

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461981

研究課題名(和文)食道胃接合部癌における新規バイオマーカー(Runx3, EZH2)の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of new biomarkers (Runx3, EZH2) in Gastroesophageal junction cancer

研究代表者

國崎 真己 (KUNIZAKI, Masaki)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：10533747

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)：マイクロアレーやRT-PCRの結果同様、胃癌切除検体においてRUNX3は高率に不活化されていた。一方EZH2は79.4%(77/97)の症例で高発現していたが其の発現と予後との相関は認められなかったことからEZH2を介した新たな分子メカニズム(H3K27のメチル化やノンヒストン蛋白のメチル化)が悪性度や分化に関与すると考えられた。これまでに多くの癌腫においてEZH2の発現上昇と予後との相関を確認してきたことから新たなバイオマーカーとして血清中のELISA測定キットの開発を進めてきた。その一環として血清中の抗p53抗体価が大腸癌、胃癌、食道癌において感度、特異度共に有用であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Identifying useful biomarkers were essential to select optimal therapeutic strategies for cancer. Quantitative real-time PCR analysis revealed higher expression of EZH2 in clinical gastric cancer tissues than in corresponding non-neoplastic tissues, and we confirmed that a wide range of cancers also overexpress EZH2, using cDNA microarray analysis. Immunohistochemical analysis showed positive staining (>50%) for EZH2 in 77 of 97 cases of gastric cancer. We could not find elevated expression of EZH2 to be associated with poor prognosis for patients with gastric cancer (P=0.670). Our study has demonstrated that combination of s-p53Ab and other tumor markers can serve as a useful biomarker set of gastrointestinal cancer and should be incorporated into traditional clinical and pathologic variables to complement outcome prediction of gastrointestinal cancer patients after treatment.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：食道胃接合部癌 EZH2

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでにヒトのがんの理解を深めることにより、新たな診断・治療・予防法を開発する目的で網羅的遺伝子発現プロファイリングの解析を行ってきた。臨床検体から LCM を用いて腫瘍組織と正常組織を選択的に取得し蛍光標識した cDNA を作成しマイクロアレイによる発現解析を行った。この中から食道胃接合部癌組織において発現の高い候補遺伝子を抽出しプロファイリングを行った。一方近年、機能性低分子 RNA の一つである microRNA(miRNA)の発現異常が様々な固形癌や血管系腫瘍で見つかっており、ここ数年で癌における miRNA 研究は飛躍的に進み、これまでの遺伝子研究やタンパク質研究では説明できなかった癌化のメカニズムが明らかになってきた。そこで我々は、食道胃接合部癌に関わる miRNA 発現プロファイルを選択し、miRNA 発現プロファイルで発現上昇または低下の認められる miRNA の標的遺伝子を抽出した。このようにして得られた遺伝子発現プロファイリング及び miRNA 発現プロファイリングにおける標的遺伝子の中から EZH2, RUNX3 が候補遺伝子として選択された。

2. 研究の目的

上部消化管(食道・胃)領域においてはトラズズマブが HER2 陽性切除不能進行再発胃癌において殺細胞薬との併用による生存の改善効果が示された。しかしながら、その対象は胃癌患者全体の 7~17%に過ぎず、modality としての新たな分子標的治療薬の開発は急務である。またバイオマーカーとして有望な物が現時点で存在しないというのが現状である。一方近年、食道胃接合部に発生する癌に注目が集まり、その生物学的特性が胃癌とも食道癌ともやや異なることから、その臨床病理学的な特徴が検討されている

が未だ明らかとなっていない。これまで我々は消化管癌における抗 p53 抗体の有用性を検討していく中で食道胃接合部癌においてその陽性率が高い事に着目し研究を行ってきた。今回新たな候補遺伝子として、遺伝子発現プロファイリングと miRNA 発現プロファイリングを組み合わせることによって EZH2 (miR-101)及び RUNX3(miR-130b)を選択した。Runt ファミリー転写因子の一つ RUNX3 は 80%以上のヒト胃癌においてその不活化が観察されるがん抑制遺伝子産物であるが、がん化シグナル伝達系である WNT シグナルの「ブレーキ」として機能していることが報告されている。

(*Gastroenterology* 2011;140:1536-46)。また近年 EZH2 が RUNX3 の silencing に関わることも報告されてきた(*Carcinogenesis* 2010;31(9):1567-75)。このように癌化に関して相互作用を及ぼす分子同士が候補遺伝子として選択されたのは大変興味深い。我々はこれまでにヒストン蛋白の methyltransferase である EZH2 が様々な癌の予後に関わることを報告してきた(*Cancer Sci* 2011;102(7):1298-305)。またヒストン蛋白の methyltransferase である SMYD3 が血管新生因子である VEGFR1 をメチル化することも報告してきた(*Cancer Res* 2007;67(22):10759-65)。これらのことから我々はエピジェネティックな分子メカニズムとして DNA のメチル化ではなく、蛋白のメチル化が癌化に関与する可能性を見出そうと考えている。今回新たなメチル化蛋白を見出すことにより新たな癌化のメカニズム解明に繋がると考えられ、また EZH2 は血清中の検出が可能であることから有用なバイオマーカーにつなげることが出来ると考えられ今回本研究を行った。

3. 研究の方法

インフォームド・コンセント取得およびサン

プルからの DNA、蛋白抽出。同意を得られた研究対象者から、検体及び血液サンプルを採取し、DNA、蛋白の抽出等を行う。臨床検体における発現解析及び臨床病理学的検討(1)EZH2 の新たなメチル化候補の選別と機能解析(RUNX3 の不活化に関わる EZH2 のメチル化に伴う分子メカニズムの解明)(2)in vitro 細胞実験による EZH2,RUNX3 の癌発生への機序解明(3)新たなバイオマーカーとして炎症性マーカーとの臨床病理学的比較検討(4)ELISA による測定法の開発と評価

4. 研究成果

今回マイクロアレイによる発現解析及び RT-PCR の結果から胃癌組織における EZH2 発現と予後因子としての評価を進めてきた。当初行ったパイロットスタディの結果、胃癌切除検体において EZH2 は高率 (>50%) に発現上昇が認められた(43/59)。これまでの報告とは異なり EZH2 の発現と予後との間に有意差は示されなかったため ($P=0.412$, HR:1.889, 95%CI=0.414-8.624) 検証目的で新たな検体を用いて検証を行った。また同時期に解析を進めてきたバイオマーカー(炎症性マーカー; GPS, mGPS, PI, PNI, CAR, NLR)と EZH2 の予後に関する比較検討も行い報告してきた。癌細胞中の EZH2 蛋白の発現レベルと予後に関して 2008 年 6 月~2015 年 12 月までに根治切除を施行した胃癌臨床検体の中から新たに 97 症例を抽出し、EZH2 の発現解析(図 1)を施行した。その結果 50%以上の陽性細胞を認めたものは 79.4%(77/97 例)と高率であったが、染色強度、陽性細胞率いずれにおいても予後との相関は認められなかった($P=0.670$)。がん細胞中の蛋白発現レベルでは予後との相関は認められなかったものの、EZH2 を介した新たな分子メカニズムが悪性度や分化に関与すると考えられ、そのターゲット(ヒストン H3K27m 等やノンヒストン蛋白)となる分子メ

カニズムの解析を進めてきた。

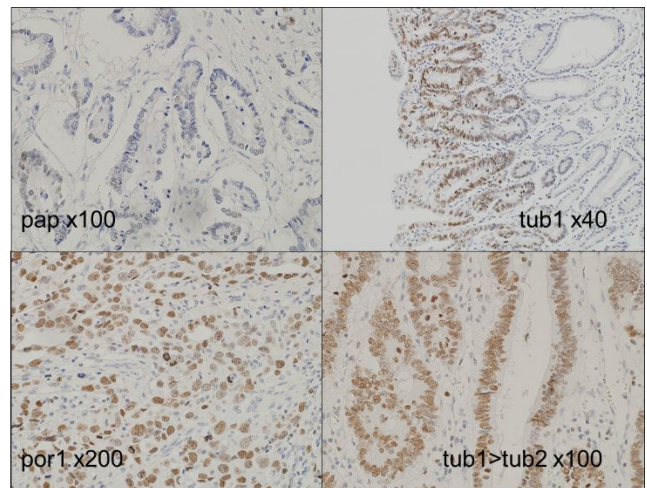


図 1. 胃癌切除検体における EZH2 の発現

Variables	Univariate	Multivariate ^a		Multivariate ^b			
	p-Value	HR	95%CI	p-Value	HR	95%CI	p-Value
Gender (male/female)	0.485						
Age <65/≥65 years	0.797						
Tumor site (DLM/UE)	0.694						
Body mass index: <25/≥25	0.781						
Histological type: diff/undiff	0.004	2.908	0.910-9.293	0.072	3.360	1.075-10.506	0.037
Tumor size: <50/≥50 mm	0.023	1.185	0.467-3.005	0.721	1.285	0.505-3.271	0.599
Tumor depth pT1/pT2-4	0.005	1.123	0.192-6.580	0.898	1.476	0.272-8.005	0.652
TNM stage 0-II/III-IV	<0.001	2.324	0.597-9.046	0.224			
Lymphatic invasion: 0/1-3	0.032	0.729	0.076-6.983	0.784	0.555	0.057-5.370	0.611
Venous invasion: 0/1-3	0.004	3.827	0.392-37.364	0.248	4.899	0.473-50.774	0.183
Nodal stage: 0/1-3	<0.001	1.611	0.411-6.309	0.494	2.192	0.653-7.357	0.204
CEA: <5/≥5 ng/ml	0.967						
CA19-9: <37/≥37 U/ml	<0.001	2.508	0.831-7.569	0.103	3.316	1.176-9.344	0.023
S-p53Ab: <1.3/≥1.3 U/ml	0.440						
EZH2 expression: Low (≤50%)/ High (>50%)	0.670						

表 1. 胃癌切除症例における単変量及び多変量解析結果

我々はこれまで EZH2 が肺癌や前立腺癌、大腸癌で発現亢進が認められ、癌の進展及び予後に関わることを報告してきたことから、実臨床の現場でのバイオマーカーとして血清中の ELISA 測定法の開発と評価を進めてきた。しかしながら ELISA の測定に関する抗体選定やカットオフ値の問題を検証するため、まずは有効性が報告されている血清抗 p53 抗体の測定法を参考とし、かつバイオマーカーとしての有効性を検証するために -80 で凍結保存されていた大腸癌、胃癌、食道癌の血清を用いて抗 p53 抗体の ELISA キットによる測定を開始した。特にその広域スペクトラムと早期癌における感度に関してその有用性を報告してきた。

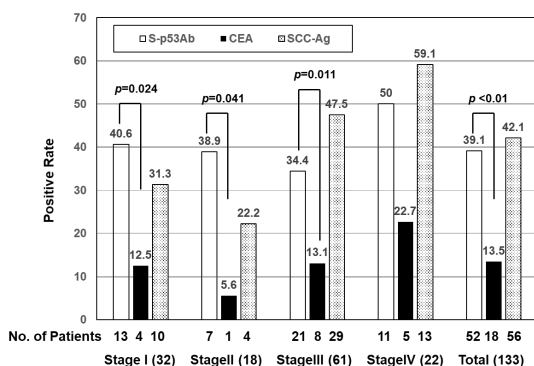


図2. 食道癌症例における腫瘍マーカー

抗 p53 抗体と同様の抗原抗体反応キットを開発するため 2004 年から 2009 年までに保存された長期保存検体の大腸癌症例の血清と 2008 年～2016 年までに保存された短期保存検体の胃癌の血清を用いて ELISA 測定を繰り返し行ったが信頼性のあるデータは得られず、条件の再検討が必要と考えられた。今後の展望としては EZH2 は様々な癌での発現亢進及び予後との相関が報告されており、今回の結果としては残念ながら胃癌における EZH2 の発現と予後との相関は示されず、癌の進展、増殖に関わるであろう分子の詳細なメカニズムの解明までにはいたらなかったが、今後実臨床応用が期待される抗 EZH2 薬の効果判定や腫瘍マーカーとして有望と考えており、今回の結果と照らし合わせて条件設定や抗体薬等の再検討が必要と考える。今後さらなる症例を蓄積しカットオフ値の問題等をさらにブラッシュアップして臨床応用を目指して解析を進めていく。

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)

MASAKI KUNIZAKI、KEIKO HAMASAKI、KOUKI WAKATA 他 11 名

Clinical value of serum p53 antibody in the diagnosis and prognosis of Esophageal squamous cell carcinoma; Anticancer Res 2018 Mar; 38(3):1807-1813、査読あり

MASAKI KUNIZAKI、TETSURO TOMINAGA、KOUKI WAKATA 他 10 名

Clinical significance of the C-reactive

protein-to-albumin ratio for the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma; Mol Clin Oncol. 2018 Feb; 8(2):370-374、査読あり

MASAKI KUNIZAKI、FUKUDA AKIKO、KOUKI WAKATA 他 11 名

Clinical significance of serum p53 antibody in the early detection and poor prognosis of gastric cancer; Anticancer Res 2017 Apr; 37(4):1979-1984、査読あり

MASAKI KUNIZAKI、KEIKO HAMASAKI、KOUKI WAKATA 他 3 名

Unusually high levels of serum p53 antibody in recurrent gastric cancer; Clin J Gastroenterol 2017 Dec; 10(6):503-507、査読あり

MASAKI KUNIZAKI、TERUMITSU SAWAI、HIROAKI TAKESHITA 他 7 名

Clinical value of serum p53 antibody in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer; Anticancer Res 2017 Aug; 36(8):4171-4175、査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

國崎真己、日高重和、若田幸樹、永安 武 他 ; Clinicopathological significance of EZH2 expression in gastric cancer: 第 90 回胃癌学会 (横浜) 2018

國崎真己、日高重和、若田幸樹、永安 武 他 ; 胃癌切除症例におけるヒストンメチル化酵素 EZH2 の発現と臨床病理学的検討: 第 117 回外科学会 (横浜) 2017

國崎真己、日高重和、若田幸樹、永安 武 他 ; Evaluating a novel biomarkers set for postoperative outcome in patients with gastrointestinal cancer ; AACR Annual Meeting (New Orleans) 2016

國崎真己、日高重和、若田幸樹、永安 武 他 ; Evaluating Comparison of the prognostic value of biomarkers in patients with Gastric cancer ; JDDW (神戸) 2016

〔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〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國崎 真己 (KUNIZAKI, Masaki)

長崎大学・病院 (医学系)・助教

研究者番号: 10533747

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

日高 重和 (HIDAKA, Shigekazu)

長崎大学・病院 (医学系)・講師

研究者番号 : 30380885

永安 武 (NAGAYASU, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
教授

研究者番号 : 80284686