

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501299

研究課題名(和文) 消化器癌患者の血漿中遊離核酸を用いたテーラーメイド個別化バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of tailor-made personalized biomarker using circulating nucleic acids in patients with digestive system cancer

研究代表者

岡本 和真 (Kazuma, Okamoto)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20285258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌患者の術前・術後ペア血漿中のmicroRNA(miR)を用いたmicroarray解析を行った。術後に顕著に低下する血漿中miRとしてmiR-451、miR-486を同定し、それらが健常者に比較して術前の胃癌患者において有意に高値であることを確認した。一方、再発時も含めた同様の解析によって、miR-92a、93、185を候補miRとして同定したが、血漿中miR-185値のみがリンパ節転移再発症例において高い傾向を認めた。再発時血漿を用いたこれら解析から、同miRsが癌組織以外に由来する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to isolate gastric cancer(GC)-associated microRNAs (miR) in plasma on a miR microarray comparing pre- and post-operative paired plasma. Two candidate microRNAs, miR-451 and miR-486, were found to decrease in post-operative plasma, and the levels of both miRs were found to be significantly higher in GC patients than healthy controls. We also compared plasma miR profiles in pre-operative, post-operative, and at the time of recurrence of same GC patients, and isolated three candidate miRs (miR-92a, 93, and 185). All of patients with lymph node recurrences showed miR-185 high expression in their plasma. Further analysis should clarify the origin of extracellular circulating miRs.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：バイオマーカー 消化器癌 腫瘍マーカー 個別化医療 microRNA 術後管理

## 1. 研究開始当初の背景

以前から末梢血液中に遊離核酸断片が存在することが知られており、そのバイオマーカーとしての有用性が報告されている。また近年、それら遊離核酸のうち microRNA(miR)が能動的な分泌によって、細胞から体液中(血液など)に放出され、それらが細胞間メディエーターとして機能しているとの知見も報告されており、一躍注目を浴びてきた。一方で、消化器癌においては、分子標的薬剤を含む新規化学療法剤の出現により、多様な集学的治療戦略が可能となり、腫瘍動態を鋭敏に判定するバイオマーカーの開発が求められている。これら体液中の遊離核酸は、種々の分子生物学的検索から判明した新知見を実地臨床に応用するトランスレーショナルリサーチにおいて鍵となる分子である。

## 2. 研究の目的

消化器癌患者に普遍的なバイオマーカーの探索を目指す一方で、当該患者個人に適した個別化バイオマーカーの検索も行い、その有用性について検討する。

具体的には、肉眼的根治切除可能であった消化器癌患者の術前と術後のペア血漿より抽出した遊離 miR を用いた miR microarray 解析によって、個体差を相殺した担癌患者特有の血漿中 miR バイオマーカーの検索を行う。また、術後再発時の血漿中 miR を用いた解析も行い、それら結果と臨床情報との対比から、鋭敏かつ正確に腫瘍動態を反映する個別化バイオマーカーの開発を試みる。

## 3. 研究の方法

本研究は京都府立医科大学の倫理委員会の審査を受け、承認を得た後に行われた。当施設附属病院において検査・治療を施行された消化器癌患者を対象として、採取血液から遠心分離によって細胞成分の混入を防ぎ、Cell-free miR の抽出を行った。また、組織

からの核酸抽出は、パラフィン切片上で癌部・非癌部を確認の後、行った。

(1)術前・術後の血漿サンプルが揃った胃癌患者のうち術後長期に亘り再発を認めない(手術によって完全に切除された可能性が高い)進行胃癌2名、早期胃癌1名を対象とした。同3名分の術前ならびに術後血漿サンプルを混合した後、miR の抽出を行い、microarray 解析を行った。

(2)術前・術後で顕著な差を認める miR を候補として、各サンプルで validation を行った後、最終の候補 miR を選定した。

(3)候補 miR について、術前・術後のペア血漿、更には胃癌担癌患者ならびに健常者の血漿中 miR を用いた RT-PCR 解析を行い、臨床病理学的因子との対比ならびに組織標本の解析などから、その臨床的意義について検討した。

(4)同一再発胃癌患者の術前・術後ペア血漿サンプルに加えて、再発時の末梢血漿も用いた血漿中 miR microarray 解析を行い(胃癌3症例)臨床病理学的因子との対比から、鋭敏かつ正確に腫瘍動態を反映するバイオマーカーの検索を行った。

## 4. 研究成果

### (1)術前・術後ペア血漿解析の検討

microarray 解析結果から、術後に顕著に低下する9個の候補 miR を選定した。通常の RT-PCR による validation assay を行い、miR-451、miR-486 を血漿バイオマーカー候補としてさらなる解析を行なった。29例の胃癌術前・術後ペアサンプルを用いた両 miR の血漿濃度解析において、それぞれ 90%(26/29)、93%(27/29)の症例で術後に有意な低下を認めた(miR-451: 13.41vs 1.80、miR-486: 0.42vs 0.08、共に  $p < 0.01$ )。

健常コントロール30例と胃癌患者56例での検討では、両 miR の血漿濃度は胃癌患者において有意に高く(miR-451: 0.30vs 10.70、

miR-486: 0.03vs 0.34、 $p < 0.01$ )、ROC curve における AUC は 0.96、0.92 と高値を示した。カットオフ値は、それぞれ 0.97amol/μl(感度 96%、特異度 100%)、0.073amol/μl(感度 86%、特異度 97%)であった。

一方、術後フォローアップ中の採血を用いた同 miR-451、486 の解析では、再発時に上昇しない症例も多く存在することも判明し、癌組織以外の組織由来の可能性も示唆された。同 miR についての組織中の解析では、非癌部に比較して胃癌組織中の発現は低値であった。

#### (2)再発モニタリング・バイオマーカーの検討

microarray 解析結果から、術前高値、術後顕著に低下、再発時に再上昇する 10 個の miR をモニタリング・バイオマーカーの検索候補として選定した。

通常の RT-PCR による validation assay を行い、3 症全例において腫瘍動態と miR 値の推移(術前高値、術後低下、再発時に再上昇)が一致する miR-92a、93、185 を最終候補として更なる解析を行なった。

再発症例 15 例の解析では、血漿中 miR-92a、93 値と再発の有無ならびに各再発形式との間に相関を認めなかった。血漿中 miR-185 値に関して、腹膜播種ならびに血行性再発との間に相関は認めなかったが、有意差はないもののリンパ節転移再発症例において高値を示す傾向を認めた。また、miR-185 と組織における発現解析では、癌部・非癌部間で有意な差は認めず、同一症例におけるリンパ節転移の有無別のリンパ節組織中の発現解析でも有意な差を認めず ( $p=0.235$ )、由来組織の同定には至らなかった。

#### 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 5 件)

小松周平、市川大輔、岡本和真、(他 3 名): 胃癌の検査・診断 バイオマーカー miRNA. 日本臨床, 72;333-337(2014) 査読無

Tsujiura M, Ichikawa D, (他 4 名): Liquid biopsy of gastric cancer patients: circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. World J Gastroenterol, 20;3265-3286(2014) 査読有 doi:10.3748/wjg.v20.i12.3265.

Arita T, Ichikawa D, Okamoto K, (他 10 名): Circulating long non-coding RNAs in plasma of patients with gastric cancer. Anticancer Res, 33;3185-3193(2013) 査読有

Ichikawa D, Komatsu S, (他 2 名): Circulating microRNA in digestive tract cancers. Gastroenterology, 142; 1074-1078(2012) 査読有 doi: 10.1053/j.gastro.2012.03.008.

Konishi H, Ichikawa D, Okamoto K, (他 11 名): Detection of gastric cancer-associated microRNAs on microRNA microarray comparing pre- and post-operative plasma. Br J Cancer, 106; 740-747(2012) 査読有 doi: 10.1038/bjc.2011.588.

[学会発表](計 7 件)

小松周平、市川大輔、岡本和真、他: 胃癌患者血中遊離 microRNA を指標とした次世代個別化バイオマーカーの探索と展望. 第 51 回日本癌治療学会総会 2013 年 10 月 京都

小西博貴、市川大輔、岡本和真、他: 胃癌診療における血漿中 microRNA-451,486 の意義の検討. 第 11 回日本消化器外科学会大会 2013 年 10 月 東京

有田智洋、市川大輔、岡本和真、他: 胃癌における血漿中 long non-coding RNA の

バイオマーカーとしての有用性．第 72 回日本癌学会総会 2013 年 10 月 横浜

市川大輔、岡本和真、他：胃癌腹膜播種転移関連 microRNA 同定の試み．第 72 回日本癌学会総会 2013 年 10 月 横浜

有田智洋、市川大輔、岡本和真、他：Plasma miRNA microarray analysis in recurrent gastric cancer patients．第 71 回日本癌学会総会 2012 年 10 月 札幌

市川大輔、岡本和真、他：胃癌における基礎研究知見の臨床応用 循環遊離 microRNA のバイオマーカーとしての有用性と問題点 第 44 回胃病態機能研究会 2012 年 8 月 熊本

市川大輔、岡本和真、他：基礎研究知見の臨床応用への翻訳 循環遊離 microRNA のバイオマーカーとして有用性 ．第 67 回日本消化器外科学会総会 2012 年 7 月 富山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特に無し．

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

岡本 和真 (OKAMOTO KAZUMA)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：2 0 2 8 5 2 5 8

### (2)研究分担者

市川 大輔 (ICHIKAWA DAISUKE)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：2 0 3 4 7 4 4 6