

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16261

研究課題名(和文) 胃癌の早期発見のための、血中循環型miRNAに基づく診断signatureの開発

研究課題名(英文) Development of a circulating miRNA-based diagnostic signature for early detection of gastric cancer

研究代表者

山村 謙介 (Yamamura, Kensuke)

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：10816507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：現在、胃癌の診断は侵襲的でコストがかかり感度・特異度の面で未だ不十分であるため、非侵襲的かつ高い正確性を持った早期胃癌のバイオマーカーの開発が求められている。本研究では、複数の胃癌のパブリックデータベースと約700例に及ぶ臨床組織におけるmicro RNAの発現を解析し、統計学的解析を用いて6つのmiRNAから構成されるsignatureを確立した。さらにこのsignatureが胃癌の診断に高い正確性を有することを実証し、早期胃癌の新規診断マーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在胃癌の診断はコストが高く侵襲を伴っている。安価で非侵襲的なバイオマーカーの探索は以前からなされているが、確立されたものは少なくいわば古くて新しい課題である。本研究では、オンラインで入手可能な複数の胃癌組織の網羅的解析データファイル及びグローバルに集められた600例以上の臨床サンプルを用いて、より精度が高く侵襲の少ない胃癌診断のためのマイクロRNA signatureを開発した。本研究で得られた結果は、末梢血から早期胃癌を診断可能なバイオマーカーの開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Currently endoscopic surveillance is the gold standard for gastric cancer (GC) diagnosis, but remains as an ineffective screening strategy due to its invasiveness and associated costs. Herein, by integrating high-throughput data analysis, followed by comprehensive tissue and serum validations, we aimed to establish a circulating miRNA-based diagnostic signature for early detection of GC. We have developed a robust diagnostic marker for GC through integration of comprehensive high-throughput data analysis as well as clinical validation involving over 1200 GC samples across 6 independent cohorts. Collectively, our data demonstrates clinical significance of circulating-miRNA-signature for early detection of GC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 マイクロRNA signature

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は、世界で第3位のがん死による死亡者数を認めており、予後の悪いがんの1つといえる。一方で、早期胃癌と診断された患者はより良好な予後を有する。したがって、早期胃癌のスクリーニングは胃癌による死亡率を低減するための重要な戦略として認識されている。現在の胃癌診断のゴールドスタンダードは内視鏡検査に伴う組織生検の病理学的検査であるが、診断精度が高い反面、コストと侵襲の点で問題がある。また病変の探索には、内視鏡医による精度の違いもある (Fairweather M, J Surg Oncol. 2015)。そのため、液体ベースの非侵襲的バイオマーカーの開発が強く望まれており、いくつかの有望な分子バイオマーカーが血液、尿および胃液中で同定されている (Hsu WY, PLoS One. 2013, Watanabe Y, Gastroenterology. 2009)。それにもかかわらず、CEA、CA19-9のみが現在、手術後の腫瘍再発のモニタリングに臨床的に使用されているが、一般的に早期癌では上昇しないため、早期胃癌の診断マーカーとしては不十分であり、新たなバイオマーカーの開発が強く求められている。

マイクロRNA (miRNA) は、転写干渉または翻訳阻害によって標的遺伝子発現を調節し、腫瘍形成を含むほとんどの生物学的事象に関与している。血清、血漿などの体液サンプル中で比較的安定に存在するため、これまで腫瘍由来の末梢血中の miRNA を癌のバイオマーカーとする報告は散見されたが (Shigeyasu K, Clin Cancer Res. 2017)、単一の miRNA のみでの個々の診断能力の限界も指摘されている (Tsujiura M, Gastric Cancer. 2015)。複数の miRNA を組み合わせるパネルベースの手法が、様々な癌における血中循環 miRNA のバイオマーカーとしての精度を有意に改善することが示されているが (Bianchi F, EMBO Mol Med. 2011)、胃癌に関する報告では非網羅的解析による miRNA の選択、検証コホートのサンプル数の少なさからこれらのパネルは精度の面で不十分であり (Shiotani A, Br J Cancer. 2013)、現在まで応用に至っていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、パブリックデータベースと、グローバルに集められた1000例以上の胃癌の臨床サンプルを用いて、バイオインフォマティクス及び統計学的手法を駆使し、非侵襲的かつ高い正確性を持った早期胃癌の新規診断及び経過観察バイオマーカーを確立し、臨床応用に繋げることである。

3. 研究の方法

(1) Public database を用いたバイオインフォマティクス解析

Public database より入手可能な胃癌組織の網羅的解析データを用いて、バイオインフォマティクスにて、胃癌部と正常部を対象に両群間での miRNA の発現を比較し、胃癌組織で特異的に発現している miRNA を同定する。

(2) 臨床凍結サンプルによる miRNA の検証

1で得られた miRNA の発現を、100例以上の胃癌凍結組織を用いてリアルタイム PCR 法で検証し候補となる miRNA をさらに絞り込む。

(3) miRNA signature の樹立

多施設国際共同研究によって集めた胃癌患者の血清を用いて、トレーニングコホートでリアルタイム PCR 法により miRNA の発現を測定し、ロジスティック回帰解析に基づく Risk score model にて miRNA signature を樹立する。

(4) miRNA signature の検証

検証コホートにて、トレーニングコホートで樹立した miRNA signature を、ROC 解析を用いて正確性を検証する。さらに早期胃癌 (Stage) を対象として miRNA signature の検証を ROC 解析で行う。また、現在胃癌の腫瘍マーカーとして用いられている CEA、CA19-9 と診断効率を比較して有用性を検証する。

4. 研究成果

(1) **Public database を用いたバイオインフォマティクス解析による候補 micro RNA の選定**
 胃癌の臨床情報を有する Public database である TCGA (The cancer genome atlas) のデータファイルを解析し、統計学的手法を用いて、高い AUC 値が得られる胃癌特異的 micro RNA を 9 個同定した。これらの miRNA からなる signature は他の 2 つの独立したコホートでも胃癌の高い診断能を有することがわかった (AUC = 0.939 and 1.000、図 1)

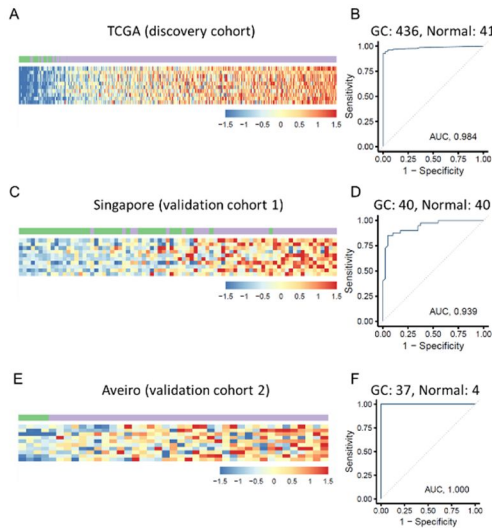


図 1 胃癌のpublic databaseの解析

(2) 臨床凍結サンプルによる miRNA の検証

1 で得られた 9 個の miRNA の発現を、実際の胃癌凍結組織を用いてリアルタイム PCR 法で評価し胃癌の診断能を評価したところ、miR-146b、miR181b、miR-181a、miR-18a、miR-93、miR-335 の 6 つの miRNA で高い AUC 値が得られた。

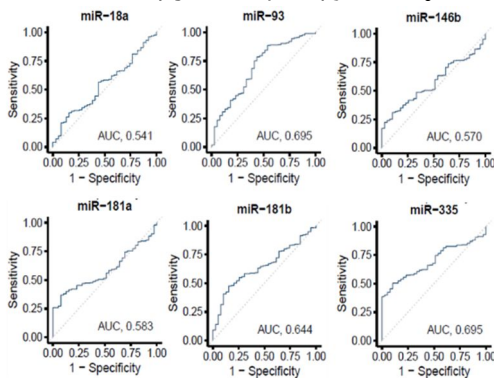


図 2 胃癌凍結組織におけるmiRNA発現のROC解析

(3) miRNA signature の樹立

次に、胃癌患者の血清サンプル(トレーニングコホート)における miRNA の発現を測定し、多変量ロジスティック回帰解析に基づく Risk score model を構築し 6 つの miRNA からなる signature を樹立した。この signature はトレーニングコホートで胃癌の高い診断能を有することがわかった (n=327, AUC=0.82, 95%CI 0.75 - 0.89、図 3)

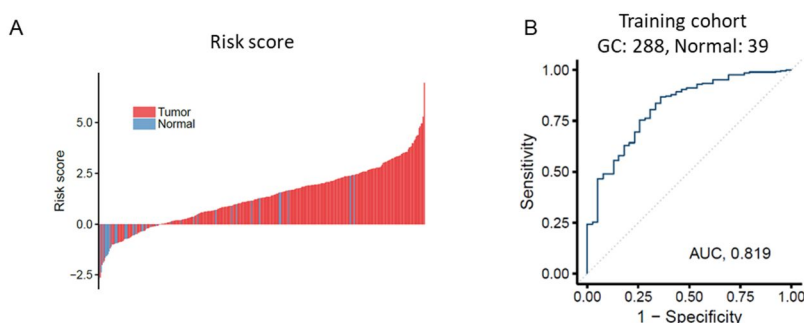


図 3 miRNA signatureのリスクスコアとROC解析

(4) miRNA signature の検証

トレーニングコホートで樹立した miRNA signature の胃癌診断能を、独立した別の検証コホートで評価したところ、検証コホートでも高い AUC 値が得られた (n=259, AUC= 0.87, 95% CI 0.82 - 0.92、図 4A)。さらに早期胃癌(Stage I)を対象とした miRNA signature の検証でも高い AUC 値を有していた(AUC=0.855, 95% CI 0.791-0.918、図 4B)。また、この miRNA signature は既存の腫瘍マーカーである CEA、CA19-9 と比較しても診断能に優れていた (miRNA signature ;AUC=0.87 CEA;AUC=0.58, P=0.0001, CA19-9; AUC=0.64, P=0.0001、図 4C)。これらの結果から、6 つの miRNA から構成される signature が胃癌の診断マーカーとなりうる可能性が示唆された。

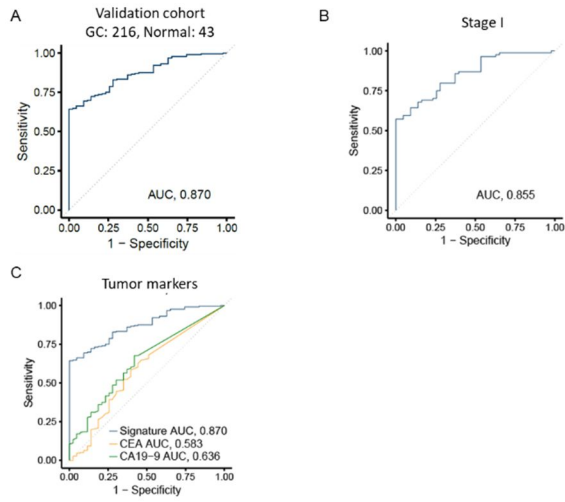


図 4 独立コホートにおけるmiRNA signatureのROCの解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kandimalla Raju, Tomihara Hideo, Banwait Jasjit K, Yamamura Kensuke, Singh Gagandeep, Baba Hideo, Goel Ajay	4. 巻
2. 論文標題 A 15-gene immune, stromal and proliferation gene signature that significantly associates with poor survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	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） 10.1158/1078-0432.CCR-19-4044	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 Yamamura Kensuke, Izumi Daisuke, Kandimalla Raju, Sonohara Fuminori, Baba Yoshifumi, Yoshida Naoya, Kodera Yasuhiro, Baba Hideo, Goel Ajay	4. 巻 25
2. 論文標題 Intratatumoral Fusobacterium Nucleatum Levels Predict Therapeutic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6170 ~ 6179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-19-0318	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 Kuroda Daisuke, Sawayama Hiroshi, Kurashige Junji, Iwatsuki Masaaki, Eto Tsugio, Tokunaga Ryuma, Kitano Yuki, Yamamura Kensuke, Ouchi Mayuko, Nakamura Kenichi, Baba Yoshifumi, Sakamoto Yasuo, Yamashita Yoichi, Yoshida Naoya, Chikamoto Akira, Baba Hideo	4. 巻 21
2. 論文標題 Controlling Nutritional Status (CONUT) score is a prognostic marker for gastric cancer patients after curative resection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 204 ~ 212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-017-0744-3	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kensuke Yamamura, Susan Tsai, Jasjit Kaur Banwait, Fuminori Sonohara, Yo-ichi Yamashita, Douglas B Evans, Yasuhiro Kodera, Hideo Baba, and Ajay Goel
2. 発表標題 Identification and establishment of a novel, circulating miRNA signature, for pre-operative diagnosis of occult distant metastasis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 AACR 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kensuke Yamamura, Lina Zhu, Raju Kandimalla, Daisuke Izumi, Takatoshi Matsuyama, Yusuke Kinugasa, Francesc Balaguer, Hideo Baba, Xin Wang and Ajay Goel
2. 発表標題 Genomewide expression profiling identifies a novel gene-expression signature for recurrence prediction in patients with early-onset colorectal cancer (EOCRC)
3. 学会等名 AACR 2019 (国際学会)
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