

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462018

研究課題名(和文) 胃癌リンパ節転移特異性lncRNAの解明-胃癌外科的個別化治療を目指して-

研究課題名(英文) Elucidation of specific lncRNA of lymph node metastases in gastric cancer for surgical individual treatment for the gastric cancer.

研究代表者

大井 正貴(Ohi, Masaki)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40418752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに胃癌のリンパ節転移のメカニズムを解明するために、転移形成に関与する有用性の高い lncRNA の検索を施行し、リンパ節転移、さらには腹膜播種転移と強く関連を認める lncRNA X を同定することができた。この lncRNA X は、正常粘膜と比較して胃癌組織において高発現を示し、さらに生存期間の独立した予後規定因子を示すだけでなく、腹膜播種転移の独立した危険因子であった。さらに in vivo の実験系において lncRNA X の増殖への関与を検証した結果、lncRNA X を siRNA にて制御された細胞株において、有意に腫瘍増大の抑制が図られた。

研究成果の概要(英文)：We have found out lncRNAs, which had high utility to be involved in metastatic formation so far to elucidate the mechanism of lymph node metastases of gastric cancer. As a result, we were able to identify lncRNA X with the strong association with lymph node metastases and peritoneal dissemination. We showed overexpression of lncRNA X in a gastric cancer tissue as compared with normal mucosa and showed that the expression of lncRNA X is the independent prognostic factor of the survival period. In addition, this lncRNA X was an independent risk factor of the peritoneal dissemination. Furthermore, as a result of having tested participation in growth of lncRNA X in vivo experiment, tumor enlargement was significantly inhibited in the gastric cell lines that were controlled by siRNA to lncRNA X.

研究分野：上部消化管

キーワード：lncRNAs gastric cancer lymph node metastases peritoneal dissemination lncRNA X

1. 研究開始当初の背景

胃癌は中国、日本、韓国などアジアや南米に患者が多い疾患であり、近年、胃癌検診や胃内視鏡などの普及もあり、死者数は年々減少傾向にあるものの、2003年度の日本における胃癌の死者数は49,535人(男32,142人、女17,393人)で、男性では肺癌に次いで第2位、女性では大腸癌に次いで第2位の依然、死亡者数の多い疾患であることは否めない(厚生労働省人口動態統計より)。近年、内視鏡治療技術の進歩に伴うESD(内視鏡粘膜下層剥離術)や、腹腔鏡下手術の技術の確立により、内視鏡外科手術症例数が増加してきており(日本内視鏡外科学会アンケート調査)。早期胃癌に対する治療の選択肢が増えてきている一方で、いわゆる縮小手術の妨げとなるのが、リンパ節転移の有無であることから、リンパ節転移の予測方法の確立は、早期胃癌に対する外科的個別化治療への試金石になりうる可能性がある。

2. 研究の目的

癌転移メカニズムの解明と克服法の確立は生命予後改善に大きく貢献する。癌細胞原発巣からの遊離、転移巣での接着、浸潤と増殖、血管新生の各過程に多数の転移促進・抑制分子群が関与している。これには癌細胞側で異常が認められる細胞接着・運動や増殖等の制御分子群だけでなく、転移臓器に特異的な微小環境条件が存在し癌細胞の臓器選択性と親和性を規定する分子群が想定されるが未解明な部分が多い。そこで本研究は、胃癌リンパ節転移に關与する lncRNA と mRNA を同定し、リンパ節転移メカニズムの解明と、新たな分子診断法の確立や新規治療法の開発をする。これは胃癌の腫瘍学的予後の改善を目的とする一方で、乳癌で広く行われ、また胃癌で試験的に行われているセンチネルリンパ節診断に代替できる可能性があり、胃癌縮小手術や内視鏡的胃癌治療の適応拡大にも寄与し、胃癌患者の腫瘍学的根治性を温存しつつ QOL の向上をめざす胃癌外科的治療のテーラーメイド化(個別化)を実現することを目的とする。

3. 研究の方法

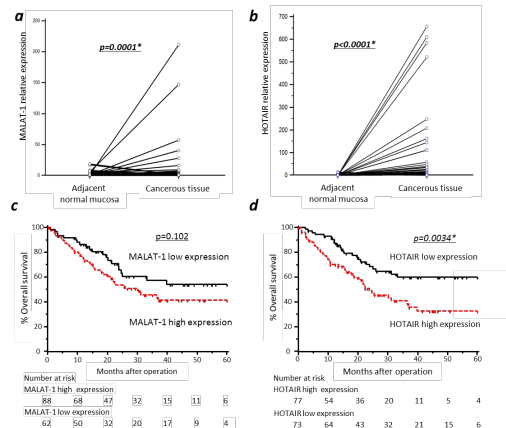
胃癌にて当院で切除された摘出標本を用い、RNA later sample が保存されていた約150例から胃癌組織と正常組織から mRNA, lncRNA, miRNA の抽出を行い、realtime PCRにて測定した。また一方で、mRNA・蛋白レベルでの発現が胃癌リンパ節転移と有意な相関を認めた ANGPTL2, MTA-1, L1CAM の蛋白発現解析を、Independent cohort 約300例の胃癌切除パラフィン埋包標本を用いて免疫染色を行い評価した。さらに、これらの患者の術前血清から RNA 抽出を行い、qPCR で候補遺伝子の発現解析を行った。また機能解析としては、胃癌細胞株として RNA/蛋白発現を認めた Intestinal type 由来と Diffuse type

由来の細胞株を用いてその機能解析を加え、ヌードマウスを用いたモデルにおける治療への転用の可能性を検討した。

4. 研究成果

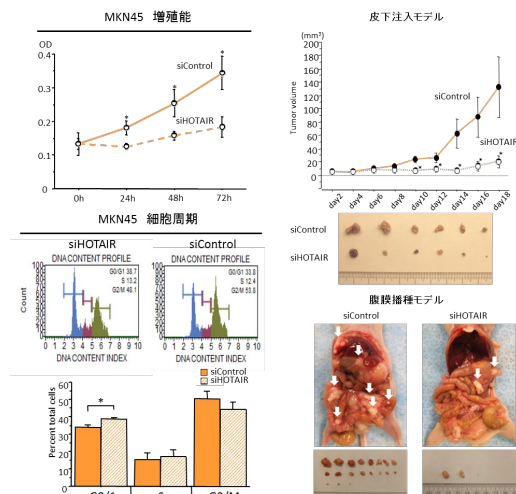
転移形成に強く關与する可能性が示唆されている metastasis associated-lncRNA に着目し、この候補 lncRNA の発現解析をおこなったところ、HOTAIR, MALAT1 が、胃癌組織で正常粘膜と比較し、優位に高発現を呈した(HOTAIR:p<0.0001, MALAT1:p<0.0001)。

Metastasis-associated lncRNA 発現解析



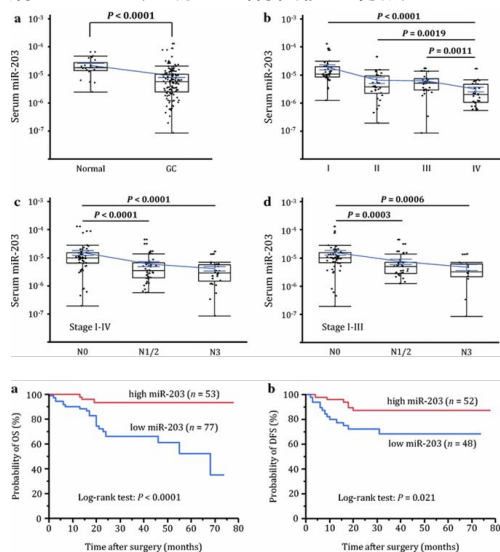
さらにこれらの lncRNA の中で、HOTAIR 高発現を呈した胃癌患者群は、優位に予後不良を示した(p=0.0014)。多変量解析においても、HOTAIR 高発現は独立した予後不良因子を示し、また HOTAIR 高発現は腹膜播種再発と有意な相関を示すほか、リンパ節転移とも有意な相関傾向を示した。HOTAIR は転移進展のメカニズムに深く關与している可能性が示唆されたため、胃癌細胞株を使用し、HOTAIR の発現調節が、胃癌細胞株の機能的変化を示すかどうかを、siRNA transfection を用いて in vitro と in vivo で評価した。

In vitro においては、HOTAIR 発現抑制が細胞増殖能、浸潤・遊走能を抑制するほか、アノキス抵抗性を抑制した。また in vivo においては、HOTAIR 発現抑制が、腹膜転移進展を抑制した。以上から、転移関連 lncRNA



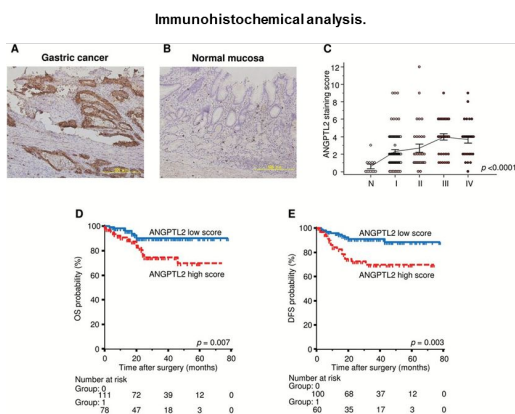
である HOTAIR の胃癌組織発現解析が、リンパ節転移、腹膜播種転移診断に有用なバイオマーカーとなり、また HOTAIR などの lncRNA が胃癌転移進展におけるあらたな治療標的となりうることを示した。

また lncRNA レベルのみならず、これに付随して、そのほかの non-coding RNA や、mRNA においても胃癌組織、もしくは胃癌患者血清を用いたバイオマーカー研究をおこなっている。Non-coding RNA としては胃癌患者血と健常人血清を用い、遠隔転移進展、とりわけ上皮間葉移行に深く関与する miRNA (miR-200 family) を網羅的に解析しそのなかで有意であった miR-203 の血清発現解析を行った。術前血清 miR-203 発現は胃癌患者で優位に低発現を示し ($p < 0.001$)、また胃癌の病勢の進行に伴い、発現が低下することを確認した。さらにリンパ節転移の進展にともない、血清 miR-203 発現は遠隔転移の有無にかかわ

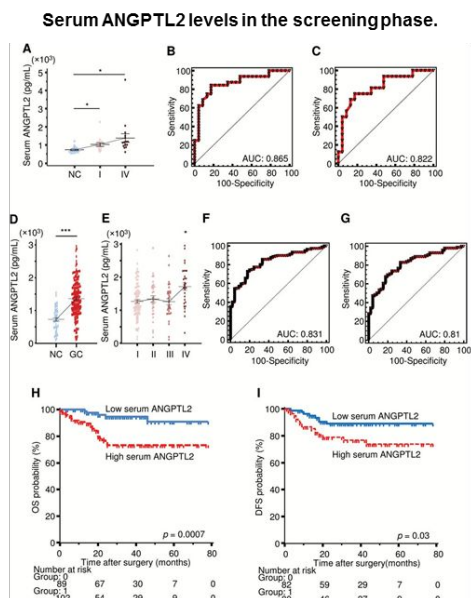


らず、有意に低下していくことを確認し、miR-203 低発現群は、全生存期間ならびに無再発生存期間において優位に予後不良であることを明らかにし、胃癌術前血清 miR-203 解析は、予後不良患者を鑑別するのみならず、リンパ節転移診断に有用であり、縮小手術可能な low risk 患者の鑑別にも有用である可能性を示した。

蛋白レベルにおいては、慢性炎症に深くかかわる分泌型蛋白である Angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2) が胃癌組織特異的に高発現を呈することを胃癌摘出標本の免疫染



色で確認し、ANGPTL2 発現を抑制することで胃癌細胞株の増殖能、浸潤能・遊走能が抑制されることを確認し、胃癌進展の機序において ANGPTL2 が重要な役割を果たしていることを確認した。さらに胃癌組織における ANGPTL2 高発現が独立した予後不良因子を呈し、リンパ節転移とも有意な相関を示した ($p = 0.0001$)。また血清 ANGPTL2 発現は、健常人と比較し、胃癌患者群で優位に増加し、血清 ANGPTL2 は予後マーカーであるのみならず、胃癌早期診断マーカーとなりうる可能性を報告した。



そのほか、胃癌組織を利用した術前リンパ節転移診断マーカーとして、現在、Metastasis-associated protein (MTA) family や L1-cell adhesion molecule (L1CAM) の胃癌組織発現解析により、これらが胃癌リンパ節転移に対する独立危険因子であり、リンパ節転移を有する胃癌患者の鑑別診断に有用である可能性が示唆されてきており、現在、すでにこれらの project に関しても論文を執筆、投稿査読中である。

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5件)

1. Circulating microRNA-203 predicts metastases, early recurrence, and poor prognosis in human gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2015 Aug 2. [Epub ahead of print]
Imaoka H, Toiyama Y, Okigami M, Yasuda H, Saigusa S, Ohi M, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M. (査読有)
2. Serum angiopoietin-like protein 2 as a potential biomarker for diagnosis, early recurrence and prognosis in gastric cancer patients.

- Toiyama Y., Tanaka K, Kitajima T, Shimura T, Imaoka H, Mori K, Okigami M, Yasuda H, Okugawa Y, Saigusa S, Ohi M., Inoue Y, Mohri Y., Goel A, Kusunoki M. Carcinogenesis. 2015 Dec;36(12): 1474-83. (査読有)
3. Angiopoietin-like Protein 2 as a Predictor of Early Recurrence in Patients After Curative Surgery for Gastric Cancer.
Shimura T, Toiyama Y., Tanaka K, Saigusa S, Kitajima T, Kondo S, Okigami M, Yasuda H, Ohi M., Araki T, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y., Kusunoki M. Anticancer Res. 2015 Sep;35(9): 4633-9. (査読有)
4. Metastasis-associated long non-coding RNA drives gastric cancer development and promotes peritoneal metastasis.
Okugawa Y, Toiyama Y., Hur K, Toden S, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y., Kusunoki M., Boland CR, Goel A. Carcinogenesis. 2014 Dec;35(12): 2731-9. (査読有)
5. Clinical significance of RacGAP1 expression at the invasive front of gastric cancer.
Saigusa S, Tanaka K, Mohri Y., Ohi M., Shimura T, Kitajima T, Kondo S, Okugawa Y, Toiyama Y., Inoue Y, Kusunoki M. Gastric Cancer. 2015 Jan;18(1):84-92. (査読有)

〔学会発表〕(計8件)

1. 当院における高齢者胃癌に対する術後補助化学療法の現状.
第 87 回日本胃癌学会総会 リーガロイヤルホテル広島(広島県広島市) 2015. 3.5 安田 裕美, 大井 正貴, 志村 匡信, 沖上 正人, 田中 光司, 毛利 靖彦, 荒木 俊光, 井上 靖浩, 楠 正人
2. 当科における胃癌 conversion therapy の現状と今後の課題.
第 87 回日本胃癌学会総会 リーガロイヤルホテル広島(広島県広島市) 2015. 3.5 毛利 靖彦, 田中 光司, 大井 正貴, 安田 裕美, 沖上 正人, 志村 匡信, 間山 裕二, 小林 美奈子, 荒木 俊光, 井上 靖浩, 楠 正人
3. 大腸癌における microRNA-503 発現の機能的ならびに臨床病理学的意義.
第 101 回日本消化器病学会総会 仙台国際センター(宮城県仙台市)2015.4.23 間山 裕二, 北嶋 貴仁, 森 浩一郎, 野口 智史, 井出 正造, 今岡 裕基, 浦谷 亮, 沖 哲, 藤川 裕之, 三枝 晋, 廣 純一郎, 小林 美奈子, 荒木 俊光, 大井 正貴,
- 田中 光司, 井上 靖浩, 毛利 靖彦, 楠 正人
4. 大腸がんバイオマーカー 大腸癌患者における転移ならびに予後診断マーカーとしての転移巣由来血清 microRNA-203.
第 53 回日本癌治療学会学術集会 国立京都国際会館(京都府京都市) 2015.10.29 間山 裕二, 今岡 裕基, 井出 正造, 志村 匡信, 安田 裕美, 藤川 裕之, 廣 純一郎, 三枝 晋, 小林 美奈子, 荒木 俊光, 大井 正貴, 田中 光司, 井上 靖浩, 毛利 靖彦, 楠 正人
5. 胃癌における転移および予後不良因子としての血清中血清 microRNA-203 発現の検討. 第 13 回日本消化器外科学会大会 グランドプリンスホテル新高輪(東京都) 2015.10.10 今岡 裕基, 間山 裕二, 浦谷 亮, 森 浩一郎, 野口 智史, 井出 正造, 沖 哲, 沖上 正人, 安田 裕美, 三枝 晋, 大井 正貴, 田中 光司, 井上 靖浩, 毛利 靖彦, 楠 正人
6. 臨床外科に役立つ診断と治療のイノベーション 大腸癌バイオマーカーとしての microRNAs. 第 77 回日本臨床外科学会総会 福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2015.11.28 間山 裕二, 井上 靖浩, 田中 光司, 浦谷 亮, 森 浩一郎, 今岡 裕基, 志村 匡信, 藤川 裕之, 三枝 晋, 廣 純一郎, 小林 美奈子, 大井 正貴, 荒木 俊光, 毛利 靖彦, 楠 正人
7. 胃癌切除後の予後における BMI(Body Mass Index)の影響. 第 77 回日本臨床外科学会総会 福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2015.11.28 安田 裕美, 間山 裕二, 野口 智史, 沖上 正人, 大井 正貴, 田中 光司, 毛利 靖彦, 荒木 俊光, 井上 靖浩, 楠 正人
8. 胃癌腹腔鏡下胃切除術後の体組成の変化と Quality of life との相関. 第 28 回日本内視鏡外科学会総会 大阪国際会議場(大阪府大阪市)2015.12.10 毛利 靖彦, 田中 光司, 藤川 裕之, 大井 正貴, 安田 裕美, 沖上 正人, 野口 智史, 荒木 俊光, 井上 靖浩, 楠 正人

6. 研究組織

(1)研究代表者

大井正貴(Ohi, Masaki)
三重大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 40418752

(2)研究分担者

楠正人(Kusunoki, Masato)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 50192026

毛利靖彦(Mohri, Yasuhiko)
三重大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 70345974

問山裕二 (Toiyama, Yuji)
三重大学・医学系研究科・講師
研究者番号： 00422824