

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591472

研究課題名（和文）胃癌における転移予測マーカーの開発

研究課題名（英文）Development of predictive markers for metastasis in gastric cancer

研究代表者

寺島 雅典（TERASHIMA MASANORI）

静岡県立静岡がんセンター（研究所）・胃外科・部長

研究者番号：40197794

研究成果の概要（和文）：

胃癌高転移細胞株から得られたスプライシングバリエーションによる胃癌転移予測マーカーの確立に関して検討した。94例の胃癌患者から術前末梢血を採取、ARHGDIBsv1、ALDOG4b、XAF1sv3の発現量を測定し、臨床病理学的因子との関連について解析した。ARHGDIBsv2は進行癌で高発現し、XAF1sv3は未分化型癌で高発現する傾向を認めたが、転移との間には有意な関連は認められなかった。新規マーカーとして、胃癌高転移細胞株で分泌型のプロテインアイソフォームである Quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 の発現増強を認めた。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the possibility to establish predictive markers for gastric cancer metastasis using splicing variant developed from highly metastatic gastric cancer cell lines. Peripheral blood was corrected from 94 patient with gastric cancer and expression of ARHGDIBsv1, ALDOG4b, XAF1sv3 were measured. Expression level of each variant was compared with clinicopathologic factors. ARHGDIBsv1 expression was up regulated in advanced cancer, and XAF1sv3 expression was up regulated in patients with undifferentiated type of cancer. However, there was no significant correlation between gene expression and tumor metastasis. With respect to newly marker development, we found the up regulation of secretory protein isoform Quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 in highly metastatic gastric cancer cell lines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：癌、遺伝子、腫瘍マーカー、微小転移

1. 研究開始当初の背景

手術術式や周術期管理の工夫、術後補助化

学療法の開発などにより進行胃癌における術後生存率の向上が得られているものの、未

だ III 期の胃癌の 5 年生存率は 50% 程度に過ぎない。進行胃癌の治療成績を更に向上させるには、高感度で特異性の高い再発予測法の開発が必須である。

近年、癌患者の血液中に存在する遊離癌細胞 (circulating tumor cells; CTCs) が多くの癌種で検出されるようになり、予後や治療効果と相関する事が報告されている。しかし、CTCs の生物学的意義に関しては未だ不明な点が多く、CTCs の数 (量) が重要なのか、実際に転移をする形質が重要なのかは解明されていない (Riethdorf S. et al, *Int J Cancer*. 2008, 123: 1991-2006, Alix-Panabières C. et al., *Clin Cancer Res*. 2008, 14: 5013-21.)

一方、進行胃癌の再発形式として最も頻度が高いのは腹膜播種再発である。腹膜播種の予測法として、腹腔内の disseminated tumor cells (DTCs) を検出する手法として腹腔洗浄液の細胞診が用いられているが、特異度は高いものの感度は極めて低率であり、細胞診陰性であっても多くの症例で腹膜再発が認められる。より高感度に DTCs を検出する方法として、免疫細胞染色や標的遺伝子に対する RT-PCR が用いられている。我々も以前からこの方法について検討してきたが、確かに感度は上昇するものの、CTCs と同様に生物学的意義や偽陽性の問題は回避できていない (Oyama K., Terashima M, et al, *Br J Surg*. 2004, 91: 435-43)。

我々は、ヒト胃癌細胞株 MKN45 およびその腹膜播種の亢進した MKN45 p 8 GA、MKN45P14GA を用いて、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの比較解析から、腹膜播種能亢進株において発現が増加している特徴的な遺伝子型 (スプライシングバリエーション) を 6 種同定した。これら 6 種の遺伝子 (GCA sv2/3, GCB sv3, GCC sv2, GCD sv3, GCE sv2, GCF sv4) (論文投稿中のため遺伝子名は非公開) は、細胞接着・免疫回避・恒常性維持・アポトーシス回避という 4 つの機能カテゴリーに分類することができ、またスクリーニングされた経緯から癌細胞の腹膜播種との関連が強く示唆される。MKN45 以外の癌細胞株での検討も行っており、特に免疫回避に関連すると考えられる GCE 遺伝子の新規スプライシングバリエーション GCE sv2 が、胃癌・大腸癌・膵癌・乳癌の 7 割以上の株での広汎な発現を示している。

選択的スプライシングは、一つの遺伝子情報からタンパク質へと至る多様性を拡大しており、異なるスプライシングパターンから成る mRNA からは、異なる機能を持ったタンパク質が翻訳される。特異なスプライシングパターンが、癌をはじめとした様々な疾患に関連するという知見が蓄積されつつあり、臨床的にも重要なメカニズムとなっている。

これまでの腫瘍マーカーと比較して、スプライシングバリエーションを腫瘍マーカーとする利点は、腫瘍細胞に特異的に発現しているため特異度が高い事、遺伝子増幅技術である PCR により微少なマーカーであっても特異的に増幅することで検出可能となる点 (高感度化) が挙げられる。さらに増幅と検出がイコールであるため、迅速でかつ特異性が高い診断系の構築が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、上述の新規再発予測マーカー候補遺伝子の検出を CTCs (末梢血)、DTCs (腹腔洗浄液) に対して行い、再発予測マーカーとしての有効性を評価する一方で、CTCs、DTCs の臨床的意義を量 (検出シグナル値)、質 (各腫瘍マーカーのプロファイル) という二つの側面から検討し、今後の臨床応用の可能性について検討する。また、新たな再発予測マーカーの候補遺伝子についても臨床検体を用いて探索的に検討する。

3. 研究の方法

1. 検体の採取

胃癌切除症例 94 例を対象とし、入院時に末梢血を採取する。同様に、手術時に開腹直後に腹腔洗浄液を採取する。

2. 末梢血・腹腔洗浄液からの CTCs、DTCs の分離

1) ポジティブセレクション

CellSave® Preservative Tube に採血した末梢血、腹腔洗浄液に対し、CD326 (EpCAM) マイクロビーズを用いて、試料中 CTCs、DTCs の磁気分離を行う。

2) ネガティブセレクション

CellSave® Preservative Tube に採取した末梢血、腹腔洗浄液に対し、CD45 マイクロビーズを用いて、試料中の白血球の磁気分離を行う。

3) 密度勾配遠心分離

パクスジーン RNA 採血管に採取した末梢血、腹腔洗浄液を、PBS/EDTA 緩衝液にて 1.7 倍に希釈した後、遠心分離によって細胞成分を分離する。

3. マーカー候補の定量的検出

上記条件で分離した細胞から total RNA を抽出し、これを元に cDNA 合成を行う。この cDNA の一部、20ng をテンプレート DNA とし、新規再発予測マーカー候補遺伝子の定量的検出をリアルタイム PCR 法に従って行う。

4. データの解析

上記検討で得られた各マーカー遺伝子の発現状況と各症例の臨床病理学的因子との相関解析を行い、マーカーとして臨床応用出来そうな遺伝子を抽出する。

5. 新規マーカーの検索

更に新規転移予測マーカーの開発を目的

として、胃癌高転移細胞株の細胞培養上清からマイクロアレイ法、マスマスペクトロメトリ法を用いて転移関連蛋白の分離同定を行う。

4. 研究成果

1) 検体の採取

はじめに胃癌患者 10 例を対象として、検体の採取可能性について検討した。末梢血検体から CTC の分離を試みるも、いずれの方法を用いても分離は不可能であったため、以下の研究では全血から RNA を抽出して検討する事とした。また、腹腔洗浄液からの CTC 分離も不可能であり、RNA 抽出も困難であったため、腹腔洗浄液に関する検討は行わない方針とした。

2) 胃癌患者末梢血におけるスプライシングバリエーションの発現

94 例の胃癌症例の術前末梢血から、RNA 抽出の分離を行った。9 例では RNA の収量が少なく、7 例では RNA の品質に問題があったため、これらの症例を検討から除外し、78 例において、ARHGDIsv1、ALDOG4b、XAF1sv3 の 3 種のスプライシングバリエーションを測定し、臨床病理学的因子との関連について検討した。

78 例では全例スプライシングバリエーションの測定が可能であり、その対数値は概ね正規分布を示していた(図 1)。

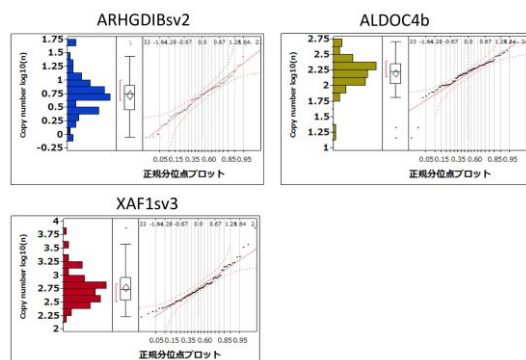


図 1

各遺伝子発現量と臨床病理学的因子との関連に関する検討では、ARHGDIsv1 の発現が進行胃癌で高値をとる傾向を認め、XAF1sv3 の発現が未分化型癌で高値をとる傾向を認めた(図 2)。

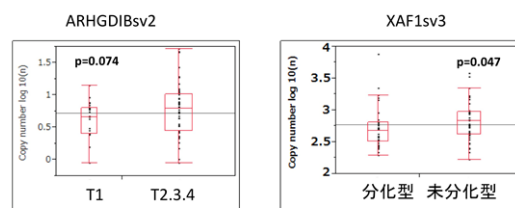


図 2

スプライシングバリエーションとその他の臨

床病理学的因子との間に有意な関連は認められなかった。

以上の結果から、今回検討したスプライシングバリエーションは胃癌患者末梢血において検出する事が可能であったが、転移予測マーカーとしての有用性は乏しいものと思われた。現在、更に他の 3 種のスプライシングバリエーションを用いて検討を進めている。

3) 新規マーカーの探索

胃癌培養細胞株 MKN45 と同株より得られた腹膜播種高転移細胞株 MKN45P のマイクロアレイ解析から 13 の遺伝子のスプライシングバリエーションが同定された。更に培養上清を用いたプロテオミクス解析により、Quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 の isoform が検出された。この isoform は胃癌、膵癌の培養上清のみに検出され、新たなマーカーとして臨床に応用できる可能性が示唆された。現在、胃癌患者の臨床検体を用いた解析を実施中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

Hatakeyama K, Ohshima K, Fukuda Y, Ogura S, Terashima M, Yamaguchi K, Mochizuki T, Identification of a novel protein isoform derived from cancer-related splicing variants using combined analysis of transcriptome and proteome. Proteomic, 査読有, 2011, 11, 2275-2282. doi: 10.1002/pmic.201100016.

Tanizawa Y, Terashima M, Lymph node dissection in the resection of gastric cancer: review of existing evidence. Gastric Cancer, 査読有, 13, 2012, 137-148. doi: 10.1007/s10120-010-0560-5.

Saze Z, Terashima M, Kogure M, Ohsuka F, Suzuki H, Gotoh M, Activation of the Sonic Hedgehog Pathway and Its Prognostic Impact in Patients with Gastric Cancer, Dig Surg, 査読有, 29, 2012, 115-123. doi:10.1159/000336949

Kashimura S, Saze Z, Terashima M, Soeta N, Ohtani S, Osuka F, Kogure M, Gotoh M, CD83(+) dendritic cells and Foxp3(+) regulatory T cells in primary lesions and regional lymph nodes are inversely correlated with prognosis of gastric cancer Gastric Cancer, 査読有, 15, 2012, 144-153. doi:10.1007/s10120-011-0090-9
Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, Tokunaga M, Kondo J, Taki Y, Terashima M, Influence of a positive proximal margin on oral intake in patients with palliative

gastrectomy for far advanced gastric cancer. World Journal of Surgery, 査読有, 35, 2011, 1030-1034. doi10.1007 /s00268-011-1018-6

Hatakeyama K, Fukuda Y, Ohshima K, Terashima M, Yamaguchi K, Mochizuki T, Placenta-specific novel splice variants of Rho GDP dissociation inhibitor β are highly expressed in cancerous cells. BMC Res Notes, 査読有, 5, 2013, 666. doi 10.1186/1756-0500-5-666

Terashima M, Kitada K, Ochiai A, Ichikawa W, Kurahashi I, Sakuramoto S, Katai H, Sano T, Imamura H, Sasako M, Impact of Expression of Human Epidermal Growth Factor Receptors EGFR and ERBB2 on Survival in Stage II/III Gastric Cancer. Clin Cancer Res, 査読有, 18, 2012, 5992-6000. doi 10.1158/1078-0432.CCR-12-1318.

Tokunaga M, Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, Terashima M, The Impact of Preoperative Lymph Node Size on Long-Term outcome following curative gastrectomy for gastric cancer. Ann Surg Oncol. 査読有, 20, 2013, 1598-1603. doi 10.1245/s10434-012-2699-2. Takizawa K, Takashima A, Kimura A, Mizusawa J, Hasuike N, Ono H, Terashima M, Muto M, Boku N, Sasako M, Fukuda H, Risk of lymph node metastases from intramucosal gastric cancer in relation to histological types: how to manage the mixed histological type for endoscopic submucosal dissection. Gastric Cancer, 査読有, 16, 2013, PMID: 23179369

Goto H, Tokunaga M, Sugisawa N, Tanizawa Y, Bando E, Kawamura T, Niihara M, Tsubosa Y, Terashima M, Value of splenectomy in patients with Siewert type II adenocarcinoma of the esophagogastric junction. Gastric Cancer, 査読有, 12, 2013, PMID: 23179369

[学会発表] (計4件)

畠山慶一、Identification of cancer-related Splicing Variant Based on Multiple 'Omics' Strategy、第69回日本癌学会、2010年9月22日、大阪市

Terashima M, Metabolome analyses in human gastric cancer tissue using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. 2012 Gasrtrointestinal Cancer Symposium, 2012年1月19日, San Francisco, USA

畠山慶一、胃がん患者末梢血中におけるスプライシングバリエーション発現レベルの定量化、第71回日本癌学会、2012年9月19日、札幌市

Terashima M, Metabolomic Discrimination of Intestinal- and Diffuse-type Gastric Cancer Tissues Using Capillary Electrophoresis Time-of-flight Mass Spectrometry. 32nd Congress of the European Society of Surgical Oncology (ESSO), 2012年9月19日、Valencia, Spain

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺島 雅典 (Terashima Masanori)
静岡県立静岡がんセンター・その他部
局・研究員
研究者番号: 40197794

(2) 研究分担者

望月 徹 (Mochizuki Tohru)
静岡県立静岡がんセンター・研究所・研究員
研究者番号: 00117780
大島 啓一 (Oshima Keiichi)
静岡県立静岡がんセンター・研究所・研究員
研究者番号: 10399587
畠山 慶一 (Hatakeyama Keiichi)
静岡県立静岡がんセンター・研究所・研究員
研究者番号: 20564157

(3) 連携研究者

なし