

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460936

研究課題名(和文) 消化器癌腹膜播種の遺伝子解析研究

研究課題名(英文) Genetic analysis of peritoneal dissemination of gastrointestinal cancer

研究代表者

前田 修 (Maeda, Osamu)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：20378053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はがん化学療法の耐性化に伴う遺伝子変化を解析することである。腹膜播種を伴う胃癌の患者において、化学療法を施行する経過中に、繰り返し腹水を採取することにより、化学療法に感受性のあるがん細胞と耐性化した後のがん細胞を得た。腹水中の細胞を短期間培養することにより、血液や中皮細胞などの正常細胞を除去し、がん細胞を選択的に培養した。培養したがん細胞について、遺伝子発現及びDNAメチル化についてマイクロアレイによる網羅的解析を行った。さらに胃癌培養細胞株AGS細胞の薬物耐性株を樹立して、網羅的遺伝子解析を行った。これら解析により、薬剤耐性化に関与する可能性がある遺伝子変化を抽出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to analyze gene alteration accompanied with acquisition of drug-resistance against chemotherapy. During chemotherapy, cancer cells that are sensitive and resistance to chemotherapy were obtained by repeated paracentesis from gastric cancer patients with peritoneal dissemination. Cancer cells were selectively cultured for short duration eliminating normal cells including blood cells and mesothelial cells. Microarray analysis of gene expression and DNA methylation were performed using the cultured cancer cells. Furthermore, we established drug-resistant cells of gastric cancer cell line AGS, and performed genome-wide analysis. We extracted gene alteration with possible relationship with drug resistance.

研究分野：がん薬物療法

キーワード：胃癌 化学療法 腹膜播種

1. 研究開始当初の背景

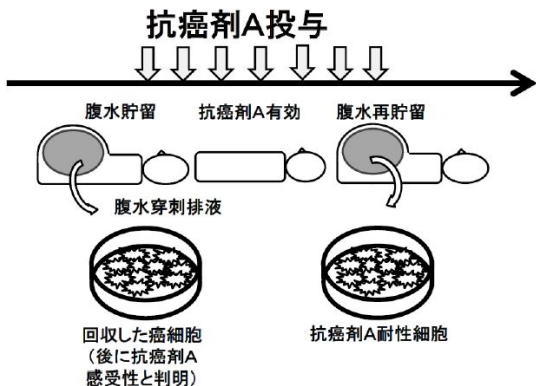
癌性腹膜炎は進行悪性腫瘍でしばしば発症する病態で、腹部膨満、腹水貯留、腸閉塞など様々な症状を起こし患者の「生命の質」(Quality of Life, QOL)に重大な影響を及ぼす。癌性腹膜炎による腹水は利尿剤など通常の腹水に対する治療に抵抗性のことが多く、抗癌剤治療が有効であれば改善するが、薬剤耐性となれば再貯留がみられる。腹水穿刺は腹水の原因を診断する目的で、あるいは腹部膨満などの症状の緩和目的のために行われる。また腹水中のタンパクを濾過濃縮して体に戻す濾過濃縮再静注療法 (Cell-free and Concentrated Ascites Reinfusion Therapy, CART) も行われる。診断や治療目的で採取された腹水中の癌細胞を回収して薬剤感受性や生物学的な特性を解析することによって、臨床経過や予後との相関、化学療法剤の有効性を解析する。腹水穿刺自体は極めて低侵襲で、対症療法であるために繰り返し施行されることが多いため、治療経過とともに腹水中の癌細胞の変化を解析することが可能である。

2. 研究の目的

本研究では診断や治療目的で採取された腹水中の癌細胞を回収して薬剤感受性や生物学的な特性を解析する。腹水穿刺は繰り返し施行されることが多いため、治療経過とともに腹水中の癌細胞の変化を解析することが可能である。腫瘍の薬剤感受性、遺伝子変異、DNAメチル化、遺伝子発現を解析し、治療経過との関連を検討する。耐性化機序の解明につながる遺伝子変化や、薬剤感受性のバイオマーカーを検索する。

3. 研究の方法

腹膜播種を伴うがん患者で、化学療法を受ける前と、治療経過中に繰り返し腹水を採取する。腹水中の正常細胞(血液細胞、中皮細胞など)を除くために、培地にて培養し継代を行う。



一方で、すでに培養細胞株として確立している細胞を化学療法薬存在下で培養し、薬物耐性細胞株を樹立する。それぞれの細胞についてRNAおよびDNA

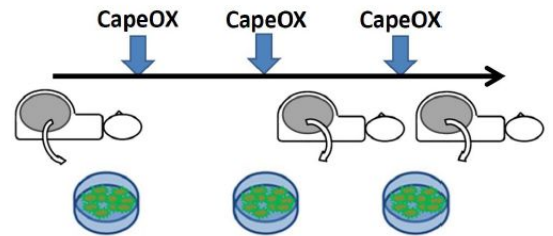
を抽出し、cDNAマイクロアレイにて遺伝子発現を、メチル化アレイにてDNAメチル化を解析する。主要な遺伝子変化についてはreal-time PCR法を用いて定量的な評価を行う。これらの解析により抽出された遺伝子変化について、データベースを用いてgene ontology解析およびパスウェイ解析を行う。

4. 研究成果

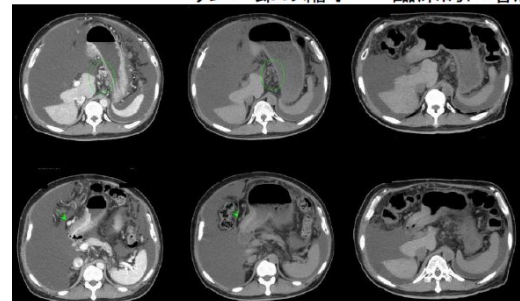
(1) 結果

腹水由来癌細胞の培養

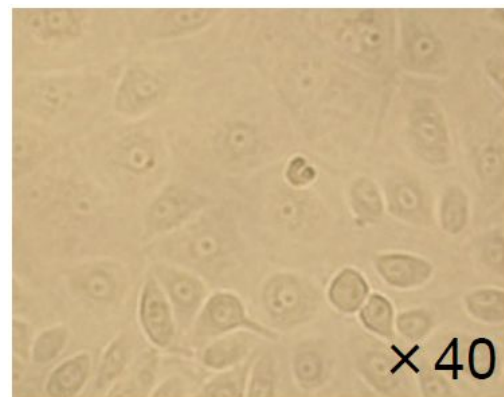
胃がん腹膜播種の患者に化学療法を行った。経口フッ化ピリミジンであるカペシタビンと白金製剤オキサリプラチンを併用するCapeOX療法を施行した。治療開始当初はリンパ節転移が縮小し、化学療法は有効と考えられた。その後、臨床的に増悪するまでの間に繰り返し腹水を採取した。



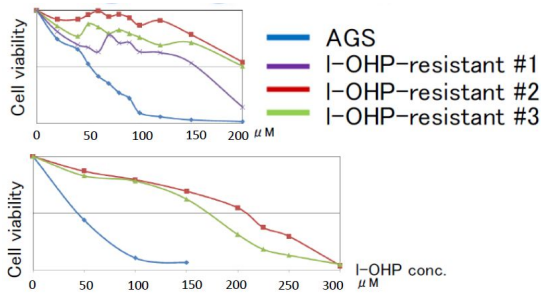
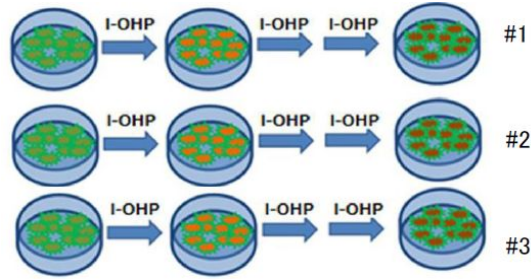
リンパ節の縮小 臨床的に増悪



腹水を遠心して沈殿をRPMI-1640で懸濁し、37℃ 5%CO₂の条件下で培養した。10日間培養後に継代し、さらに2週間培養した時点で回収した。化学療法投与前、感受性が維持されている期間、耐性となった後のそれぞれの細胞を得ることができた。

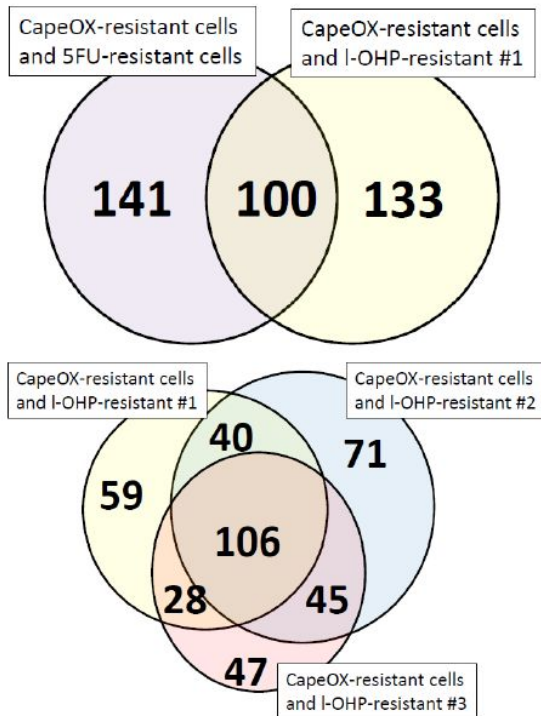


薬剤耐性 AGS 細胞株の樹立
 胃癌細胞株 AGS をさまざまな濃度のオキサリプラチン存在下で培養した。数か月間培養後に回収して、耐性化を確認した。



マイクロアレイを用いたゲノムワイド解析

cDNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現を、メチル化アレイを用いて DNA メチル化を解析した。腹水細胞と薬剤耐性 AGS 細胞で同様の発現変化を示した遺伝子数は以下の図のようになる。



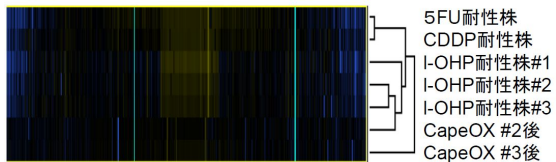
CapeOX 耐性細胞と、オキサリプラチン耐性 AGS で共通の変化を示した 103 遺伝子に

ついて Gene Ontology 解析を行うと次の通りであった。

GO Term	p-Value	Matches
regulation of inflammatory response [GO:0050727]	0.004844	8
positive regulation of response to wounding [GO:1903036]	0.045775	6

CapeOX 療法後、702 遺伝子の発現が上昇、530 遺伝子の発現が低下した。発現が低下した遺伝子と関連するパスウェイを解析すると、60 遺伝子が " Signaling by G protein-coupled receptor (GPCR) "、31 遺伝子が " GPCR ligand binding " と関連がみられた。また NPHS1、FXDY1、WISP1、FMO1 は CapeOX 後に発現が低下かつメチル化が増加した。

Pathways	p-value	No. of genes
Signaling by GPCR	5.17043E-05	60
GPCR ligand binding	5.17043E-05	31
Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)	0.001058057	23
GPCR downstream signaling	0.004873582	44
Peptide ligand-binding receptors	0.01216544	15
Neuroactive ligand-receptor interaction	0.01216544	19
NGF-independent TRKA activation	0.041066795	3
Neuronal System	0.048295234	20



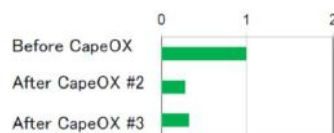
CapeOX 後の腹水がん細胞、フルオロウラシル耐性 AGS 細胞、オキサリプラチン耐性 AGS 細胞のいずれにおいても発現が低下した遺伝子のうち、PCDH20 および DEFB4A は腫瘍抑制遺伝子である可能性が報告されている。AGS 細胞を脱メチル化剤で処理すると PCDH20 の発現は増加した。

PCDH20

Microarray

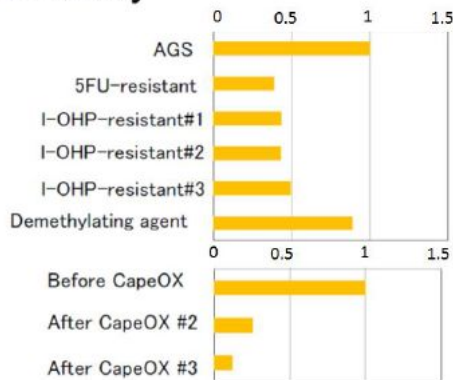


qPCR



DEFB4A

Microarray



qPCR



(2) 考察

薬剤耐性培養細胞

AGS 細胞を長期間抗癌薬存在下に培養し薬剤耐性細胞株を作成した。この細胞の生物学的変化は、薬剤耐性化機序と関連している可能性がある。しかしながら培養細胞は、培養や継代による生物学的な変化が蓄積していると考えられる。また、抗癌薬存在下の培養は、体内の抗癌薬濃度とは異なる非生理的な環境下であるため、必ずしも生体での耐性化機序を反映していない可能性がある。

腹水由来 early-passage cell line

比較的容易な手技で中皮細胞や白血球が除かれるため、腫瘍細胞を抽出して生物学的特徴を効率的に解析可能となる。実際に生体内で抗癌薬耐性化に伴って起こった生物学的変化を反映していることが期待される。また一般的な細胞株と比較し、培養による遺伝子変化が最小限であると考えられる。

一方で、症例によっては viability が不十分な場合がある。また細胞増殖速度が遅い場合には、薬剤感受性の検討が困難である。これらの点は培養条件の検討によって改善される可能性がある。

腹水由来細胞と薬剤耐性細胞株での共通の発現変化を示す遺伝子

PCDH20 はカドヘリンスーパーファミリーに属し、鼻咽頭がんにおいて腫瘍抑制遺伝子としてはたらくことが報告されている。発現が低下しプロモーターのメチル化が観察される (Chen T et al. J Cell Biochem. 2015 Aug;116(8):1766-75.)。また非小細胞肺がんの腫瘍抑制遺伝子の候補とされ、発現が低下し、プロモーターのメチル化が観察される

(Imoto I et al. Cancer Res. 2006 May 1;66(9):4617-26.)

一方、DEFB4A は抗微生物ペプチドで、腫瘍抑制遺伝子の可能性が報告されている。口腔がんが発現が低下し DNA 高メチル化がみられる。また細胞増殖と浸潤を阻害する (Kamino Y et al. Oncol Rep. 32(2):462-468, 2014)

殺細胞性抗癌薬に対する薬剤耐性化機序は十分に解明されていないが、このような腫瘍抑制遺伝子の発現変化が薬剤耐性化に関与している可能性が推測される。

遺伝子発現変化と DNA メチル化異常

薬剤耐性に伴う遺伝子変化は、発現低下とメチル化の増加を認めた遺伝子もみられ、薬剤耐性化には epigenetic な機序が関与している可能性がある。

バイオマーカーとしての応用の可能性

治療前からの感受性の差異のある症例を蓄積して、治療中の遺伝子変化を解析することにより、治療効果予測に利用できることが期待される。

(3) 結論

胃がん腹水を短期間培養して抽出したがん細胞を用いた遺伝子解析は、バイオマーカー検索と薬剤耐性化機序の研究に有用である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

前田修、安藤雄一．胃がん腹水中細胞を用いた CapeOX 療法による遺伝子変化の解析．第 50 回制癌剤適応研究会．2017 年 3 月 17 日 .ホテルクレメント徳島(徳島県徳島市)

前田修、後藤秀実、安藤雄一 他．Microarray analysis of gene expression in gastric cancer cells from ascitic fluids before and after capecitabine and oxaliplatin (CapeOX). 2016 Gastrointestinal Cancers Symposium. 2016 年 1 月 21 日 .サンフランシスコ(米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 修 (MAEDA, Osamu)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師
研究者番号：20378053

(2) 研究分担者

後藤 秀実 (GOTO, Hidemi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 10215501

安藤 雄一 (ANDO, Yuichi)
名古屋大学・医学部附属病院・教授
研究者番号 10360083