

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08006

研究課題名（和文）新規胃癌抗癌剤耐性因子としてのEGR1の意義

研究課題名（英文）Significance of EGR1 as the new response predictors of chemotherapy for gastric cancer

研究代表者

北村 晋志（KITAMURA, Shinji）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：60564490

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）：ヒト胃癌細胞に対してDNAマイクロアレイを用いた解析を行うことによって胃癌の抗癌剤耐性に関与する可能性のある遺伝子を同定した。EGR1の他遺伝子が拾い上げられ、これらの遺伝子について抗癌剤耐性との関連を検討した。これらの遺伝子について胃癌や胃癌以外の癌種においても抗癌剤の効果予測因子や腫瘍マーカーとしての役割を果たせるかについて、臨床検体を用いて検討した。検討の結果、EGR1単独での腫瘍マーカーとしての役割を明確にすることはできなかったが、本研究で検討した他遺伝子を用いることによって腫瘍マーカーとな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

ヒト胃癌細胞に対してDNAマイクロアレイを用いた解析を行うことによって胃癌の抗癌剤耐性や腫瘍マーカーとなる可能性のある遺伝子を同定した。EGR1という遺伝子と他にいくつかの遺伝子が有力な候補として拾い上げられ、これらの遺伝子について抗癌剤耐性と腫瘍マーカーとしての意義について検討した。胃癌や胃癌以外の癌種においても実際の臨床検体を用いて検討したところ、EGR1単独での腫瘍マーカーとしての役割を明確にすることはできなかったが、本研究で検討した他遺伝子を用いることによって腫瘍マーカーとなる可能性が示唆された。今後新たな腫瘍マーカーとして癌の発見の手助けとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify biomarkers for predicting the efficacy of chemotherapy for gastric cancer. Using biopsy specimens before chemotherapy, whole-gene expression was analyzed by microarray. EGR1 and some genes are promising candidates, and the association of these genes with anticancer drug resistance was investigated. We examined using clinical samples of several cancer types. The role of EGR1 alone as a tumor marker was unclear, but the use of other genes examined in this study suggested that it may be a tumor marker.

研究分野：消化器内科学

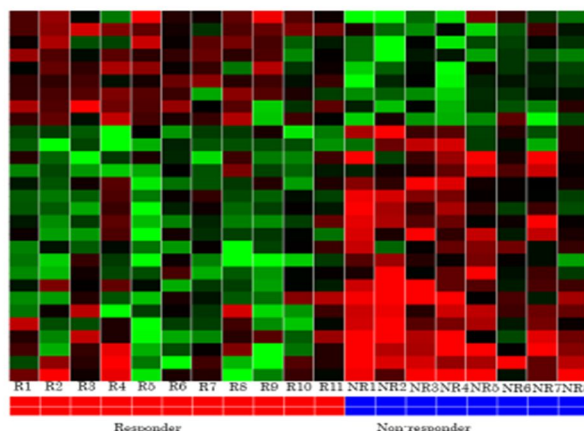
キーワード：胃癌

### 1. 研究開始当初の背景

胃癌は日本を含む東南アジア諸国に多く認められ、我が国における悪性腫瘍の罹患率第2位、悪性腫瘍関連死亡率では肺癌、大腸癌について第3位である。近年では診断技術の向上による早期発見や手術手技の考案・改善から、胃癌による死亡率は徐々に低下してきているが、胃切除後の再発例や遠隔転移・局所高度進行などにより切除不能となる進行胃癌においての予後は未だに非常に悪く、抗癌剤治療が生命予後を改善する唯一の治療である。現在本邦では S-1 + cisplatin(CS)による2剤併用療法が標準的に行われているが、生存期間中央値は6 - 13ヶ月程度であり、十分とはいえず、有効性の高い新規の抗癌剤治療が求められている。我々はこれまで、切除不能進行胃癌を対象に、DCS療法の第1相試験、第2相試験を行い、DCS療法により高い奏効率と downstaging rate が得られることを報告した(Br J Cancer.2007, Cancer Chemother Pharmacol.2010)。また、早期の胃癌を対象とした DCS療法の Neoadjuvant chemotherapy としての有効性を調べる第3相試験を行い、本療法により高いR0切除率が得られることを報告した(Cancer Chemother Pharmacol 2013)。さらに、現在本邦では標準治療であるCS療法に対するDCS療法の優越性を検証する第3相試験(JCOG1013)が行われており、解析が待たれている。

このように、DCS療法は進行胃癌に対して高い有効性を示している。しかし、一方でこのような高い奏効率を持つ本療法においても非奏効例が存在しており、非奏効例では癌細胞が抗癌剤に対する高度の耐性を有しているものと考えられる。そこで申請者らは DCS療法治療前の生検組織を用いて、本療法の著効群と非奏効群における全ゲノム発現プロファイリングを解析し、治療効果と関連のある29個の遺伝子を抽出した。(図1)

図1：抗癌剤耐性遺伝子のクラスタリング解析



### 2. 研究の目的

マイクロアレイ解析により耐性因子として抽出された EGR1 は予備実験にて全生存期間の間に、有意な相関を認めため、EGR1 を詳細に解析し、新しいバイオマーカーを開発することとした。本研究により各薬剤に対する耐性や感受性を規定する遺伝子が同定されれば、新しい個別化医療に繋がるとともに、耐性遺伝子とその機序を解明することにより、耐性克服薬の開発にも繋がることが期待された。

### 3. 研究の方法

EGR1 の他 PDGFB, AVPI1, CISH, PCGF3, ANTXR2, PLK2, ANXA5, ATP7B, FAM116A, HECA などの遺伝子が拾い上げられており、これらの遺伝子について抗癌剤耐性との関連を調べるため、ヒト胃癌細胞株 MKN45(HSRRB)を使用し、SiRNA を導入し、ノックダウン細胞を作製したうえで、現在の胃がん治療で頻用される抗癌剤である、docetaxel, CDDP、5FU のそれぞれの薬剤について、MTT Assay により胃癌細胞の viability から IC50 を求め、negative control と比較した IC50 を測定し、薬剤耐性の変化について検討を行った。さらに臨床検体にて遺伝子の発現率などについて検討を進行中である。

#### 4. 研究成果

EGR1 の他 PDGFB, AVPI1, CISH, PCGF3, ANTXR2, PLK2, ANXA5, ATP7B, FAM116A, HECA などの遺伝子が拾い上げられており、これらの遺伝子について抗癌剤耐性との関連を調べるため、ヒト胃癌細胞株 MKN45(HSRRB)を使用し、SiRNA を導入し、ノックダウン細胞を作製したうえで、現在の胃癌治療で頻用される抗癌剤である、docetaxel、CDDP、5FU のそれぞれの薬剤について、MTT Assay により胃癌細胞の viability から IC50 を求め、negative control と比較した IC50 を測定し、薬剤耐性の変化について検討を行った。

EGR1 は検討した遺伝子の中で最もよく、生存期間との相関を認めていた。

EGR1 を含む 15 の遺伝子について SiRNA を用いて遺伝子のノックダウン実験を行った。本段階の実験では当初有用と考えられた EGR1 では大きな変化が確認できず、下記の遺伝子については比較的大きな変化が確認された。

図 2

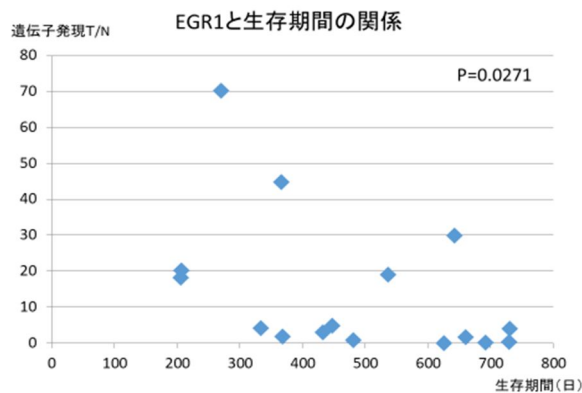
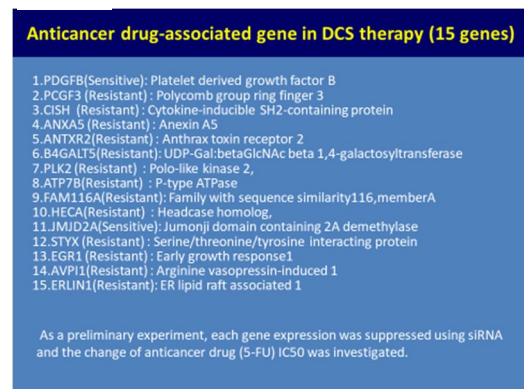


図 3



(1) ANXA5 のノックダウンにより 5-FU の IC50 が低下。(2) PCGF3 のノックダウンにより、Docetaxel の IC50 が低下。(3) CISH のノックダウンにより、5-FU の IC50 が低下(4) PDGF のノックダウンにより、5-FU の IC50 が上昇。これらの結果を踏まえ、EGR1 単独の検討では次の段階に進めた場合、EGR1 の有用性が低いと判断された場合の無駄が大きいいため、EGR1 以外の PDGFB, AVPI1, CISH, PCGF3, ANTXR2, PLK2, ANXA5, ATP7B, M116A, HECA などの遺伝子についても SiRNA 導入実験を行い、薬剤耐性の変化について検討を行った。その結果これらの遺伝子群の中で有用性が高い可能性がある遺伝子臨床例、臨床検体での発現率、血清において検出可能か等についての検討を進行中である。さらに現在進行中の検討になるが、これらの遺伝子のなかで遺伝子 B について蛋白レベルでの発現が確認され、血清レベルで新規腫瘍マーカーとなる可能性が示唆されている。

図 4

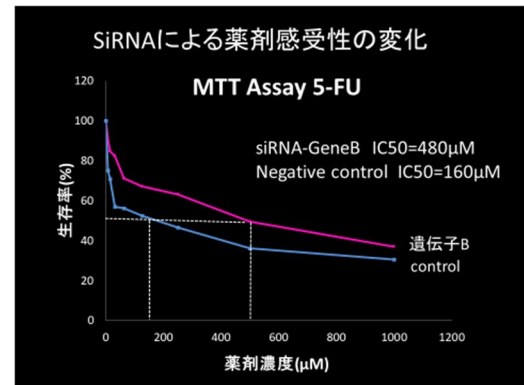


図 5

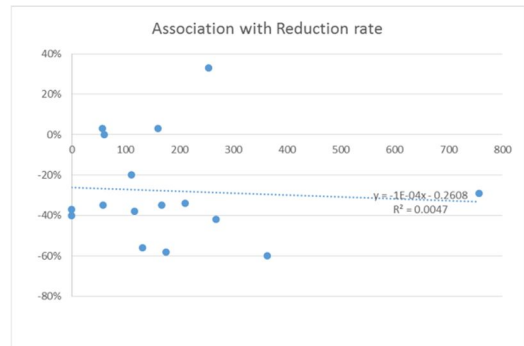


図 6

PI	Pathology	CEA	CA19-9	CA125	B
1	sig	1.7	343	374	363.6
2	Por1,tub2>por1	9.8	10	61	111.0
3	Tub2>por	285	49	96	166.4
4	Tub1-2	3.2	1	10	60.7
5	por2	1.5	107	202	ND
6	por1	2.5	1	398	253.6
7	Pap,tub1>por1	29.2	473	42	ND
8	Por,MANEC	43	1	96	175.2
9	Por	1	17	312	116.3
10	NEC	104.7	9	NE	267.7
11	sig	2	9	26	ND
12	NEC	18.5	7	14	ND
13	Por	1.3	63	NE	131.3
14	Por	3.1	20	13	160.2
15	Por	2.7	21	NE	756.1
16	Por	53.4	16	NE	174.9
17	Tub2	24.4	32	NE	57.2
18	Sig	0.4	12	NE	557.2
19	Paportub	83.7	28	NE	210.4
20					57.7

図 7

	Detectable rate (%)
GeneB(plasma)	65% (13/20)
CEA (serum)	45% (9/20)
CA19-9 (serum)	25% (5/20)
CA125 (serum)	57% (8/14)

<引用論文>

1. Takayama T, Sato Y, Sagawa T, et al. Phase I study of S-1, docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with unresectable metastatic gastric cancer. *Br J Cancer*. 2007 Oct 8;97(7):851-856
2. Sato Y, Takayama T, Sagawa T, et al. Phase II study of S-1, docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with unresectable metastatic gastric cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010 Sep;66(4):721-728
3. Hirakawa M, Sato Y, Takayama T, et al. A phase II study of neoadjuvant combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and S-1 for locally advanced resectable gastric cancer: nucleotide excision repair (NER) as potential chemoresistance marker. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013 Mar;71(3):789-797

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	高山 哲治  (TAKAYAMA Tetsuji)  (10284994)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授   (16101)	
研究分担者	佐藤 康史  (SATO Yasushi)  (80343383)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任教授   (16101)	
研究分担者	六車 直樹  (MUGURUMA Naoki)  (90325283)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授   (16101)	

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