

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06857

研究課題名(和文)Liquid biopsy及びDigitalPCRを用いた高感度胃癌診断法の開発

研究課題名(英文)Development of highly sensitive diagnostic method of gastric cancer using Liquid biopsy and Digital PCR

研究代表者

佐藤 康史 (SATO, Yasushi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・特任教授

研究者番号：80343383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：予後不良な胃癌に対して、リアルタイムに鋭敏に胃癌を検出できる検査法が求められる。

これまで申請者らは、糖鎖腫瘍抗原のSTn 合成酵素であるST6GalNAc-Iが胃癌に高発現しその悪性化に関わることを報告してきた。

そこで申請者らは、胃癌患者末梢血から抽出した核酸分画のST6GalNAc-I mRNAを高感度なdigital PCR を用い検出するLiquid Biopsyによりモニターし、そのコピー数と胃癌の治療経過が相関することを明らかにし胃癌に対する新たなbiomarker の確立にむけての取り組みを進めている。

研究成果の概要(英文)：Currently, there is a desperate need for developing more sensitive, real time detecting method to diagnose gastric cancer in early stage. Because most of the patients diagnosed with gastric cancer are unsuitable for curative surgery since many patients already have distant metastasis at diagnosis, which resulted in extremely poor prognoses. Until now, we reported ST6GalNAc-I that is known as the sialyl-Tn antigen synthase is highly expressed in gastric cancer and related with its malignant potential. We then examined expression of ST6GalNAc-I mRNA in peripheral blood by using digital PCR, so-called "liquid biopsy", and then we verified that the relationship between its copy number expression and their clinical courses. We are now developing a new monitoring biomarker system using this technique for gastric cancer treatment.

研究分野：消化器病

キーワード：胃癌 診断

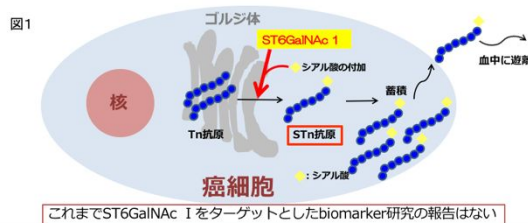
## 1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌治療は近年急速な進歩を遂げているが、依然としてその予後は不良であり、早期診断による根治的な治療、適切なタイミングでの抗癌剤の導入が予後の向上に重要となる。しかしながら、現在臨床で行われている腫瘍マーカーや画像検査では微量な腫瘍の検出感度は十分とは言えず、リアルタイムかつ鋭敏に胃癌を検出できうる早期診断のための検査 modality の開発が求められる。

(2) これまで申請者らは、胃癌腫瘍マーカーとして汎用されている STn 糖鎖抗原の synthase である ST6GalNAc-I が直接胃癌転移能亢進にも関与することを報告してきた (図 1)。

胃癌細胞においてSTnはST6GalNAc Iにより発現調節され、ST6GalNAc I siRNAによりSTnの発現は低下し増殖及び転移能が抑制される。

(Tamura et al. Gastric Cancer 2014)



## 2. 研究の目的

そこで、末梢血から抽出した核酸分画の ST6GalNAc-1 mRNA もしくはこれを制御する miRNA を digital PCR により極めて高感度に定量する新たな胃癌 biomarker の開発を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 胃癌細胞株での ST6GalNAc の定量

末梢中全血中に STn 発現胃癌細胞株 (MKN45) を混入し、細胞数に依存して ST6GalNAc コピー数が増加するか否かを digital PCR で定量し検討する。

### (2) 胃癌患者末梢血での ST6GalNAc の定量

健康人と胃癌患者の末梢血から核酸をそれぞれ抽出し ST6GalNAc コピー数を digital PCR で定量し比較・検討する。さらに、抗癌剤投与中の胃癌患者の末梢血を臨床経過で複数回採取、核酸を抽出し、ST6GalNAc コピー数を digital PCR で定量し検討する。胃癌患者の血中 ST6GalNAc-1 mRNA 量が診断能、治療効果、臨床病理学的因子、予後などとの相関性するかを検証する。

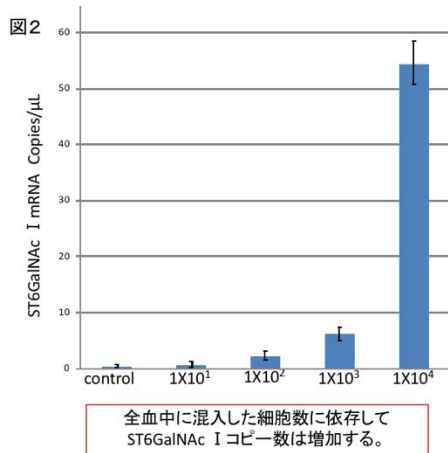
(3) さらに、ST6GalNAc-1 の発現を制御する miRNA について microarray による同定を試みる

(4) 胃癌症例の末梢血収集を前向き研究として行い、ST6GalNAc-1 の liquid biopsy の臨床的有用性について検証し胃癌に対する新たな biomarker の確立にむけての取り組みをすすめる。

## 4. 研究成果

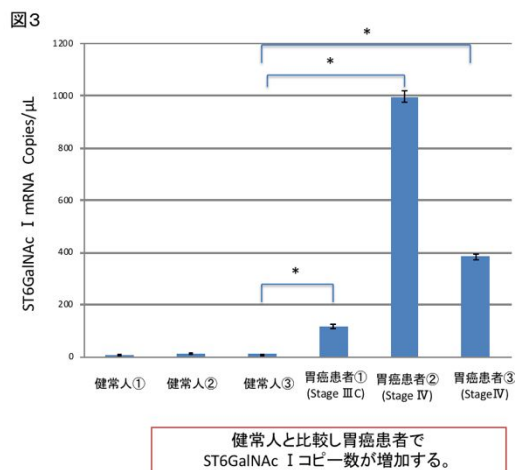
### (1) digital PCR による末梢血での ST6GalNAc の検出

末梢血中で ST6GalNAc mRNA が検出可能かを検討するために、STn 高発現の胃癌細胞株 (MKN45) を  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^4$  個に調整し全血中に混入後 plasma を分離し digital PCR で定量したところ、混入した細胞数に依存した ST6GalNAc コピー数の増加を検出可能であった (図 2)。



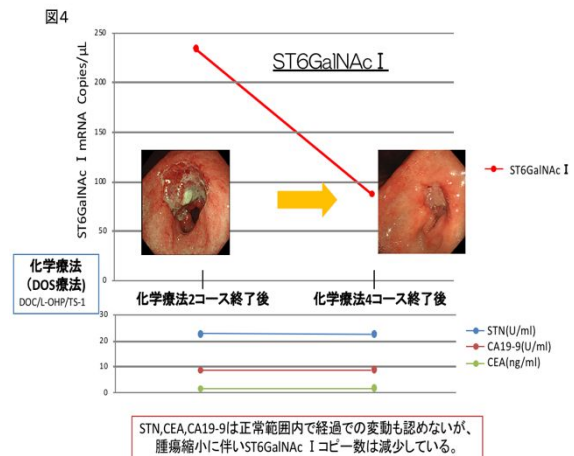
(2) 健常人と胃癌患者の plasma での ST6GalNAc の比較

健常人と胃癌患者において、plasma 中の ST6GalNAc を digital PCR で測定したところ健常人でほとんど検出されなかったが、胃癌患者においてはいずれも有意に高いコピー数が得られた (図3)。



(3) 胃癌患者の臨床経過と ST6GalNAc コピー数の相関

胃癌患者の末梢血を治療経過で経時的に採取し、digital PCR で ST6GalNAc を定量したところ腫瘍マーカーの低下や画像での縮小に相関し ST6GalNAc のコピー数も減少した。代表症例を示す (図4)。



前庭部の3型進行胃癌に対して化学療法(ドセタキセル、オキサリプラチン、S 1併用DOS療法)を2コース終了後と化学療法4コース終了後の上部内視鏡検査では、腫瘍の縮小を認めたが、各種腫瘍マーカーは正常範囲内で低下は認めなかった。しかし、ST6GalNAc は腫瘍縮小に伴いコピー数の著明な減少を認めた (図4)。

## 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3件)

Ohnuma Hiroyuki, Sato Yasushi, Hirakawa Masahiro, Kikuchi Shohei, Miyanishi Koji, Sagawa Tamotsu, Takahashi Yasuo, Nobuoka Takayuki, Okamoto Koichi, Miyamoto Hiroshi, Takemasa Ichiro, Takayama Tetsuji, Kato Junji. Docetaxel, cisplatin and S-1 (DCS) combination chemotherapy for gastric cancer patients with peritoneal metastasis: a retrospective study Cancer Chemother Pharmacol. 81. 539 ~ 548. 2018 doi: 10.1007/s00280-018-3523-x. (査読あり)

Uemura Naoki, Kikuchi Shohei, Sato Yasushi, Ohnuma Hiroyuki, Okamoto Koichi, Miyamoto Hiroshi, Hirakawa Masahiro, Sagawa Tamotsu, Fujikawa Koshi, Takahashi Yasuo, Okuda Toshinori, Minami Shinya, Takahashi Minoru, Okamoto Tetsuro, Takada Kohichi, Miyanishi Koji, Takayama Tetsuji, Kato Junji A phase II study of modified

docetaxel, cisplatin, and S-1 (mDCS) chemotherapy for unresectable advanced gastric cancer Cancer Chemother Pharmacol. 707 ~ 713 80 2017 doi: 10.1007/s00280-017-3404-8.  
( 査読あり )

Sato Yasushi, Ohnuma Hiroyuki, Nobuoka Takayuki, Hirakawa Masahiro, Sagawa Tamotsu, Fujikawa Koshi, Takahashi Yasuo, Katsuki Shinich, Takahashi Minoru, Maeda Masahiro, Okagawa Yutaka, Naoki Uemura, Kikuch Syouhei, Okamoto Koichi, Miyamoto Hiroshi, Shimada Mitsuo, Ichiro Takemasa, Kato Junji, Takayama Tetsuji Conversion therapy for inoperable advanced gastric cancer patients by docetaxel, cisplatin, and S-1 (DCS) chemotherapy: a multi-institutional retrospective study Gastric Cancer 20 517 ~ 526 2017 doi: 10.1007/s10120-016-0633-1.  
( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

Yasushi Sato, Tamotsu Sagawa, Yasuo Takahashi, Hiroyuki Ohnuma, Kyoko Hamaguchi, Masahiro Hirakawa, Koshi Fujikawa, Koichi Okamoto, Hiroshi Miyamoto, Naoki Muguruma and Tetsuji Takayama. A dose-escalation study of docetaxel, oxaliplatin and S-1 (DOS) as a first-line therapy for patients with unresectable metastatic gastric cancer. ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium 2018

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 康史 ( SATO, Yasushi )  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 ( 医学系 ) ・特任教授  
研究者番号 : 80343383

### (2) 研究分担者

瀧本 理修 ( TAKIMOTO, Rishu )  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 10336399

加藤 淳二 ( KATO, Junji )  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 20244345

植村 尚貴 ( UEMURA, Naoki )  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号 : 50749588