

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10581

研究課題名（和文）国際共同研究による新規胃癌血清腫瘍マーカーの開発と血中移行機序の検討

研究課題名（英文）The diagnostic performance and mechanisms of the release into the circulation of novel serum biomarkers for gastric cancer

研究代表者

神田 光郎（KANDA, Mitsuro）

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00644668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：胃癌診療のさらなる向上のためには、高感度・高特異度で診断に役立つのみならず、予後予測因子としても期待できる血清腫瘍マーカーの開発が望まれる。先行研究でANOS1、MAGE-D2、DPYSL3の3種の分子の術前血清値が胃癌の進行度・予後と相関することを見出し、これらの分子の胃癌血清腫瘍マーカーとしての有用性を前向き国際共同研究によって検証した。これにより、血清ANOS1値は胃癌早期診断技術として有望であること、血清DPYSL3値は胃癌進行度マーカーとして有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有望な予備データの得られた分子の血清診断能を明らかにしたことで、現在の医療で重視される個別化治療の手段としての新規胃癌腫瘍マーカー開発につながることを期待される。検体採取に特殊な手技を必要とせず、広く一般に普及しうる血清診断は、胃癌初期存在診断、進展度診断、再発モニタリングおよび治療効果判定のためのスクリーニング法の対象として理想的である。新規マーカー単独、あるいは既存の腫瘍マーカーとの組み合わせによって緻密な胃癌患者の管理が可能となるため、様々な面から胃癌の治療成績のさらなる改善が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Development of high-performance serum biomarkers will likely improve treatment outcomes of patients with gastric cancer (GC). We conducted a prospective multicenter observational study aimed at validating the diagnostic performance of these potential markers. We analyzed serum levels before and after surgery of the three potential biomarkers in patients with GC and healthy volunteers. Quantification of serum and GC tissue levels was performed using an ELISA. Area under the curve values that discriminated patients with GC from healthy controls were 0.7058, 0.6188, and 0.5031 for ANOS1, DPYSL3, and MAGED2, respectively. Serum ANOS1 levels were significantly elevated in patients with stage I GC compared with those of healthy controls and decreased after resection of primary GC lesions. The combination of serum ANOS1 and DPYSL3 levels increased the AUC value that discriminated patients with GC from healthy controls.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 腫瘍マーカー 国際共同研究

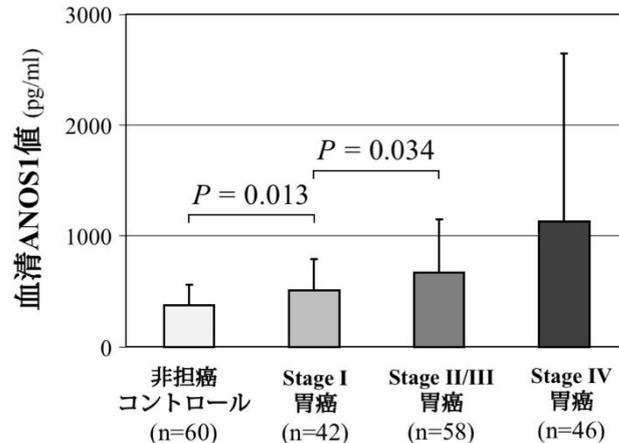
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は依然として本邦で罹患率が高く、その克服は重大なテーマのひとつである。スクリーニング、治療方針決定のための進行度診断、治療の効果判定、切除術後の再発モニタリングのいずれの場面においても、非侵襲的かつ簡便に採取可能な血清で測定が可能な優れた腫瘍マーカーの開発が必要である。こうしたマーカーの候補は分子生物学的解析により数多く見出されてきたが、どれも実用化には至っておらず、現在でも CEA、CA19-9 などの古典的な腫瘍マーカーが使用されている。しかし、これら既存の腫瘍マーカーは感度、特異性ともに物足りず、これらを凌駕する診断能を有する腫瘍マーカーの開発が個別化治療の時代の到来に際し急務と考える。

研究代表者はこれまで、胃癌の悪性度に関与する分子を数多く同定し報告してきたが、そのうち Anosmin-1 (ANOS1, Int J Cancer 2016), Melanoma-associated antigen D2 (MAGE-D2, Ann Surg Oncol 2016), Dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3, J Exp Clin Cancer Res 2014) の3分子は組織中発現量のみならず血清値も胃癌患者群で健常者に比し有意に高値を示しており、胃癌の魅力的な新規血清腫瘍マーカー候補と考え、すでに基礎特許出願 (特願 2015-159756) および国際出願 (PCT/JP2016/56788) を完了している。

しかし、ここまでのデータは限られた検体数の後ろ向き解析から得られたものであり、体外診断用医薬品として商品開発を進めるにあたり、至適カットオフ値の設定を含め、複数の医療機関における大きな検体数での validation が必要であった。そこでこれまでの研究成果を基に韓国ソウル大学 Han-Kwang Yang 教授らと協議を重ね、prospective な血清検体の集積について合意が得て本研究を遂行する体制が構築された。



2. 研究の目的

胃癌診療のさらなる向上のためには、高感度・高特異度で診断に役立つのみならず、予後予測因子としても期待できる血清腫瘍マーカーの開発が望まれる。先行研究で ANOS1、MAGE-D2、DPYSL3 の3種の分子の術前血清値が胃癌の進行度・予後と相関することを見出し、これらを腫瘍マーカーとした場合のカットオフ値も設定した。本研究では国際共同研究により実現する大規模な検体数とデータを validation set として利用し、これらの分子の胃癌血清腫瘍マーカーとしての有用性を検証することを目的とした。韓国では近年高度な集約化システムにより特定の施設においてきわめて多数の症例が均一化された治療を受けている。共同研究施設であるソウル大学は、中でも先進的な High volume center として世界的に認知されており、ここから prospective に採取、提供される多数の検体の解析は、本研究の目的を遂行する上で大きな力となった。

平行して、これらの分子の腫瘍組織・細胞内局在や血中への移行機序について探索することにより、腫瘍マーカーとしての有用性にさらなる説得力を持たせ、体外診断用医薬品としての開発を進めていく。

3. 研究の方法

(1) 前向きな検体・データ収集

本研究はヒト検体を使用した前向き臨床観察研究にあたるため、名古屋大学医学部附属病院および国際共同研究施設であるソウル大学がん研究所の倫理委員会に研究計画を申請し承認を得た。名古屋大学医学部附属病院、ソウル大学病院、ソウル大学 Bundang 病院において血清/組織検体および CEA、CA19-9 値を含む診療データを前向きに収集した。収集検体は、術前術後血清と進行胃癌症例の胃癌凍結組織である。さらに、コントロールとしての非担癌者からの血清検体も収集した。収集された血清検体は参加施設間で同一の処理方法 (採血管、採血後処理、保存方法) を徹底し、匿名化して定期的に当施設へ集約した。

(2) 血清値の測定

ANOS1、MAGE-D2、DPYSL3 それぞれに対応した ELISA kit (統一 lot) を用いて、収集された血清検体中濃度測定を実施した。各反応は Triplicate により行い、データの確実性を担保した。各検体は連結可能匿名化した上で、検者には盲検にて測定し研究代表者がデータを管理した。

(3) データ解析；候補分子の血清診断マーカーとしての性能評価

ANOS1、MAGE-D2、DPYSL3 のそれぞれにおいて、測定された治療前血清値と臨床データとの相関性を解析した。特に、存在診断としてのコントロール群と胃癌症例群間の差、進展度診断としての進行度との相関性に着目した。

(4) 既存の腫瘍マーカーとの比較

現在胃癌診療で汎用されている血清 CEA、CA19-9 値の解析結果と比較する。

(5) 候補分子の体内動態と、他癌種における血清値

胃癌原発巣組織中 mRNA 発現度を定量的 PCR 法で測定し、血清値との相関性を解析した。さらに、術後 7 日、術後 21 日の血清値を測定し、原発巣摘除直後の候補マーカーの血中からの減衰推移を調べた。これらにより、候補マーカー血中動態が原発巣での発現量を反映しているものかという点と、その血中での半減期についてのデータを得た。当施設で、食道扁平上皮癌、乳癌、肝細胞癌、膵癌、大腸癌の 30 例において、倫理委員会の承認のもと治療前血清を収集した。これらを対象に ANOS1、MAGE-D2、DPYSL3 値を測定し、胃癌以外の癌腫での血清値を調査し、胃癌に特異的なマーカーとなるのか、あるいは他の癌種においても有用性をもつ腫瘍マーカーとなるのかを確認した。

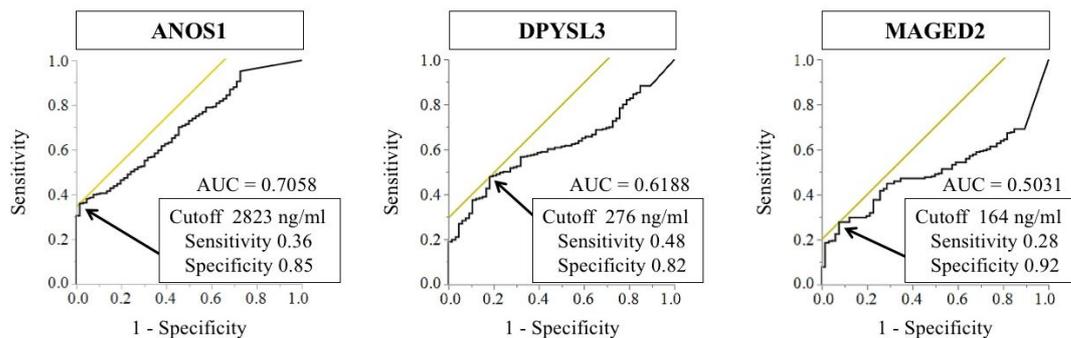
4. 研究成果

◆ 試料と診療データの集積

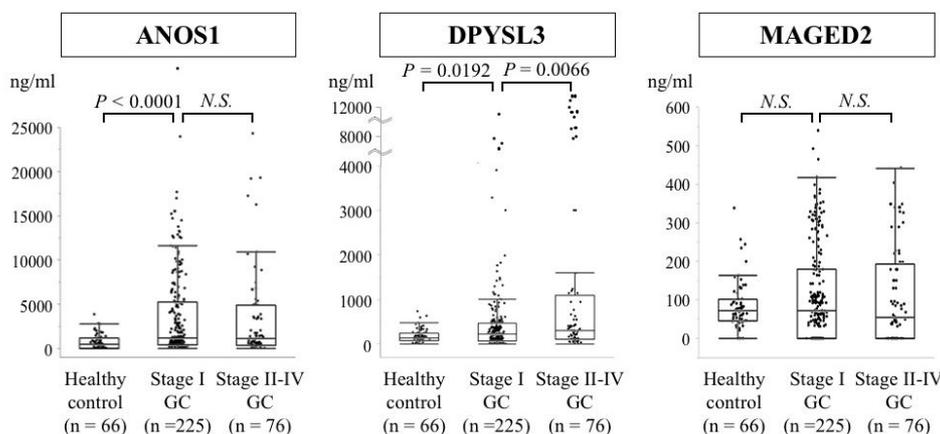
名古屋大学医学部附属病院、ソウル大学病院、ソウル大学 Bundang 病院から、318 の新規胃癌症例の試料と診療データが集積され、うち 301 例が解析対象となった。男女比は男 206 人、女 95 人であった。平均年齢は 62.8 歳であった。臨床病期は、Stage I が 225 人(74%)、Stage II が 47 人(16%)、Stage III が 26 人(9%)、Stage IV が 3 人(1%)であった。コントロール群として 66 人から血清を収集した。

◆ 血清 ANOS1、MAGE-D2、DPYSL3 値の、コントロール群と胃癌患者群の違い

ROC 曲線解析で、血清 ANOS1、MAGE-D2、DPYSL3 値の胃癌存在診断能を評価した。血清 ANOS1、MAGE-D2、DPYSL3 値の AUC 値はそれぞれ 0.7058、0.6188、0.5031 であり、ANOS1 は最も胃癌診断能が高かった。血清 ANOS1/DPYSL3 値、DPYSL3/MAGED2、MAGED2/ANOS1 値間の相関係数はそれぞれ 0.4698、0.2318、0.5095 であり、強い相関は認めなかった。コントロール群と最も早期である Stage I 胃癌の分離能は ANOS1 が最も高く、その AUC 値は 0.7131 であった。



◆ 胃癌臨床病期と血清値

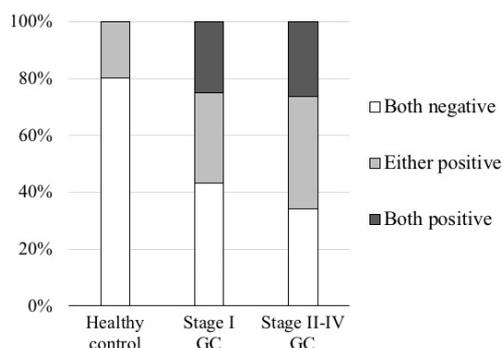


次に、臨床病期ごとの血清 ANOS1、MAGE-D2、DPYSL3 値について解析した。ANOS1 はコ

コントロール群と Stage I 胃癌の間で有意な発現量差を認めた。一方で、DPYSL3 は病期が進行するごとに有意な血清値の上昇を認めた。MAGED2 では明らかな傾向は認めなかった。Fig2-b
血清 CEA 値、CA19-9 値については、いずれも早期癌と進行癌の間で有意な差を認めなかった。

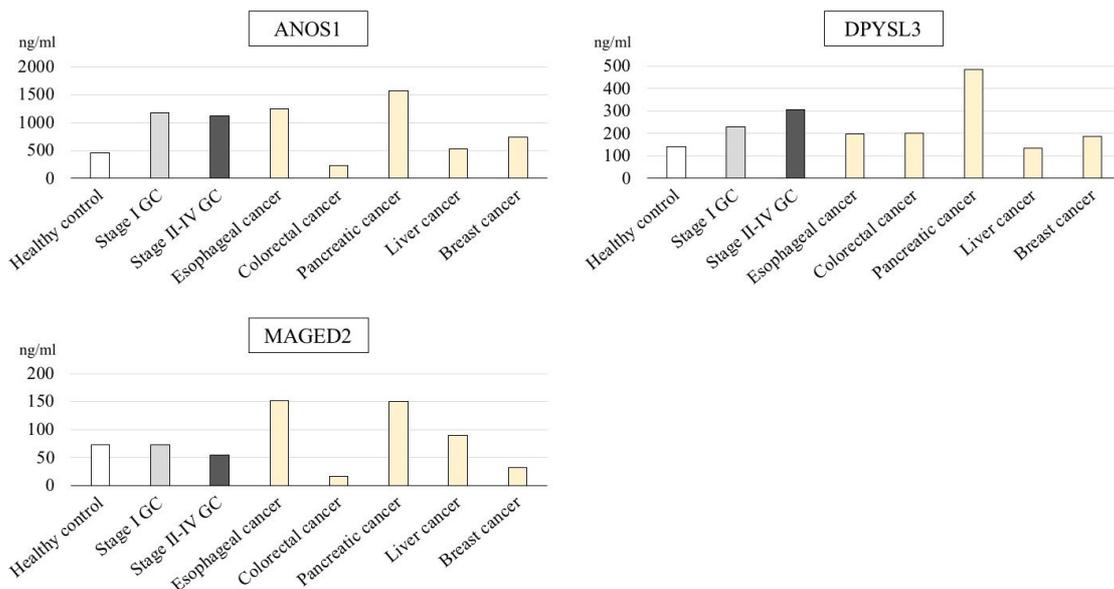
◆ マーカーの組み合わせによる診断能向上

血清 ANOS1 値と DPYSL3 値を組み合わせることで、診断能が向上するかについて検討した。それぞれのカットオフ値を ROC 曲線解析で決定した。(ANOS1, 2823 ng/ml, DPYSL3, 276 ng/ml)。コントロール群では共に陽性症例は認めなかった。いずれか陽性、ともに陽性症例の比率は、臨床病期が進行するに従って増加した。このことは、新規マーカーの組み合わせでより正確な診断が可能となることを示唆している。

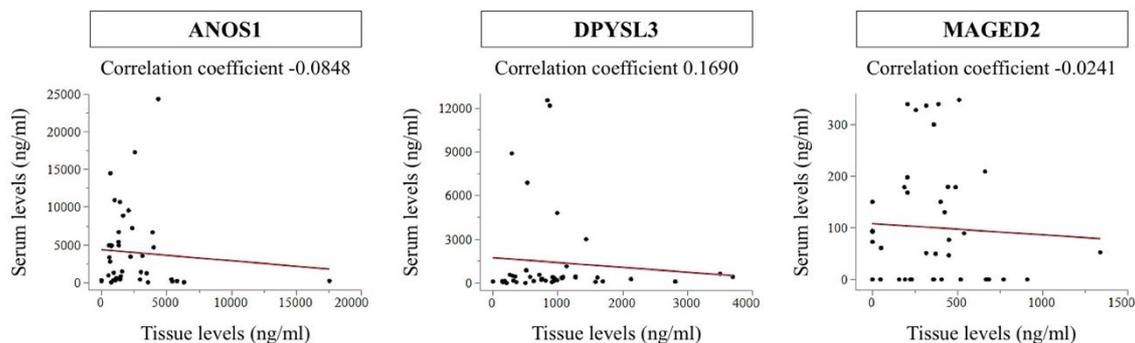


◆ 食道癌、大腸癌、膵癌、肝細胞癌、乳癌における血清 ANOS1、MAGE-D2、DPYSL3 値

これらマーカーが胃癌特異的なマーカーであるのか、あるいは癌種横断的に活用可能なのかを調べるため、各 30 例の食道癌、大腸癌、膵癌、肝細胞癌、乳癌患者の治療前血清 ANOS1、MAGE-D2、DPYSL3 値を同様に調査した。血清 ANOS1 値は食道癌と膵癌、DPYSL3 値は膵癌、MAGED2 値は食道癌と膵癌において上昇していることが示された。



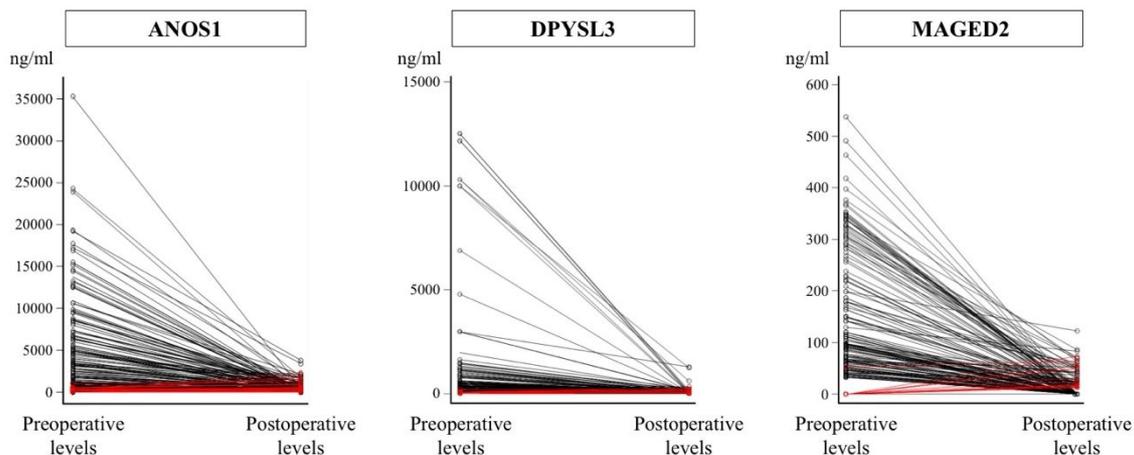
◆ 胃癌原発巣組織中の発現量と血清値



手術標本から採取された胃癌原発巣組織中の発現量を同様に ELISA 法で調べ、血清値との相関性を評価した。ANOS1、MAGE-D2、DPYSL3 の組織中の発現量と血清値の相関係数はそれぞれ -0.0848 、 0.1690 、 -0.0241 であり、相関性は示されなかった。

◆ 原発巣切除による血清値の変化

血清 ANOS1、MAGE-D2、DPYSL3 値の手術前後の変化を調べた。大部分の症例で、いずれの血清マーカー値も術後に低下しており、これらマーカーが原発巣に由来していることが示唆された。



前向き国際共同研究により、血清 ANOS1 値は胃癌早期診断に有用な新規血清腫瘍マーカー候補であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mitsuro Kanda, Yun-Suhk Suh, Do Joong Park, Chie Tanaka, Sang-Hoon Ahn, Seong-Ho Kong, Hyuk-Joon Lee, Daisuke Kobayashi, Michitaka Fujiwara, Hideaki Shimada, BeLong Cho, Kenta Murotani, Hyung-Ho Kim, Han-Kwang Yang, Yasuhiro Kodera	4. 巻 23
2. 論文標題 Serum levels of ANOS1 serve as a diagnostic biomarker of gastric cancer: a prospective multicenter observational study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 203-211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-019-00995-z	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	田中 千恵 (TANAKA Chie) (50589786)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	小林 大介 (KOBAYASHI Daisuke) (30635595)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	林 真路 (HAYASHI Masamichi) (70755503)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	小寺 泰弘 (KODERA Yasuhiro) (10345879)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	