

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17642

研究課題名（和文）胃印環細胞癌からアプローチする胃癌組織不均一性に関する研究

研究課題名（英文）Study of gastric cancer tissue heterogeneity approached from gastric signet-ring cell carcinoma

研究代表者

齊藤 亮（Saito, Ryo）

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：40866604

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）：本研究では、早期印環細胞癌に特徴的な性質を付与するマイクロRNA発現とその作用メカニズムの解明を行った。胃印環細胞癌患者、特に早期印環細胞癌患者においてmiR-99a-5pの高値が観察されたことを報告した。また、miR-99a-5pの発現は、細胞増殖と関連していることが判明した。したがって、miR-99a-5pは、早期印環細胞癌やリンパ節転移、あるいはそれに関連する患者の予後不良を診断するバイオマーカーとして有用である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期印環細胞癌に得意的に高発現するマイクロRNAを同定した。遺伝子操作でこれを高発現させると癌の悪性度が低下することが明らかとなった。今後、癌の悪性獲得メカニズムの解明や、治療への応用の可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the microRNA expression that confers characteristic properties to early-stage signet-ring cell carcinoma and its mechanism of action. We reported that high expression of miR-99a-5p were observed in patients with gastric signet-ring cell carcinoma, especially in patients with early-stage. We also found that miR-99a-5p expression was associated with cancer cell proliferation. Therefore, miR-99a-5p may be useful as a biomarker to diagnose early-stage signet-ring cell carcinoma, lymph node metastasis, or associated poor prognosis in patients.

研究分野：胃癌

キーワード：胃印環細胞癌 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

近年の癌遺伝子研究の成果により、同一組織内でも異なる遺伝子異常を有する部位が混在する、いわゆる組織不均一性が注目されている。組織不均一性は特に分子標的薬などの化学療法への抵抗性の一因となっており、実際に組織不均一性が高い胃癌では、大腸癌や肺癌に比べ化学療法の奏効率が低い。また早期胃癌においても、2015年にAsakawaら(World J Gastroenterol.)が、2019年にSeo HSら(J Surg Res.)が、組織内不均一性を持つ腫瘍では深部浸潤や脈管侵襲が高度であるなど、それ自体が高悪性度と相関すると報告している。そこで今回明らかにしたい問いは、

「胃癌はなぜ大腸癌や肺癌に比べて組織不均一性が高いのか？」である。

現在までに癌に関する micro-RNA(miRNA)研究が世界中で行われ(Lujambio A et al. 2012 Nature)、申請者の研究室(Maruyama S et al. 2019 Oncol Rep)および本研究指導者の前所属研究室(Ichikawa D et al. 2012 Gastroenterology)でも癌における miRNA をテーマに研究報告を行ってきた。miRNA はその安定性から、特に末梢血中におけるバイオマーカーとしての役割が期待されているが、保存検体中でも安定に存在し、回顧的に研究する題材として優れている。もちろん、組織における検討が末梢血などにおけるバイオマーカー研究に発展する可能性が高いなど、基礎研究分野のみならず将来的な臨床応用性も高い媒体である。そこで今回は miRNA を題材とし、組織不均一性の評価を試みる。

組織不均一性は癌進化の過程で獲得されると考えられている(Burrell RA et al. 2013 Nature)。一方、胃癌における癌進化に関して、ゲノム DNA の網羅的解析手法による細胞系譜の一連の研究(Peng D-F, Sugihara H et al. 2003 J Pathol, Peng D-F, Sugihara H et al. 2004 J Pathol.)では、印環細胞癌(sig)からスキルス胃癌や進行胃癌に進化する可能性について言及されている。このように、印環細胞癌がもつ臨床病理学的特異性、さらにはそれらを導く分子病理学的特徴の解析の中に、組織不均一性や癌進化、癌細胞の悪性度獲得における重要な鍵が隠されている可能性が高い。

組織不均一性に関する検討に先立ち、当科における胃癌手術症例の臨床病理学的特徴を病理組織型ごとに解析した。その結果、一般に予後不良とされる未分化癌の中でも、印環細胞癌は低分化腺癌(por)と比べて有意に予後が良好であった。さらに印環細胞癌では有意に早期癌(T1)が多かったが(77.8% vs 37.8%)、進行癌では筋層や漿膜下層にとどまる症例は少なく、進行印環細胞癌の78.6%が漿膜外浸潤を認めていた。このような印環細胞癌の分子病理学的特異性と、過去の研究報告より、1つの仮説を立てた。それは、

『印環細胞癌はもともと深部浸潤能が乏しい低悪性度の癌であり、遺伝子変異獲得により深部浸潤能が増強し高悪性度胃癌となる』

である。この仮説の証明を軸に、本研究をデザインした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、印環細胞癌の分子病理学的解析から、胃癌の組織不均一性と悪性度獲得の機構を解明することである。組織不均一性の評価としてまず、同一組織内での印環細胞癌部分と、典型的胃癌組織として中分化管状腺癌部分の miRNA 発現を比較検討した。従来のバイオマーカー研究は癌と非癌部の比較にて行われ、すなわち癌か否かがテーマであった。本研究の独自性の高い部分として、本研究では個体間や腫瘍間の生理的変動の影響を排除し、純粋に組織不均一性および印環細胞癌の分子病理学的特異性にフォーカスを当てた解析を試みた。つまり、「癌か否か」という従来のバイオマーカー研究としてのテーマから、「どのような癌か」という次のステップに踏み込んだ研究である。そして、ここで明らかになった特異的 miRNA 発現をもとに、上記仮説の証明を進めていく。組織不均一性を形成する分子基盤が明らかになることは、その根本にある癌進化過程の解明といった学術的創造性のみならず、これを治療ターゲットとした新規治療法の開発など、臨床的創造性の高い研究と位置付けられる。

3. 研究の方法

上記のように、印環細胞癌と中分化管状腺癌における miRNA 発現の比較をアレイ解析にて行った結果、それぞれの領域で特異的に発現が上昇もしくは低下している miRNA が存在することが明らかになった。これらが印環細胞癌の分子病理学的特異性を形成していると考え、引き続き以下の各項目について明らかにしていく。

(令和2年度の研究計画)

令和2年度にはアレイ解析の結果を受けて、胃癌組織型ごとの miRNA 発現量の評価を実際の胃癌保存検体を用いて行い、さらに臨床データと細胞株を用いてその機能解析を行う。

1. 臨床検体での Validation

当科における手術症例より、印環細胞癌および中分化管状腺癌の症例を選出し、保存済みのホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ブロックを準備する。FFPE の薄切は miRNA 抽出用に 8 μ m 程度の厚切りとし、RNase free の環境で分解に注意しながら、HE 染色標本を参考にして典型的組織型部分を macro dissection 法にてメスで削り出し、miRNA の抽出を行う。ここから cDNA を作成し、定量 PCR 法にて発現量を測定する。miRNA の抽出と cDNA の作成は市販の Kit (後述) を用いて手法的に行う。PCR 結果の評価は、コントロールとして RNU6B を用いた Ct 法にて行う。miRNA 発現量の評価は、比較のため低分化腺癌や高分化管状腺癌でも行うが、特に印環細胞癌と中分化管状腺癌については早期癌および進行癌症例それぞれで比較検討することにより、同一組織型でも進行度における差にも注目したい。この結果、印環細胞癌において有意に発現が上昇もしくは低下している miRNA を明らかにする。

2. miRNA 作用の解明

同定した miRNA 発現の意義の検討を、まず臨床病理学的データとの対比にて行う。特に解析したい点は、深達度、リンパ節転移の程度、脈管浸潤の程度、そして再発の有無などの長期予後である。これらにより、その miRNA が胃癌においても臨床的意義を明らかにする。

3. 細胞株を用いた検討

胃癌細胞株を用いて、2 で予測された miRNA 作用を検証する。特に仮説の証明のため、増殖能と浸潤能への作用を明らかにする。具体的には sig 由来の細胞株である KATO-III や NUGC-4 を用いて、1 で明らかにした miRNA を強発現もしくは発現を抑制し、増殖能や浸潤能の変化を観察する。細胞株は JCRB 細胞バンクより購入し、miRNA の強発現と抑制は mirVana miRNA mimic および inhibitor (Life Technologies 社) を用いて行う。増殖能評価は CCK-8 (DOJINDO 社) を用いた吸光度アッセイにて、浸潤能評価は BD Biocoat マトリゲルインベーションチャンバー (BD Biosciences 社) を用いた浸潤アッセイにて評価を行う。

(令和3年度以降)

令和3年度以降は、薬剤感受性評価、組織不均一性との関連、miRNA のターゲット遺伝子の検索、さらに治療ターゲットとしての有用性の検討を、実験動物も用いて行う。

4. 薬剤感受性評価

miRNA 発現と薬剤感受性の関連を、細胞株を用いて評価する。mimic で過剰発現もしくは inhibitor で発現抑制させた細胞株における 5-FU やシスプラチンに対する感受性を評価する。一定時間薬剤と接触させた癌細胞の増殖能にて評価を行う (前述 CCK-8 を用いる)。

5. 組織不均一性評価

miRNA と組織不均一性の関連を評価する。マウスを用い、純粋な細胞株の移植と、miRNA 発現を操作した細胞株の移植を行い、増殖腫瘍組織の不均一性を観察する。癌細胞移植は簡便性から皮下移植を予定している。

6. ターゲット遺伝子の検索

同定した miRNA に関して、ターゲット遺伝子の検索を行う。具体的には、mimic や inhibitor 導入による mRNA 発現の変化を、アレイ解析により明らかにする。miR ベースなどの解析ソフトを参考にし、ターゲット遺伝子の絞り込みを行う。実際にウェスタンブロット法によるタンパク発現の評価を行い、仮説を証明する。

7. バイオマーカーとしての意義の検討

当科のプロジェクトにて保存している末梢血血漿サンプルを用い、これらの miRNA の発現量を PCR 法 (cel-mir-39 をコントロールとして用いる) にて定量し、バイオマーカーとしての有用性を検討する。初発時および再発時マーカー、組織不均一性や抗癌剤感受性などのマーカーとしての有用性を、臨床データとの対比にて評価する。

8. 治療ターゲットとしての意義の検討

最終的には治療ターゲットとしての有用性を検討する。具体的には、当該 miRNA や遺伝子を抑制または過剰発現させた細胞をマウスに移植し、その動態を観察する。また、癌モデルマウスに miRNA を導入もしくは inhibit することによる変動を観察する。以上の研究により、印環細胞癌の分子病理学的特異性の機構を解明し、組織不均一性や悪性度獲得の機序を明らかにする。そして、新規治療ターゲットを開発することを目標とする。

4 . 研究成果

本研究では、早期印環細胞癌に特徴的な性質を付与するマイクロ RNA 発現とその作用メカニズムの解明を行った。

胃印環細胞癌患者、特に早期印環細胞癌患者において miR-99a-5p の高値が観察されたことを報告した。また、miR-99a-5p の発現は、細胞増殖と関連していることが判明した。したがって、miR-99a-5p は、早期印環細胞癌やリンパ節転移、あるいはそれに関連する患者の予後不良を診断するバイオマーカーとして有用である可能性がある。

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 1件）

1. 著者名 Saito Ryo, Maruyama Suguru, Kawaguchi Yoshihiko, Akaike Hidenori, Shimizu Hiroki, Furuya Shinji, Kawaida Hiromichi, Ichikawa Daisuke	4. 巻 250
2. 論文標題 miR-99a-5p as Possible Diagnostic and Prognostic Marker in Patients With Gastric Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 193 ~ 199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2020.01.004	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 -

〔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
---------	---------