

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16278

研究課題名（和文）MELTFを標的とした胃癌の新規診断法および治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment option targeting MELTF in gastric cancer

研究代表者

澤木 康一（SAWAKI, Koichi）

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60815033

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：多様な進展経路を持つ進行胃癌の治療成績を改善するには、新規分子標的治療薬と鋭敏でかつ病態を反映し得る腫瘍マーカーの開発が望まれる。本研究ではmelanotransferrin (MELTF) に着目し、その胃癌の診断・治療の両面における臨床応用の可能性を追求した。MELTFのノックダウンにより胃癌細胞の各種活性が低下し、マウス皮下腫瘍モデルでの造腫瘍能も抑制された。外科切除標本でのMELTFの免疫組織化学染色により原発巣組織中MELTF発現度が切除後予後と密接に関連すること、ELISA法より測定した血清中MELTF値は胃癌病期の進行に伴って上昇し予後マーカーとなることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりこれまでに報告のないMELTFの胃癌における機能が明らかとなり、この成果は現在の医療で重視される個別化治療の手段としての新規分子標的薬の開発につながる。MELTFは、現在汎用されている腫瘍マーカーであるCAE、CA19-9の欠点を克服する鋭敏な胃癌血清腫瘍マーカーとなり得る。血清検体は簡便かつ非侵襲的に採取可能であり、胃癌初期診断、再発診断および治療効果判定のためのスクリーニング法の対象として理想的である。検体採取に特殊な手技を必要とせず、広く一般に普及しうる手法であるため社会への貢献度も大きい。

研究成果の概要（英文）：To identify novel biomarkers that are vital for improving management of patients with gastric cancer (GC), the biological functions and expression of melanotransferrin (MELTF) were evaluated. Inhibition of MELTF expression suppressed the invasion ability of GC cells. Increased tissue MELTF mRNA expression was associated with shorter survival. Furthermore, staining intensity of tissue MELTF protein was linked to recurrence rates. Serum MELTF levels gradually were increased from healthy controls to advanced GC. Patients with high serum MELTF levels had poor prognosis. Both tissue and serum MELTF levels may serve as biomarkers of GC progression.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 MELTF 機能解析 血清診断

1. 研究開始当初の背景

胃癌は依然として本邦で罹患率が高く、特に進行再発胃癌は依然として予後不良であるため、この疾患の克服は重大なテーマのひとつである。治療に新展開をもたらす成績を改善するためには、新規治療標的分子の同定が必要である。また、スクリーニング、治療方針決定のための進行度診断、治療の効果判定、切除術後の再発モニタリングのいずれの場面においても、非侵襲的かつ簡便に採取可能な血清で測定が可能な優れた腫瘍マーカーの開発が必要である。こうしたマーカーの候補は分子生物学的解析により数多く見出されてきたが、どれも実用化には至っておらず、現在でも CEA、CA19-9 などの古典的な腫瘍マーカーが使用されている。しかし、これら既存の腫瘍マーカーは感度、特異性ともに物足りず、これらを凌駕する診断能を有する腫瘍マーカーの開発が個別化治療の時代の到来に際し急務である。

網羅的発現比較解析によって、melanotransferrin (MELTF) が遠隔転移を有する胃癌組織において有意に発現亢進していることを発見した。4 例の転移性胃癌症例から得られた組織を対象とした transcriptome 解析 (HiSeq, Illumina 社) により網羅的発現解析を行った。その結果、MELTF が胃癌原発巣において胃非癌部に対し 12 倍の発現度で有意に発現亢進していた。

	胃原発巣 vs 胃非癌部	
	log ₂	P
MELTF	3.27715	0.0005

MELTF は、トランスフェリン superfamily に属する細胞表面糖タンパクであり、皮膚の悪性黒色腫で高発現が報告されている。生理的作用として鉄の輸送に関与しているとされるが、その胃癌における役割については現時点で報告されていない。本研究では、この MELTF に着目し、そのバイオマーカーとしての意義について調べた。その新規性の高さと血清値が予後と相関することから、MELTF は臨床応用を視野に入れることのできる非常に魅力的なバイオマーカーである。

2. 研究の目的

多様な進展経路を持つ進行胃癌の治療成績を改善するには、治療の個別化につながる新規分子標的治療薬と鋭敏でかつ病態を反映し得る腫瘍マーカーの開発が望まれている。本研究では、melanotransferrin (MELTF) に着目し、進行胃癌の予後向上の鍵となる新規分子標的および血清診断法の開発につなげていくことを目指し、以下の実験を行うことを目的とした。

MELTF の治療標的分子としての可能性：MELTF 高発現胃癌細胞株でのノックダウン前後の細胞機能を比較する。MELTF が干渉する癌の悪性度を司る signaling pathway を検索する。マウス皮下腫瘍モデルで MELTF ノックダウンの造腫瘍能への影響を調べる。

MELTF の胃癌バイオマーカーとしての意義：外科切除標本での MELTF 免疫組織化学染色を行う。ELISA 法により健常者および胃癌患者の血清中 MELTF 値の測定（後者は経時的測定）を行い、その診断的意義を検証し既存の胃癌血清腫瘍マーカーとの診断能を比較する。

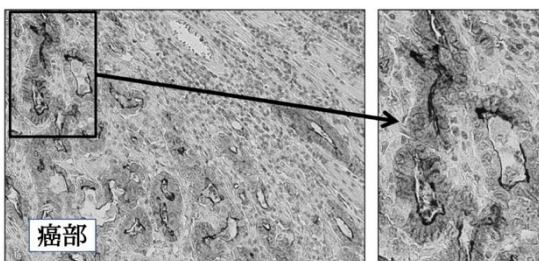
3. 研究の方法

MELTF の機能解析

- (1) in vitro 実験；MELTF 高発現細胞株 MKN1、AGS を対象に、siRNA 法による MELTF のノックダウンを行った。ノックダウン前後の増殖能 (WST-8 assay)、遊走能 (Wound healing assay)、浸潤能 (Matrigel invasion assay)、細胞接着能 (CytoSelect 48-Well Cell Adhesion Assay kit) の変化を調べた。
- (2) in vivo 実験；マウス皮下腫瘍モデルによる造腫瘍能を MELTF ノックダウンの有無で比較した。
- (3) Pathway 解析；MELTF が胃癌においてどのような腫瘍関連分子や signaling pathway との干渉を有するのを知ることは、その特性を理解するために重要である。PCR array を用いて MELTF 発現と相関度の高い癌関連分子を同定した。

MELTF の発現解析

- (4) 免疫組織化学染色法；胃癌切除検体から得た切片を用いて腫瘍組織中の MELTF 蛋白発現度とその分布を調べ、予後・再発形式との相関性を解析した。

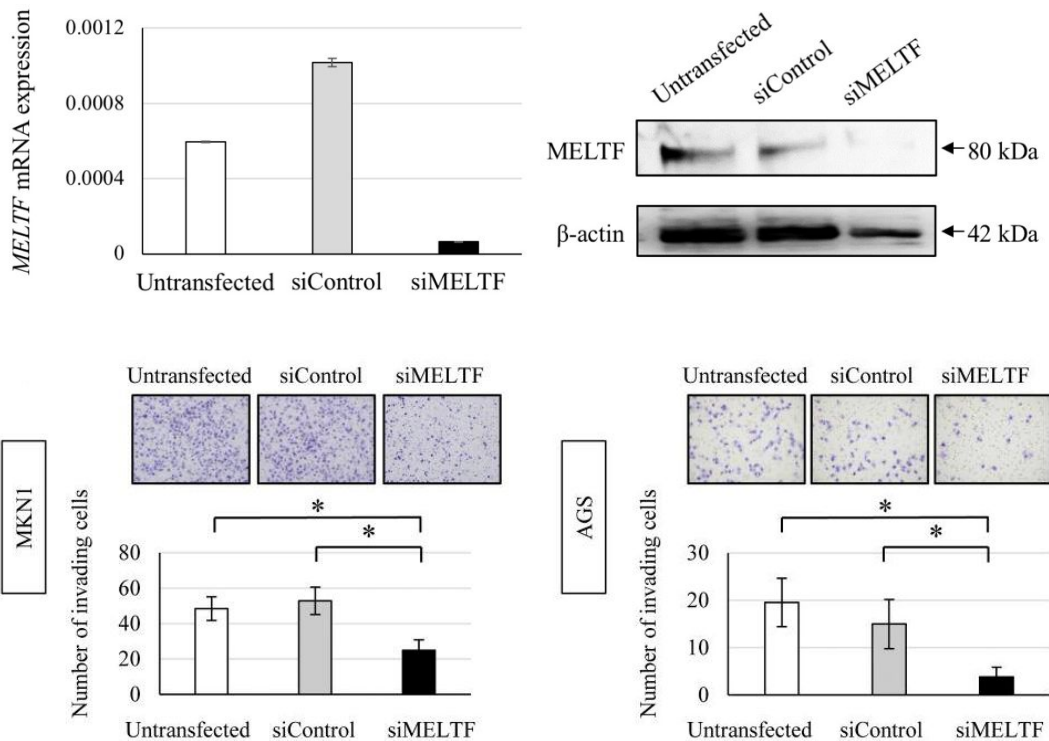


- (5) ELISA 法による血清中 MELTF 値の測定；血清検体を用いて、ELISA 法によって血清中 MELTF 値を定量的に測定した。血清中 MELTF レベルの臨床的意義、胃癌の腫瘍マーカーとしての有用性を検証した。胃切除症例の術前血清 MELTF レベルと再発予後との相関を調べた。

4. 研究成果

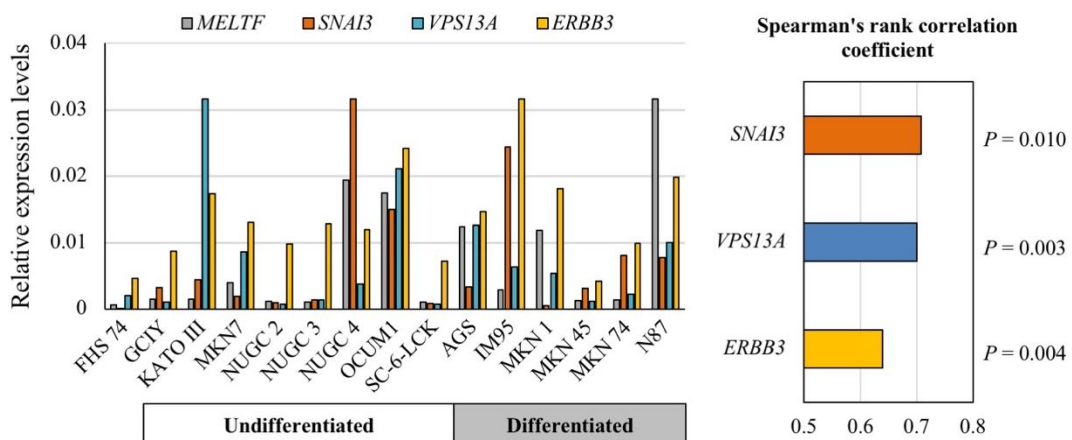
MELTF の機能解析

- (1) *in vitro* 実験；MELTF 高発現細胞株 MKN1、AGS を対象に、siRNA 法による MELTF のノックダウンを行い細胞機能を解析した。MELTF のノックダウンにより胃癌細胞株の増殖能、浸潤能、接着能が有意に阻害され、またアポトーシス細胞比率が増加することが明らかとなった。



- (2) *in vivo* 実験；MELTF ノックダウン株と親株を用いてマウス皮下腫瘍モデルによる造腫瘍能を比較したところ、MELTF 阻害による造腫瘍能の低下が認められた。これら結果から、MELTF を阻害するコンセプトは、新たな胃癌分子標的治療に活用可能であることが示唆された。

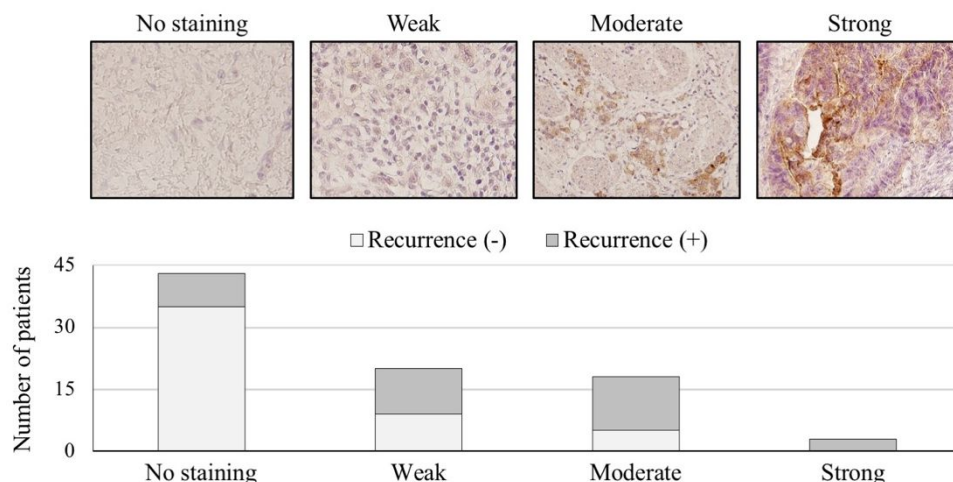
- (3) Pathway 解析；PCR array により 84 種の癌関連分子発現を網羅的に解析し、MELTF 発現との相関度を一括解析した。その結果、上皮間葉移行マーカーである VPS13A、SNAI3、ERBB3 と有意な正の相関を有することが明らかとなった。



MELTF に干渉する microRNA を新たに同定することを目的として microRNA array による網羅的解析を実施したが、有意な関連を示す microRNA は発見されなかった。

MELTF の発現解析

- (4) 免疫組織化学染色法；胃癌切除検体から得た切片を用いて腫瘍組織中の MELTF 蛋白発現度を免疫組織化学染色法で調べ、スコアリングした。MELTF 染色度は、根治切除術後の再発率と有意な相関を認めた。



- (5) ELISA 法による血清中 MELTF 値の測定；胃癌患者の治療前血清検体を用いて ELISA 法による血清中 MELTF 値測定を行い、その臨床的意義を調べた。血清中 MELTF 値は、胃癌の病期が進行するごとに増加し、MELTF 値高値群は有意に予後不良であった。これらから、MELTF 蛋白発現量測定は、組織中、血清中のいずれにおいても新しい胃癌進展度バイオマーカーとして有望であると考えられた。

本研究によりこれまでに報告のない MELTF の胃癌における機能が明らかとなり、この成果は現在の医療で重視される個別化治療の手段としての新規分子標的薬の開発につながる。MELTF は、現在汎用されている腫瘍マーカーである CAE、CA19-9 の欠点を克服する鋭敏な胃癌血清腫瘍マーカーとなり得る。血清検体は簡便かつ非侵襲的に採取可能であり、胃癌初期診断、再発診断および治療効果判定のためのスクリーニング法の対象として理想的である。検体採取に特殊な手技を必要とせず、広く一般に普及しうる手法であるため社会への貢献度も大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 SAWAKI KOICHI, KANDA MITSURO, UMEDA SHINICHI, MIWA TAKASHI, TANAKA CHIE, KOBAYASHI DAISUKE, HAYASHI MASAMICHI, YAMADA SUGURU, NAKAYAMA GORO, OMAE KENJI, KOIKE MASAHIKO, KODERA YASUHIRO	4. 巻 39
2. 論文標題 Level of Melanotransferrin in Tissue and Sera Serves as a Prognostic Marker of Gastric Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6125-6133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13820	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤木康一, 神田光郎, 田中千恵, 小林大介, 園原史訓, 服部憲史, 末永雅也, 高見秀樹, 林 真路, 山田 豪, 中山吾郎, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘
2. 発表標題 MELTFの胃癌における役割についての検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichi Sawaki, Mitsuro Kanda, Shinichi Umeda, Takashi Miwa, Chie Tanaka, Daisuke Kobayashi, Masamichi Hayashi, Suguru Yamada, Goro Nakayama, Masahiko Koike, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera
2. 発表標題 Melanotransferrin as a prognostic biomarker in gastric cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----