

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10584

研究課題名（和文）腫瘍関連好中球に着目した胃癌リンパ節転移機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation for pivotal role of tumor associated neutrophils in gastric cancer.

研究代表者

毛利 靖彦（Mohri, Yasuhiko）

三重大学・医学系研究科・客員教授

研究者番号：70345974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：胃癌における好中球浸潤の臨床的意義や、全身循環中の好中球として、NETosisに着目し、その定量化を図り、その臨床的意義を解析した結果、TAN上昇、NETs高値はともに予後不良となることがわかり、予後マーカーとなるのみならず、癌進展において深いかわりを持つ可能性が考慮された。また本研究に付随して解析したL1CAM高発現は臨床的に有用な予後予測マーカーとなるほか、in vitro/in vivo研究の結果、治療標的となりうる可能性を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果を用いることで、胃癌術後予後不良群の同定が可能となるとともに、治療をおこなううえでの decision makingにつながると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the clinically relevance of tumor-associated neutrophils and circulating NETosis in gastric cancer patients. Our study clearly revealed that elevated TANs or NETs were significantly associated with poor survival in gastric cancer patients. Furthermore, gene expression analysis demonstrated that increased L1CAM expression was deeply involved in metastatic process and poor prognosis in gastric cancer patients.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 好中球

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 【胃癌治療の現状とリンパ節転移の意義】

胃癌は中国、日本、韓国などアジアや南米に患者が多い疾患であり、近年、胃癌検診や胃内視鏡などの普及もあり、死者数は年々減少傾向にあるものの、2014年時点での日本における胃癌の死者数は47,903人(男31,483人、女16,420人)で、男性では肺癌に次いで第2位、女性では大腸癌に次いで第2位と依然、死亡者数の多い疾患である(国立がんセンターがん登録・統計より)。近年、内視鏡治療技術の進歩に伴うESD(内視鏡粘膜下層剥離術)や、腹腔鏡下手術の技術の確立により、早期胃癌に対する治療の選択肢が増えてきている一方で、いわゆる縮小手術の妨げとなるのが、リンパ節転移の有無であることから、リンパ節転移の予測方法の確立は、早期胃癌に対する外科的個別化治療への試金石になりうる可能性がある。また、広範なリンパ節転移を認めるような根治手術不能症例の治療に関しては、近年、TS-1、シスプラチン、タキサン系薬剤などの使用と分子標的剤(trastuzumab, ramcilumab)の併用により、胃癌全体に対する全身化学療法の効果は期待できるようになったが、中央生存期間は12か月前後と、大腸癌、肺癌などと比較して満足のものではない。したがって、広範なリンパ節転移を有するような根治手術不能症例の新規治療法の開発も非常に重要である。

### 【好中球と癌】

好中球はヒトの血中に存在する免疫細胞で、ヒトを感染症から守り、創傷治癒を促進する役割を担っているが、興味深いことに、癌組織では好中球の集積がしばしば見られ、転移と関連しているとされている。すなわち、このような腫瘍関連好中球(腫瘍微小環境における好中球の集積)は細胞外マトリックス(ECM)の再構成を通して癌細胞の転移および浸潤や血管新生に関与しているとされている。また、腫瘍関連好中球は癌細胞が拡散する部位において拡散に先立つ時点にも見られ、この集積が原発腫瘍から発せられるシグナルによって開始されるのではないかとされており、今後、さらなる飛躍が望まれる研究領域である。一方、活性化好中球は、他の細胞とは異なり、核内のクロマチンを細胞外に放出することが発見された。このクロマチン網はneutrophil extracellular traps (NETs)と呼ばれ、この過程はネクロシスやアポトーシスとは異なるタイプの細胞死ということで、NETosisと名付けられている。興味深いことは、NETosisが癌転移を助長するとの報告も見られる。

## 2. 研究の目的

癌転移メカニズムの解明と克服法の確立は生命予後改善に大きく貢献する。転移に関して、癌細胞側と宿主側の複合的要素が関与している可能性が想定されるが、リンパ節転移における腫瘍関連好中球のプロファイリングおよび機能解析は、その複合的要素を精密に解明する可能性がある。そこで本研究では、癌転移、とりわけ胃癌リンパ節転移機構の解明を目的として腫瘍関連好中球を評価し、その臨床的意義を明らかにする。また活性化好中球が、核内のクロマチンを細胞外に放出することにより形成されるクロマチン網neutrophil extracellular traps (NETs)を定量解析することでその臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

・DNAメチル化・microRNA・遺伝子発現網羅的解析：リンパ節転移陽性胃癌5例、リンパ節転移陰性胃癌5例、正常胃粘膜5例を使用し、microRNAアレイ、メチル化アレイ、cDNAアレイを施行した

### ・RNA抽出(組織)、cDNA化

胃癌組織150例の原発腫瘍、近傍正常胃粘膜より採取したRNA later保存凍結標本からRNAをmiRNeasy RNA extraction kit(Qiagen)を利用して抽出し、cDNAをrandom hexamerを使用して合成した

### ・定量的PCR

胃組織より抽出したcDNAは、Standard curve methodを使用し、Step-One PlusリアルタイムPCRシステム(Thermo scientific)でGAPDHをnormalizerとしてqPCRを施行した。またmiRNAの定量解析は、Taqman primerとTaqman microRNA RT kitを利用してmicroRNA-specificな逆転写を施行したうえで、qPCRを同様に施行した。またnormalizerにはmiR-16を使用した。

### ・胃癌術前血清におけるNETosisの定量化や可溶性PD-L1、可溶性CTLA-4の濃度解析

免疫染色を施行した胃癌組織150例の術前血清を用い、サンドウィッチELISA法にてNETosisの定量化に加え、可溶性PD-L1と可溶性CTLA-4の濃度測定を行った。

### ・がん微小環境におけるTumor infiltrative Neutrophilsやlymphocytes解析

胃癌組織150例の原発腫瘍のFFPE標本から薄切を行い、CD66、FOXP3とCD-8の胃癌組織における免疫染色を行い、がん浸潤好中球(TAN)に加え、がん浸潤リンパ球(TIL)の程度を解析した。

### ・In vitro解析:

胃癌細胞株を使用し、候補遺伝子を siRNA transfection で遺伝子発現抑制を行ったうえで、MTT assay、Invasion assay、migration assay などをおこない、遺伝子発現調節による phenotype の変化を評価した。

#### 4. 研究成果

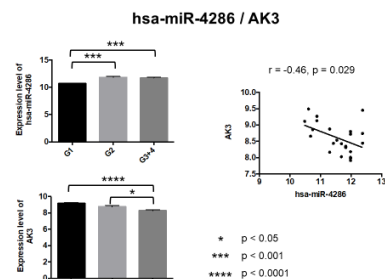
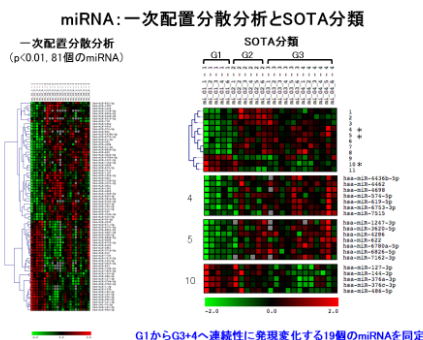
胃癌リンパ節転移過程に関わるエピゲノム変化 (特に microRNA ならび DNA メチル化) を同定することを目的に、リンパ節転移陰性患者群、リンパ節転移陽性患者群の原発腫瘍、ならびに正常胃粘膜の 3 群間を profiling を、網羅的解析を行った。

その結果、miR-4286 が段階的に発現増加を認め、また cDNAarray の結果と統合解析を行うと、miR-4286 が AK3 と逆相関の関係を保つことが明らかとなった。

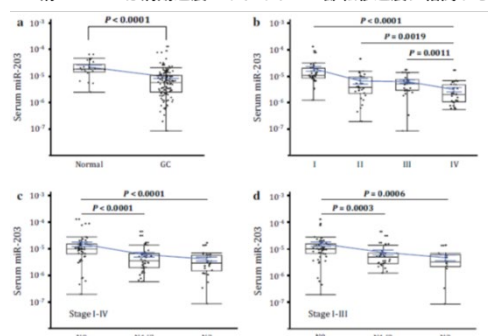
この結果から、has-miR-4286 は、癌進行に伴って発現増加し、リンパ節転移進展にも深くかかわるとともに新規バイオマーカーになる可能性もあるため、現在、validation をすすめているが、発現量が少ないこともあり、発現解析方法を digital PCR などに変更する方向で、遂行中である。

また本研究に付随し上皮間葉移行にかかわる miRNA (miR-200a, -200b, -200c, -141, -429, -203) に注目し、胃癌患者 130 例の術前血清より抽出した RNA を利用し、それらの発現解析をしたところ、血清 miR-203 は、病期進展、とりわけリンパ節転移進展にもない有意に発現低下をきたし、また再発予測、予後予測に有用なマーカーであることを報告した (右図、Imaoka H, Mohri Y, et al. Gastric cancer 2016 Jul;19(3):744-53)。

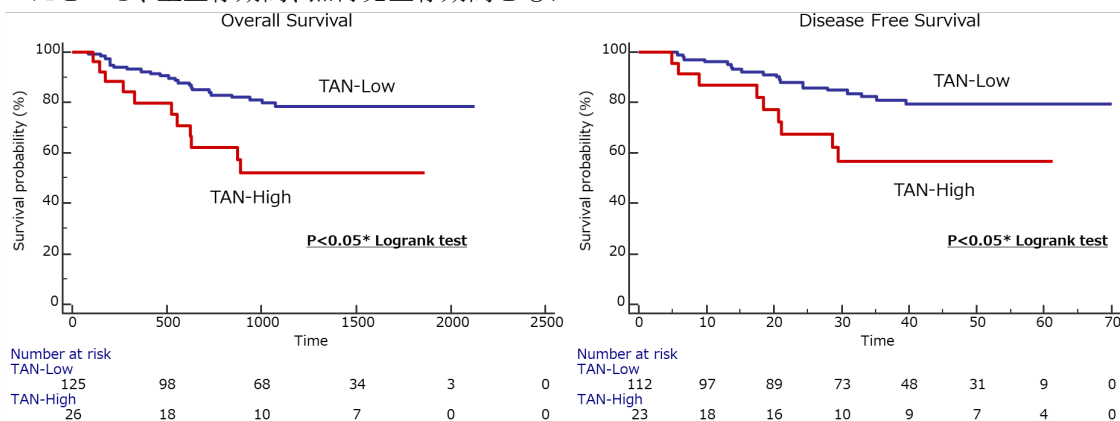
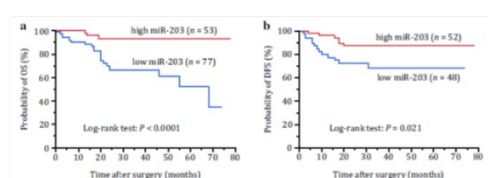
一方、腫瘍浸潤好中球 (TAN) を評価するために CD66 を用いて免疫染色を行い、その臨床的意義を解析した。CD66 陽性骨髄球数は、がん組織において有意に上昇していた。また予後解析を行ったところ、全生存期間、無再発生存期間ともに



#### 血清miR-203は病期進展とりわけリンパ節転移進展に相関する

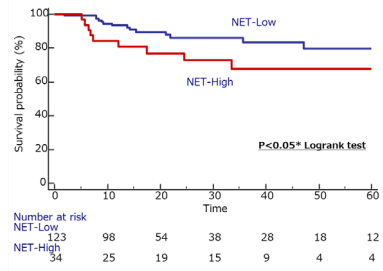
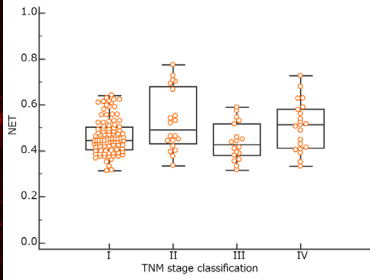
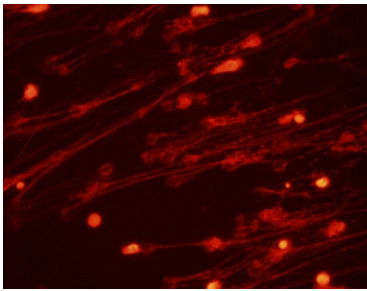


#### 血清miR-203低下は再発予測・予後予測マーカーとなりうる

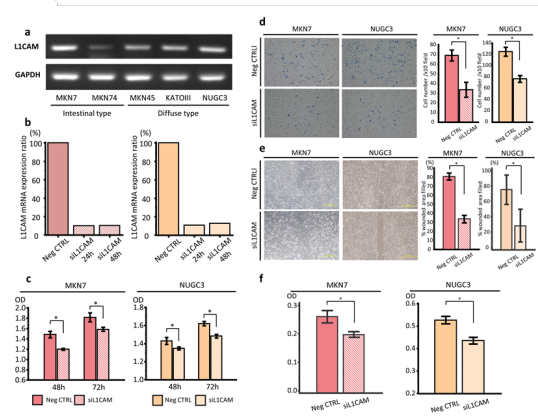
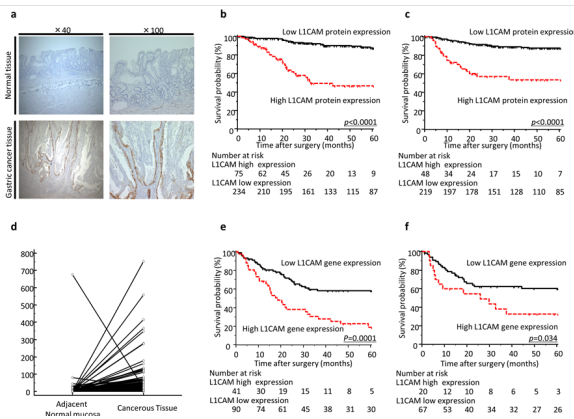


腫瘍浸潤好中球数が多い症例群は少ない症例群と比較し、有意に予後不良を呈することが明らかとなった (上図)。

一方、循環血漿中の好中球の意義を明らかにするために、NETs の定量化を行った。MPO を用いたサンドイッチ ELISA を行い、術前血漿検体を用いて半定量化を行い、その臨床的意義の解明を行った。興味深いことに、NET 濃度は病期進展とともに有意に上昇し、またその高値軍は予後不良であることを明らかにした (下図)。



また本研究に付随して、他癌腫でリンパ節転移に関連すると報告されている細胞接着分子 L1 cell adhesion molecule (L1CAM)に着目して、その発現解析を約 300 例の切除標本を用いた免疫染色で行うと、胃癌組織における L1CAM 高発現は、深達度やリンパ節転移、遠隔転移進展と相関し、また全生存期間、無再発生存期間における独立後不良因子となることをあきらかにした。またこの結果は、fresh frozen sample を用いた遺伝子発現解析においても同様の臨床的意義を持つことが確認されたため、その機能解析を siRNA transfection を用いて行った。L1CAM 発現抑制した胃癌細胞株では、増殖能、遊走能、浸潤能が有意に抑制され、またアノイキシス抑制性を解除することを明らかにした。また in vivo 解析においても L1CAM 抑制が、腹膜播種進展を抑制することが明らかとなり、有用な予後マーカーとなるのみならず、治療標的となりうる可能性を報告した (Ichikawa T, Okugawa Y, Toiyama Y, et al. Br J Cancer. 2019;121(12):1058-1068)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Shigeyasu Kunitoshi, Yamamoto Akira, Shigemori Tsunehiko, Yin Chengzeng, Ichikawa Takashi, Yasuda Hiromi, Fujikawa Hiroyuki, Yoshiyama Shigeyuki, Hiro Junichiro, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato, Goel Ajay	4. 巻 16
2. 論文標題 Enhanced AZIN1 RNA editing and overexpression of its regulatory enzyme ADAR1 are important prognostic biomarkers in gastric cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12967-018-1740-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimura Tadanobu, Toden Shusuke, Kandimalla Raju, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Kanda Mitsuro, Baba Hideo, Koderu Yasuhiro, Kusunoki Masato, Goel Ajay	4. 巻 -
2. 論文標題 Genomewide Expression Profiling Identifies a Novel miRNA-Based Signature for the Detection of Peritoneal Metastasis in Patients With Gastric Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.00000000000003647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ichikawa Takashi, Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Tanaka Koji, Yin Chengzeng, Kitajima Takahito, Kondo Satoru, Shimura Tadanobu, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato	4. 巻 121
2. 論文標題 Clinical significance and biological role of L1 cell adhesion molecule in gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1058 ~ 1068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-019-0646-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigemori Tsunehiko, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Yamamoto Akira, Yin Chengzeng, Narumi Aya, Ichikawa Takashi, Ide Shozo, Shimura Tadanobu, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Hiro Junichiro, Yoshiyama Shigeyuki, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato	4. 巻 26
2. 論文標題 Soluble PD-L1 Expression in Circulation as a Predictive Marker for Recurrence and Prognosis in Gastric Cancer: Direct Comparison of the Clinical Burden Between Tissue and Serum PD-L1 Expression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 876 ~ 883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-018-07112-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Ichikawa Takashi, Kawamura Mikio, Yasuda Hiromi, Fujikawa Hiroyuki, Saigusa Susumu, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Tanaka Koji, Inoue Yasuhiro, Tanaka Motoyoshi, Miki Chikao, Kusunoki Masato	4. 巻 53
2. 論文標題 Colony-stimulating factor-1 and colony-stimulating factor-1 receptor co-expression is associated with disease progression in gastric cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 737-749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yoshinaga Okugawa, Yuji Toiyama, Yasuhiko Mohri, Akira Yamamoto, Tsunehiko Shigemori, Chengzeng Yin, Aya Narumi, Shozou Ide, Takahito Kitahima, Hiromi Yasuda, Hiroyuki Fujikawa, Junichiro Hiro, Shigeyuki Yoshiyama, Masaki Ohi, Koji Tanaka, Toshimitsu Araki, and Masato Kusunoki
2. 発表標題 L1CAM as a pivotal mediator for disease progression and prognostic biomarker in gastric cancer patients.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥川喜永、問山裕二、井出正造、北嶋貴仁、志村匡信、廣 純一郎、田中光司、楠 正人
2. 発表標題 胃癌におけるL1CAM 発現解析の臨床的意義とその癌進展における機能
3. 学会等名 第78 回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥川喜永 問山裕二 森浩一郎 市川崇 川村幹雄 安田裕美 藤川裕之 三枝晋 吉山繁 幸 大井正貴 荒木俊光 田中光司 井上靖浩 三木誓雄 楠正人
2. 発表標題 胃癌におけるCSF-1/CSF- 1R 共発現の予後マーカーとしての有用性と癌進展における機序
3. 学会等名 第55 回日本癌治療学会学術 集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥川喜永、問山裕二、田中光司、井出正造、今岡裕基、志村匡信、北嶋貴仁、近藤哲、廣純一 郎、毛利靖彦、三木誓雄、楠正人
2. 発表標題 胃癌におけるAZIN1 RNA 修飾とADAR1/ADAR2 発現の臨床的意義
3. 学会等名 第76 回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔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	問山 裕二  (Toiyama Yuji)  (00422824)	三重大学・医学系研究科・准教授   (14101)	
研究分担者	大井 正貴  (Ohi Masaki)  (40418752)	三重大学・医学部附属病院・准教授   (14101)	
研究分担者	楠 正人  (Kusunoki Masato)  (50192026)	三重大学・医学系研究科・教授   (14101)	