

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16838

研究課題名（和文）革新的バイオマーカー開発を目指した胃癌リンパ節転移診断遺伝子シグニチャーの樹立

研究課題名（英文）A genomewide transcriptomic approach identifies a novel gene expression signature for the detection of lymph node metastasis in patients with early stage gastric cancer

研究代表者

泉 大輔（IZUMI, Daisuke）

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：60594877

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：オンラインに公開されている胃癌の分子解析データを用いて生物統計学的解析を行いリンパ節転移陽性胃癌で特に発現しているメッセンジャーRNAの組み合わせ（シグニチャー）を同定した。これを2カ所の施設から収集した胃癌組織から抽出したメッセンジャーRNAを用いて検証し、リンパ節転移を既存の腫瘍マーカーやCT検査より検出できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の腫瘍マーカーはリンパ節転移を診断するには感度が低すぎ、CT検査もコストや読影技術に左右されることなどから診断方法として改善の余地がある。今回のシグニチャーによってリンパ節転移診断の一つの新たな方法が示唆され、既存のマーカーなどと合わせてより簡便で正確に診断できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Although identification of lymph node (LN) metastasis is a well-recognized strategy for improving outcomes in patients with gastric cancer (GC), there is lack of availability of adequate molecular biomarkers. A total of 532 patients with pathological T1 and T2 GC from 4 different cohorts were analyzed. Two independent datasets were used to establish a gene signature for the identification of LN metastasis in GC patients. We established a 15-gene signature by analyzing multiple high throughput datasets, which robustly distinguished LN status in both training (AUC=0.765) and validation cohorts (AUC=0.742). The 15-gene signature was significantly superior compared to the conventional tumor markers, CEA (P=0.04) and CA19-9 (P=0.005), as well as CT (P=0.04). We have established and validated a 15-gene signature for detecting LN metastasis in GC patients, which offers a robust diagnostic tool for potentially improving treatment outcomes in gastric cancer patients.

研究分野：消化器外科、トランスレーショナルリサーチ

キーワード：胃癌 シグニチャー リンパ節転移 予測 早期癌

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国では「2人に1人ががんにかかり、3人に1人ががんで死ぬ」と言われて久しい。実際、悪性新生物は我が国の死因第一位(年間死亡数 37 万人)であり、約半数(19 万人)を消化器癌が占めている。化学療法や分子標的薬の進歩により、癌種によっては以前と比べ予後は改善しているが、消化器癌の予後は依然として不良である。その中でも胃癌は、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比較的良好な予後を有し、特にリンパ節転移を有しない胃癌に対しては、腹腔鏡下胃切除や内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)などより低侵襲な根治的治療を行うことが可能になっており、術前の深達度診断、リンパ節転移存在診断に基づき治療方針を決定する。ESD を行った症例で病理組織診断にてリンパ節転移のリスク因子が認められた場合には追加切除が推奨されている。しかしながら、追加切除の結果リンパ節転移が認められる症例の割合は非常に低い。したがって、早期胃癌に対するより正確な治療前リンパ節転移存在診断は胃癌における適切な治療選択のための重要な情報として認識されている。治療前のリンパ節転移存在診断の手段としては、現在 Computed tomography (CT)や PET-CT が用いられているが、その感度は 60%程度と報告されており、依然として多くの偽陰性症例が存在する。そのためさらに感度・特異度の高い、治療前リンパ節転移診断を可能にするバイオマーカーの樹立が求められている。

mRNA は、転写または翻訳によって標的蛋白発現を調節し、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。これまで腫瘍由来の mRNA 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 mRNA のみでの個々の診断能力の限界も指摘されている(Liu H, Cancer Lett. 2012, Tsujiura M, Gastric Cancer. 2015)。

単一の mRNA のみでの診断能力と比較し複数の gene 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(Bianchi F, EMBO Mol Med. 2011)。一方、胃癌に関する報告では非網羅的解析による mRNA の選択、検証コホートのサンプル数の少な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。

より正確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胃癌組織の網羅的解析データ及びグローバルに集められた多数の多施設国際共同研究のサンプルを用いて、より精度が高い胃癌リンパ節転移診断マーカーを開発するものである。得られた結果は、生検組織から胃癌リンパ節転移を治療前に診断可能なバイオマーカーの開発につながるという実臨床に直結する、極めて大きな意義を持つ研究である。

### 2. 研究の目的

熊本大学消化器外科学及び Baylor Scott & White Research Institute の有する世界各国の共同研究施設から得られた胃癌の臨床サンプル及びデータベースを用いて、国際共同研究としてバイオインフォマティクスや統計学的解析を駆使し、高い正確性を持った胃癌リンパ節転移の治療前診断を確立し、その臨床応用に繋げることである。過去の報告では、gene signature の同定や小規模コホートでの単回の検証で完結している研究が主で、本研究のように構築した gene signature を大規模コホートで検証した報告はなく、本研究課題はきわめて独創的であると考えている。

### 3. 研究の方法

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、リンパ節転移陽性群とリンパ節転移陰性群を対象に両群間での mRNA の発現を比較しリンパ節転移陽性胃癌組織で特異的に発現している mRNA を同定する。当科ではすでに TCGA から online で入手した胃癌組織の RNAseq データを用い、volcano plot 及び heatmap にてリンパ節転移陽性胃癌組織とリンパ節転移陰性胃癌組織との間で有意に発現の差がある mRNA を同定した。

多施設国際共同研究によって集めた胃癌凍結組織を用いて、トレーニングコホートでリアルタイム PCR 法により mRNA 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 gene signature を樹立する。Risk score model を用いて ROC 解析を行いリンパ節転移診断能力を検討する。

検証コホートにて、トレーニングコホートで樹立した gene signature を同じ Risk score model を用いて ROC 解析を行い、正確性を検証する。さらに従来リンパ節転移診断法である CT の結果や、ESD 後のリンパ節転移リスク因子と ROC 曲線比較を用いてリンパ節転移検出能力を比較する。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 とロジスティック回帰分析に基づいた ROC 曲線比較にて診断効率を比較して有用性を検証する。

#### 4 . 研究成果

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、リンパ節転移陽性群とリンパ節転移陰性群を対象に両群間での mRNA の発現を比較しリンパ節転移陽性胃癌組織で特異的に発現している mRNA を同定した。TCGA から online で入手した胃癌組織の RNAseq データを用い、volcano plot 及び heatmap にてリンパ節転移陽性胃癌組織とリンパ節転移陰性胃癌組織との間で有意に発現の差がある mRNA を同定した。多施設国際共同研究によって集めた胃癌凍結組織を用いて、トレーニングコホートでリアルタイム PCR 法により mRNA 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 gene signature を樹立した。Risk score model を用いて ROC 解析を行いリンパ節転移診断能力を検討した。検証コホートにて、トレーニングコホートで樹立した gene signature を同じ Risk score model を用いて ROC 解析を行い、正確性を検証した。さらに従来 of リンパ節転移診断法である CT の結果や、ESD 後のリンパ節転移リスク因子と ROC 曲線比較を用いてリンパ節転移検出能力を比較した。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 とロジスティック回帰分析に基づいた ROC 曲線比較にて診断効率を比較して有用性を検証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 志村匡信、問山裕二、奥川喜永、安田裕美、藤川裕之、横江 毅、廣 純一郎、大井正貴、泉 大輔、馬場秀夫、楠 正人、Goel Ajay
2. 発表標題 胃癌腹膜播種同定に関連するmicroRNA signatureの臨床的意義
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三好人正、東田周祐、泉 大輔、神田光郎、佐藤康史、六車直樹、馬場秀夫、小寺泰弘、Goel Ajay、高山哲治
2. 発表標題 血清miRNAシグネチャーを用いた食道扁平上皮癌の早期診断モデルの構築：後ろ向き・前向き・多国籍試験
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泉大輔、堀野敬、白神慈、木下翔太郎、山根大侍、池嶋聡、島田信也、Ajay Goel、馬場秀夫
2. 発表標題 治療前胃癌リンパ節転移診断15ジーンシグニチャーの樹立と検証
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------