. JDDW2016 第24回日本消化器関連学会週間第14回日本消化器外科学会大会、神戸、2016.11.4

今岡裕基, 問山裕二, 安田裕美 他 :胃癌における転移および予後不良予測因子としての血清中 microRNA-203 発現の検討. JDDW2015 第23回日本消化器関連学会週間第13回日本消化器外科学会大会、品川、2015.10.10

Toiyama Y, Yasuda H et al :
Circulating microRNA-203 Predicts Metastases, Early Recurrence, and Poor Prognosis in Human Gastric Cancer. Digestive Disease Week 2015, Washington DC, May 16, 2015

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等;とくになし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

問山 裕二 (Toiyama, Yuji)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00422824

毛利 靖彦 (Mhori, Yasuhiko)
三重大学・医学系研究科・客員准教授
研究者番号：70345974

楠 正人 (Kusunoki, Masato)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50192026

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()