

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16959

研究課題名（和文）レーザーマイクロダイセクションを用いた早期胃癌の浸潤に関わる特異的遺伝子の探索

研究課題名（英文）Search for specific genes involved in invasion of early gastric cancer using laser microdissection

研究代表者

谷内田 達夫（YACHIDA, TATSUO）

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50568847

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）：レーザーマイクロダイセクションを用いて、早期胃癌の浸潤に関わる特異的遺伝子の探索を行う研究を実施した。現在のところ、検体を集積し、腫瘍腺管ごとをレーザーマイクロダイセクションを抽出し、遺伝子解析を行っている。検体（症例）がまだ十分集積できておらず、有意な浸潤に関わる遺伝子の解析、同定に至っていない。今後さらに症例を蓄積し、研究を継続的に進め、浸潤に関わる遺伝子の同定を目指す予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに、ESDにて治療された浸潤度別の早期胃癌のESD腫瘍組織検体で、症例を5例集積しており、目標の10例の収集まで到達できていないが、ESD適応病変の多くは、粘膜内癌であり、粘膜下層に浸潤した病変の検体をまだ十分に採取できていない。今後、さらに症例を蓄積し、粘膜下層浸潤に関わる遺伝子を同定していく予定である。同定できれば、検査の生検診断で、粘膜下層浸潤が予想できるようになり、ESD治療後の追加外科治療を要するかどうかを選択する1つの指針になることを研究目標にしている。

研究成果の概要（英文）：A study was conducted to search for specific genes involved in the invasion of early gastric cancer using laser microdissection. At present, specimens are being collected, laser microdissection is being performed on each tumor gland duct, and genetic analysis is being performed. We have not yet been able to analyze and identify genes involved in significant invasion due to insufficient specimens (cases). We plan to accumulate more cases and continue our research to identify genes involved in invasion.

研究分野：早期胃癌

キーワード：レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法 早期胃癌 ESD

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトゲノム解析の成果により、多くの蛋白コード遺伝子の機能が解明されているが、その中でも、特に目覚ましいのが次世代シーケンサ技術による全エクソン解析を中心とした腫瘍ゲノムの研究である。腫瘍の発生、進展は、ゲノム異常の蓄積であり、ゲノム不安定性によってその集団は均一な集団から複雑で多様ないわゆる Heterogeneity な集団に変化する。ゲノム DNA の変異は癌の浸潤や転移にも関与している可能性があるとの報告があり、その部位別、ステージ別にゲノム DNA の変異の蓄積がみられると考えられる。しかしながら、正常な組織の癌化、および上皮内癌のような非浸潤癌が浸潤癌に進展する初期段階における遺伝子異常、ドライバー遺伝子は、未だ不明な点が多い。近年では、早期消化管癌に対し低侵襲性でかつ大きな病変の一括切除が可能な内視鏡的粘膜下層剥離術 (Endoscopic submucosal dissection: ESD) が本邦発信により標準的手技となってきた。一方、早期胃癌粘膜下層深部浸潤癌 (SM2) のリンパ節転移率は、約 20% 前後とされ、追加外科手術の対象となる。ESD 切除組織におけるリンパ管侵襲陽性例や深達度が、再発転移、ひいては予後を規定する因子として high volume の臨床データから示されているものの、詳細な分子生物学的メカニズムについては明らかでない。悪性腫瘍の診断に染色体の欠失や特定の遺伝子異常所見を用いる際は正確に腫瘍細胞のみを解析することが重要である。つまり悪性度の指標を正確に求めるのであれば、解析したい部位に存在する腫瘍細胞を正しく採取して、その遺伝子異常を解析することが求められている。近年 LCM 法の技術が実用化され、より精度の高いサンプル採取が可能になっている。これまで進行胃癌における LCM 法を用いて採取した癌部、非癌部において標的遺伝子を、リアルタイム PCR 法を用いた比較検討はなされているが、早期胃癌の ESD 検体を用いて、SM 浸潤部と非癌部を LCM 法を用いて採取し、DNA を抽出し次世代シーケンサで解析した報告例は極めて少ない。早期胃癌症例で蓄積ができ予測効率の上昇が得られれば、生検材料での深達度診断やリンパ節転移予測も可能となり、さらにいえば血液や胃液にて強力な診断ツールとなり、liquid biopsy として大いに期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は LCM 法を用いて早期胃癌の粘膜内癌部、SM 浸潤部と非癌部を組織採取し(図 1)、より精度の高い DNA を抽出し、次世代シーケンサで Cancer Hotspot Panel を用い、KRAS、BRAF、EGFR、TP53 など 50 種のがん遺伝子、がん抑制遺伝子のホットスポット約 2800 の変異をカバーしており浸潤部での特徴的な遺伝子変異の同定し、診断マーカー、予後判定としての有用性や治療分子としての可能性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

研究は、おおよそ 5 段階からなる。

ESD 組織サンプルの収集は、それぞれ、当課題の研究者の総合内科教室の谷内田(研究責任者)が行なう。検体ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルを用いるため、これまでに研究に同意得られた過去の検体、およびこれから治療において得られた検体を用いる。

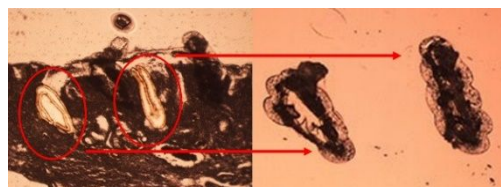
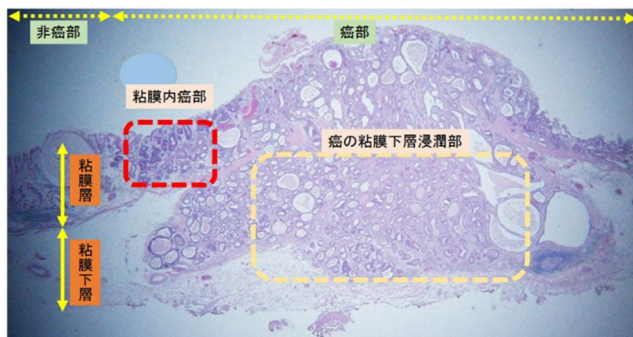
そのサンプルを使用し専用のスライドガラスに包埋する。

LCM 法を用いて、切片内の非癌部、粘膜内癌部、下層深部浸潤部の各々からゲノム DNA を抽出する。

ゲノム DNA は、次世代シーケンサを用いて、全エクソン解析を行い、浸潤度別の組織内における遺伝子配列を網羅的に解析する。

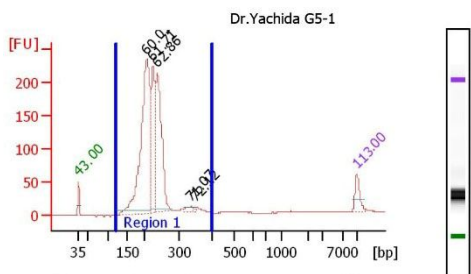
ゲノム解析結果を患者の ESD 後病理結果および臨床像と照合しながら、癌発生に関する遺伝子変異と粘膜下層浸潤に関連する遺伝子変異を同定する。

4. 研究成果



上記は胃癌のレーザーマイクロダイセクション法により DNA 抽出した際の画像である。粘膜内癌部と粘膜下層浸潤部から癌腺管を選択し、レーザーマイクロダイセクションで抽出した。

Electropherogram Summary



Peak table for sample 1 : Dr.Yachida G5-1

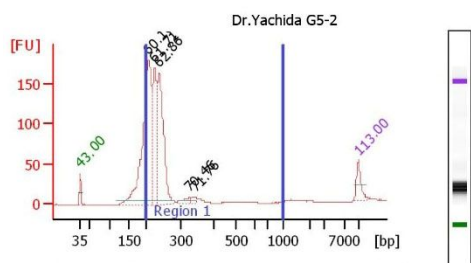
Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	205	1,971.88	14,558.3	
3	224	792.56	5,352.1	
4	237	996.40	6,361.3	
5	332	34.22	156.0	
6	345	9.72	42.7	
7	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

Overall Results for sample 1 : Dr.Yachida G5-1

Number of peaks found: 5
 Noise: 0.2
 Corr. Area 1: 2,163.9

Region table for sample 1 : Dr.Yachida G5-1

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l or μmol/l]	C
120	400	2,163.9	93	225	16.4	4,052.5	28,118.3	■
		9			2			



Peak table for sample 2 : Dr.Yachida G5-2

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	206	1,818.15	13,360.6	
3	224	680.52	4,596.9	
4	237	965.98	6,167.3	
5	325	50.86	237.2	
6	341	28.48	126.6	
7	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

Overall Results for sample 2 : Dr.Yachida G5-2

Number of peaks found: 5
 Noise: 0.4
 Corr. Area 1: 1,292.3

Region table for sample 2 : Dr.Yachida G5-2

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l or μmol/l]	C
200	1,000	1,292.3	75	243	29.0	2,854.3	18,634.3	■
		3			9			

上記は、実際の検体からレーザーマイクロダイセクション法により DNA 抽出した結果を示している。

今後、同様な解析を進めていく予定である。

本研究を通して得られる胃癌の初期段階における浸潤・増殖に関わる遺伝子の同定が、ESD 治療後の追加外科治療を要するかどうかを選択する 1 つの指針にもなりうるだろう。

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