

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16374

研究課題名（和文）進行胃癌のDIC併発に関連する遺伝子発現異常の網羅的探索研究

研究課題名（英文）Exploring aberrant gene expression associated with DIC coexistence in advanced gastric cancer

研究代表者

大内 康太（Ouchi, Kota）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50781291

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、播種性血管内凝固症候群（disseminated intravascular coagulation: DIC）を合併した胃癌を対象として、臨床病理学的特徴の比較と網羅的な遺伝子発現状態に基づく解析を行った。その結果、骨転移を有しており、かつ初診時に血液検査で血液凝固に関連した値の異常を認める場合は、DIC併発の高リスクであることが明らかとなった。また、遺伝子発現状態に基づく解析結果から、DICを併発した胃癌は特に予後が不良である群と相対的に予後が良好である群の2群に分かれることが示され、各群で特徴的な遺伝子発現異常を標的とした治療戦略の樹立につなが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

本研究は、固形がん併発したDICについて、臨床病理学的特徴に加え、網羅的遺伝子発現データに基づく解析を行った研究である。DICを併発した胃癌症例が網羅的遺伝子発現プロファイルから大きく2つの群（D群およびN群）に分かれることはこれまで知られていない。これら2つの群では治療成績が有意に異なり、特にD群は予後不良であることが示唆されたことから、D群において発現状態が変化している遺伝子群を明らかにすることで、DIC発症に関連する遺伝子発現異常が明らかとなるとともに、治療抵抗性獲得に寄与する因子およびそれらの因子を標的とした新しい治療戦略の樹立につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, gastric cancer patients with disseminated intravascular coagulation (DIC) were analyzed based on comparison of clinicopathological features and comprehensive gene expression status. The results showed that patients with bone metastases and abnormal blood test results related to blood coagulation at the time of initial diagnosis were at high risk of developing DIC. Furthermore, the results of the gene expression analyses showed that gastric cancer patients with DIC were divided into two groups, one with a particularly poor prognosis and the other with a relatively good prognosis, suggesting the possibility of establishing treatment strategies targeting gene expression abnormalities characteristic of each group.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：DIC 胃癌 遺伝子発現 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は、近年年齢調整罹患率および年齢調整死亡率が改善傾向にある癌の一つであるが、2015年の時点でも依然として死亡者数は男性で第2位、女性で第3位に位置する癌であり、治療成績のさらなる向上が望まれている。

骨転移をきたした悪性腫瘍において、腫瘍細胞が結節形成性に乏しく、全身の骨髄へびまん性に転移をきたす病態は播種性骨髄癌症と呼ばれ、播種性骨髄癌症を最も来しやすい癌腫として胃癌が挙げられている(林英夫: 癌の臨床 25: 329-343, 1979)。播種性骨髄癌症はまた、播種性血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation: DIC)を高頻度に合併することが知られており、実際にDICを生じやすい主要基礎疾患の一つに胃癌が挙げられている(厚生省特定疾患血液系疾患調査研究班血液凝固異常症分科会, 平成10年度 研究事業報告書 1999)。DICは、基礎疾患の存在下に全身性持続性の著しい凝固活性化をきたし、細小血管内に微小血栓が多発する病態と定義される(Levi M et al.: N Engl J Med 341: 586-592, 1999)。DICの基礎疾患として胃癌を含む固形癌は感染症および造血管腫瘍と並んで重要であり、固形癌にDICが合併した場合の予後は極めて不良である(Ambrus JL: J Med 6: 61-64, 1975)。一方で、我々が行ったDICを併発した固形癌患者の治療成績に関する後方視的研究においては、DIC発症後の化学療法施行の有無が独立した予後規定因子であることが示された(Ouchi K: International journal of clinical oncology 23(4) 790-798, 2019)。

上記背景から、進行胃癌においてはDICの併発によって急速な転帰を辿る症例が少なくないが、DICの早期診断によって全身状態が保たれているうちに化学療法の実施につなげることで、このような症例群の予後を延長できる可能性がある。従って、DIC併発リスクの高い胃癌患者においては、血液凝固関連の検査を定期的に行い、DIC併発の早期診断・早期治療が肝要となる。低分化型・印環型の胃癌は播種性骨髄癌症の発症リスクが高いとされている。しかし、実際にDICを併発した胃癌患者における臨床病理学的背景を検討した報告では、60%以上が中分化型もしくは高分化型に分類されるintestinal typeの症例であり、組織型は決定的なリスク因子とはいえず(Jiyoung R: Journal of Gastroenterology and Hepatology 25: 1537-1542, 2010)現状ではDIC発症リスクが高い胃癌患者を事前に同定することは困難である。

2. 研究の目的

本研究は、DICを併発した進行胃癌症例とDICを併発しなかった進行胃癌症例における網羅的遺伝子発現状態を比較解析することで、DIC併発に関わる遺伝子発現異常を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胃癌におけるDIC併発に関連する遺伝子発現異常の探索

進行再発胃癌症例において、臨床経過の中でDICを併発した群(約15例)と併発しなかった群(約15例)とをそれぞれ後ろ向きに収集する。

各症例のFFPEサンプルよりRNAを抽出し、マイクロアレイ(Whole Human Genome Oligo Microarray kit: Agilent Technologies社)を用いて網羅的遺伝子発現データを取得する。2群間で発現状態が有意に異なる遺伝子群を抽出することで、DIC併発に関連する遺伝子異常の候補を同定する。

(2) 胃癌にDICが併発する分子生物学的機序の解明

Aで抽出された遺伝子異常についてパスウェイ解析を行い、胃癌にDICが併発する分子生物学的機序を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 解析対象症例の絞り込み

実臨床において固形がん併発したDICは、腫瘍の進行に起因する場合と感染症に起因する場合とが混在している。本研究は胃癌に起因するDIC併発に関わる因子を探索するものことから、DIC併発群に含める条件として、DIC発症の要因が原病(腫瘍)の進行によるものと考えられる症例(感染症が否定されている症例)に限定した。その結果、DIC併発症例13例、DIC非併発症例12例が対象となった。

(2) DIC併発症例とDIC非併発症例との患者背景の比較

DIC併発に寄与する臨床病理学的特徴を探索するため、DIC併発群(13例)とDIC非併発群(12例)とで患者背景を比較した(表1)。その結果、原発部位、骨転移の有無および初診時の凝固関連検査で有意差を認めた。具体的にはDIC併発群では前庭部および胃体部を原発巣とする症例の割合が高く、既報と一致して骨転移を有する症例および初診時に凝固関連検査地の異常を伴う症例ではDIC併発に特に注意が必要であることが示唆された。

表 1 .DIC 併発の有無に基づく患者背景の比較

背景因子	DIC非併発群		DIC併発群		P値
	人数	%	人数	%	
症例数	12	100.0	13	100.0	
性別					1.00
男性	10	83.3	11	84.6	
女性	2	16.7	2	15.4	
年齢(中央値)	65.5 (39-77)		59 (30-81)		0.38
組織型					0.23
腸型	6	50.0	3	23.1	
びまん型	6	50.0	10	76.9	
原発部位					0.01
噴門部	4	33.3	0	0.0	
前庭部	0	0.0	4	30.8	
胃体部	6	50.0	8	61.5	
幽門部	2	16.7	1	7.7	
HER2					0.58
陽性	1	8.3	2	15.4	
陰性	11	91.7	11	84.6	

背景因子	DIC非併発群		DIC併発群		P値
	人数	%	人数	%	
腹膜播種					0.24
有	7	58.3	4	30.8	
無	5	41.7	9	69.2	
肝転移					0.67
有	5	41.7	4	30.8	
無	7	58.3	9	69.2	
肺転移					0.59
有	2	16.7	1	7.7	
無	10	83.3	12	92.3	
骨転移					<0.01
有	12	100.0	8	61.5	
無	0	0.0	5	38.5	
初診時PT-INR	1.02 (0.91-1.06)		1.11 (0.97-1.85)		<0.01
初診時D-dimer	1.1 (0.5-2.7)		19.9 (4.9-200.7)		<0.01
初診時FDP	3.2 (0.7-5.3)		46.6 (2.3-459.5)		<0.01
初診時FBG	298.5 (182-383)		202 (50-366)		0.04
初診時Plt	111 (3.4-344)		235 (126-432)		<0.01

(2) DIC 併発群と DIC 非併発群とで有意に発現状態が異なる遺伝子の探索

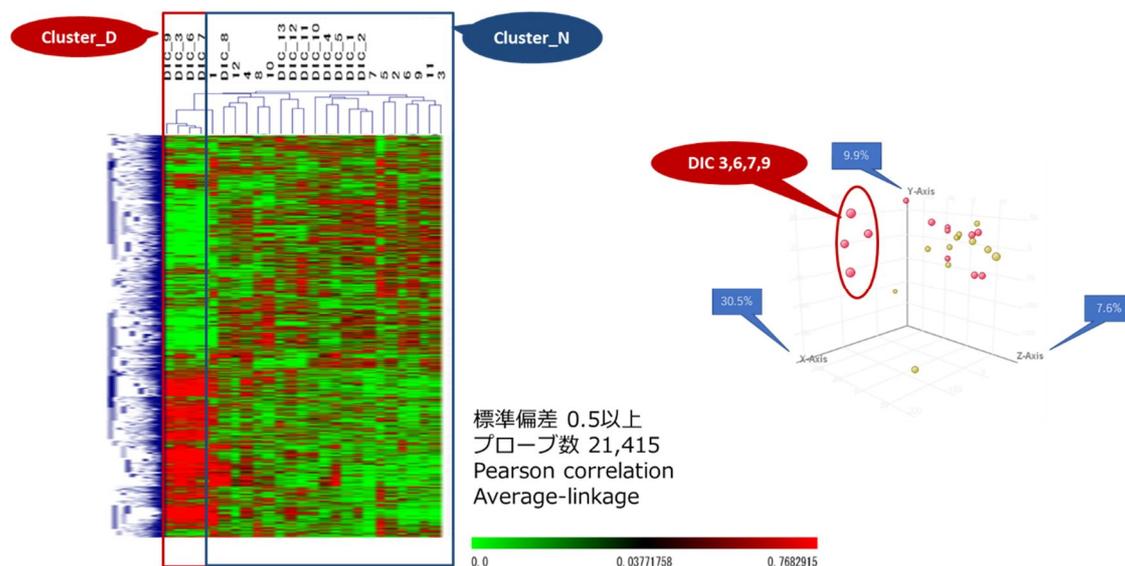
解析対象となった合計 25 例について、マイクロアレイ(Whole Human Genome Oligo Microarray kit: Agilent Technologies 社)を用いて網羅的遺伝子発現データを取得した。

DIC を併発した群 13 例と DIC を併発しなかった群 12 例との間で有意に発現状態が異なる遺伝子群を探索した。発現データが取得可能であったプローブは合計 41,093 個であり、シグナル値が低いプローブは解析対象から除外した結果、29,423 個のプローブが解析対象となった。これらのプローブについて 2 群間の有意差の検定 (Mann-Whitney unpaired) を行い、多重性の検定 (Benjamini-Hochberg 法) および有意基準 (補正 p 値 <0.05) でフィルタリングを行った結果、2 群間で有意差のある遺伝子は抽出されなかった。

(3) 網羅的遺伝子発現データに基づく教師無しクラスタリング解析

網羅的遺伝子発現データを取得した合計 25 例全体で教師無しクラスタリング解析を行った結果、DIC 併発ありの症例は、大きく分けて 2 群に分かれることが明らかとなった。1 群は遺伝子発現の変動が非常に大きい特徴的な発現パターンを呈しており (Cluster_D; D 群) もう 1 群は DIC 併発なしの症例に類似した発現パターンを示した (Cluster_N; N 群) (図 1)。

図 1. 解析対象群全体での教師無しクラスタ解析および主成分分析の結果



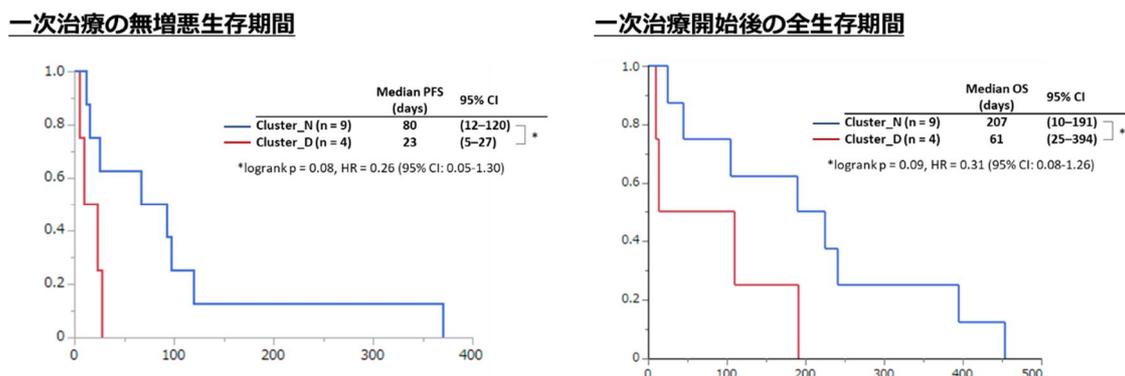
上記結果より、(2)で行った解析のように DIC 併発ありの症例をひとくくりにして解析すると、発現パターンの異なる 2 群が混在するため、DIC 併発症例ありの群を特徴づける遺伝子が抽出できなかった可能性が考えられた。

(4) DIC 併発症例で遺伝子発現状態が異なる 2 群間での患者背景および臨床経過の比較

2 群間 (D 群 vs. N 群) で DIC を併発した症例の患者背景を比較したが、組織型、HER2 ステータスや骨転移の有無、診断時の血液凝固関連検査の異常の有無に有意な差は認められなかった。

一方で、DIC を併発した症例の一次治療における無増悪生存期間および一次治療開始後の全生存期間を比較した結果、D 群で有意に短縮しており、D 群に含まれる症例はより悪性度の高い症例群である可能性が示唆された（図 2）。

図 2. DIC を併発した症例における治療成績の比較（D 群 vs. N 群）



(5) 2 群間（D 群 vs. N 群）で有意に発現状態が異なる遺伝子群の探索

DIC を併発した症例において、特に遺伝子発現の変動が大きい群（D 群）における遺伝子発現プロファイルの特徴を明らかにするため、2 群間（D 群 vs. N 群）で有意に発現状態が異なる遺伝子群を探索した。（3）において解析対象となった 29,423 個のプロープについて、2 群間の有意差の検定（Mann-Whitney unpaired）を行い、多重性の検定（Benjamini-Hochberg 法）および有意基準（補正 p 値 <0.02）、Fold Change 閾値（> log₂|2|）でフィルタリングを行った結果、2 群間で有意に発現シグナル値が異なるプロープとして 3,823 プロープが抽出された。

上記で抽出されたプロープの内、N 群に比べて D 群で遺伝子発現が上昇していたプロープ（1,869 プロープ）について Functional annotation tool（DAVID：<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>）で解析を行った結果、Cellular Component として外分泌関連および細胞膜関連の遺伝子群が最も有意に集積しており、Molecular Function では Receptor 関連の遺伝子群が最も有意に集積していた。同プロープについて Gene Ontology 解析を行った結果、G 蛋白質共役型受容体活性に関連する遺伝子群とあわせてホルモン活性や神経伝達に関連する遺伝子群の発現上昇を認めた。

以上の結果から、DIC を併発した症例において、特に遺伝子発現の変動が大きい群（D 群）は腫瘍の微小環境における変化によって特徴づけられる可能性が示唆された。

本研究は、固形がんに伴発した DIC について、臨床病理学的特徴に加え、網羅的遺伝子発現データに基づく解析を行った研究である。本研究で明らかとなった DIC を併発した症例群の臨床病理学的特徴は概ね既報と一致するものであったが、DIC を併発した胃癌症例が網羅的遺伝子発現プロファイルから大きく 2 つの群（D 群および N 群）に分かれることはこれまで知られていない。これら 2 つの群では治療成績（無増悪生存期間および全生存期間）が有意に異なり、特に D 群は予後不良であることが示唆されたことから、D 群において発現状態が変化している遺伝子群を明らかにすることで、DIC 発症に関連する遺伝子発現異常が明らかとなるとともに、治療抵抗性獲得に寄与する因子およびそれらの因子を標的とした新しい治療戦略の樹立につながる可能性がある。

現在本研究で得られた知見をまとめた英論文を作成中であり、国際学術誌へ投稿予定である。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------