

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461976

研究課題名(和文) 胃癌腹膜播種を規定するmicroRNAの網羅的解析と治療戦略

研究課題名(英文) Comprehensive analysis and treatment strategy of MicroRNA that regulates peritoneal metastasis of gastric cancer

研究代表者

沖上 正人 (Okigami, Masato)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：90722596

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)：網羅的microRNA(miRNA)解析を胃癌腫瘍組織、正常組織よりmicroRNAs発現を解析した。結果、上皮間葉移行に関わるmiRNAが胃癌の遠隔転移と関連していた。血清miR-203を同定し、これがステージⅣの胃癌患者よりも、ステージⅠ-Ⅲ胃癌患者で有意に低いことを示し、この低発現は胃癌患者の予後不良の独立した予測マーカーであることを明らかにした。胃癌組織におけるMTA-1発現は腹膜播種予測因子として有用であること、さらに胃癌組織ANGPTL2高発現、並びに血清におけるANGPTL2濃度上昇は、腹膜播種と関連し予後不良群の鑑別に有用である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive microRNA (miRNA) analysis was analyzed for expression of microRNAs from gastric cancer tumor tissue and normal tissue. MiRNAs involved in epithelial mesenchymal transition correlated with distant metastasis of gastric cancer. Serum miR-203 was identified and it was shown that it was significantly lower in stage IV gastric cancer patients than in stage I - III gastric cancer patients, and this low expression was found to be an independent predictive marker of poor prognosis in gastric cancer patients. The fact that MTA-1 expression in gastric cancer tissues is useful as a peritoneal dissemination predictor, and that the high expression of gastric cancer tissue ANGPTL 2 and the increase in ANGPTL 2 concentration in serum correlate with peritoneal dissemination and are useful for differentiation of poor prognosis group indicated.

研究分野：消化管外科

キーワード：胃癌 microRNA 腹膜播種 遠隔転移

## 1. 研究開始当初の背景

### 胃癌患者数の推移

胃癌死亡の72%はアジア(中国、日本、インド、韓国など)が占めており(GLOBOCAN2008)、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、2006年の罹患数割合は、胃、大腸、肺の順に多かった。男性では胃、大腸、肺の順に多く、女性で乳房、大腸、胃の順であった。2009年の日本における胃癌の粗死亡率は男女とも減少傾向にあるものの、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3位の順で依然、死亡率の高い疾患であることは否めない。

### 胃癌患者の再発形式と予後

胃癌の再発部位については、最も多いのは腹膜播種で、再発例の25.6%~43.6%を占める。再発様式は播種性が最も多く、血行性転移が続いており、胃癌取り扱い規約によれば、これらstageの5年生存率は約15%であり予後は非常に悪い。

### 腹膜播種治療方針

腹膜播種陽性胃癌、腹水細胞診陽性胃癌に対して、化学療法が標準的治療であることはガイドラインに明記されている。「S-1+シスプラチン併用療法」は大規模な臨床試験で効果が確認され、標準治療として、現在最も一般的に行われている治療法である。しかし、術前に腹膜転移を認めなくても、術中に確認される例や術中腹腔内洗浄液内のがん細胞が陽性的場合、集学的治療を用いたとしても、その予後は極めて悪く、5年生存率は10%以下で非常に予後不良である。通常、切除不能胃癌・再発胃癌の無治療での平均生存期間は3~5ヶ月とされているが、最近の臨床試験の結果によるとS-1単独で生存期間中央値が11ヶ月、S-1とシスプラチンの併用療法では13ヶ月に延長している。(SPIRITS試験)。

術中の判断により、胃癌腹膜播種患者に対して、手術施行をせずに化学療法を施行するのか、減量手術+化学療法を施行するのかは、各施設により異なり、その生存へのインパクトは明らかにはされていない。近年、胃癌腹膜播種に対する腹腔内温熱化学療法(Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy: HIPEC)が注目されてきている。腹腔内のガンを胃癌切除後、42前後で、高濃度抗癌剤を腹腔内で攪拌し、抗癌剤と温熱作用により残存癌細胞を殺傷することを目的としている。HIPECを施行している滋賀医大での成績はStage Bが77.9%、Stageは28.9%と手術+抗癌剤単独より延長している。しかし、HIPECの合併症には、腸管穿孔、縫合不全、腎不全、出血などが挙げられ、通常より侵襲が大きいと考えられる。治療が不必要な患者には施行するべきではないと考えられる。また医療費の観点からも、再発や腹膜播種のlow risk群場合などは施行

するべきではないが、再発の高risk群や、手術前に腹膜播種の存在がわかれば、早期治療が施行でき、予後の延長が期待できる。我々は、これら胃癌の腹膜播種に対して、この新しい治療を導入しようとしている。多くの患者が腹膜播種再発として発見されるため、画像診断や腫瘍マーカーなど継時的な変化を中心としたフォローアップを行っているが、早期発見は難しいのが現状であり、感度のよい早期診断法の確立が急務である。我々は、大腸癌、大腸ポリープの存在を鋭敏に血清中に示すBiomarkerとしてmicroRNA-21、大腸癌再発、遠隔転移を同定できるBiomarkerとして上皮間葉移行に関わるmicroRNA-200cを報告した。microRNAsを微小胃癌腹膜播種の同定するBiomarkerとして応用できれば、治療の選択、予後を改善するとして期待できる。

### microRNAsについて

microRNA(miRNA)とは細胞内に存在する20数塩基ほどのRNAをいい、ほかの遺伝子の発現を調節する機能を有しているノンコーディングRNAの1種である。癌に関わるmiRNAにはoncogenic miRNAとTumor Suppressor miRNAに分けられ、oncogenic miRNAの発現量を低下させる治療法の開発や、治療効果の指標にしたりすること、Tumor Suppressor miRNAの増幅によりがん抑制的に働く治療法の開発などが考えられる。

### 胃癌とmicroRNAs

胃癌組織で発現低下するmiR-375は、胃癌細胞株MKN74に導入することで、直接的標的であるPDK1の翻訳を抑制し、PI3K-Akt系を抑制し、細胞増殖を抑制することが報告されており、発癌抑制に関係すると考えられている。

ほかにも、apoptosisに関連するものとして、miR-155やmiR-101が、転移増殖に関連するものとして、miR-21やmiR-223などが報告されている。

### 胃癌におけるバイオマーカーとしての血清microRNAs

このように、miRNAsが胃癌の増殖転移抑制に関与していることの報告は、診断、治療および予後予測にmiRNAsが不可欠であることを示している。診断用バイオマーカーとしておよび癌の治療のための標的分子のmiRNAsの有用性は高いと思われる。

特に、腹膜播種など画像上の診断が困難な病態では、簡易で感度の高いバイオマーカーは非常に優れた診断手段となりうる。術前にあるいは術中に、このmiRNAsを検索することで、high risk群の同定が可能であれば、biomarkerとして利用することで、必要な患者にのみ治療を行えるだけでなく、早期診断早期治療による予後の改善も見込める。

## 血清胃癌におけるバイオマーカー研究

当科では、BDNF、SIP1、ZEB1、sVAP-1、KAP1、HGF および VEGF などの腫瘍内レベルが、胃癌における重要な予後決定因子であることを示してきた。しかし、これらは、腫瘍内の濃度が示すものであり、検査としては、侵襲が高いものとなっている。miRNAs は、血清および血漿中に検出可能であることが証明されている。より低侵襲で感度のよい Biomarker として期待される。

### 2. 研究の目的

本研究は、胃癌腹膜播種患者の血清中 microRNA の網羅的解析を行い、腹膜播種と密に関連する microRNA 関連候補を同定し、早期発見、予後と相関するか検討する。

これは、胃癌腹膜播種の新たな血清診断法を確立することで、診断不可能であった micro peritoneal dissemination の術前診断への新たな治療戦略、胃癌腹膜播種患者の予後・QOL の向上をめざすことを目的とする。

### 3. 研究の方法

1. 胃癌腹膜播種標本を用いて、網羅的 micro RNAarray 解析を行い、非腹膜播種部に比べ、腹膜播種部で有意に発現が高い micro RNAs を選択する

2. 腹膜播種患者の術前血清を用いて網羅的 micro RNAarray 解析を行い、腹膜播種患者で有意に発現の高い血清 micro RNAs を選択する。

3. 以上から得られた micro RNAs で共通するものを腹膜播種胃癌から分泌される候補 micro RNAs として、術後サーベイランス内視鏡が行われた症例における血清を用いて胃癌腹膜播種発生ハイリスク症例の選別に有効か評価する。

### 4. 研究成果

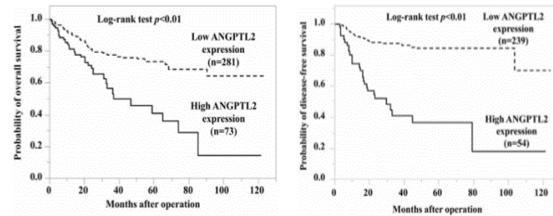
1. 網羅的 microRNA(miRNA)解析を胃癌腫瘍組織、正常組織より total RNA を抽出し、microRNAarray にてそれぞれサンプルの網羅的 microRNAs 発現を解析した。

2. 胃癌患者の術前血清と術後血清より total RNA を抽出し、miRNAarray にてそれぞれのサンプルの網羅的 miRNAs 発現を解析した。

3.2 の解析の結果、上皮間葉移行に関わる miRNA が胃癌の遠隔転移と関連しており、さらに、200 例以上の胃癌患者血清を用いその検証を行いその結果、血清 miR-203 を同定した。

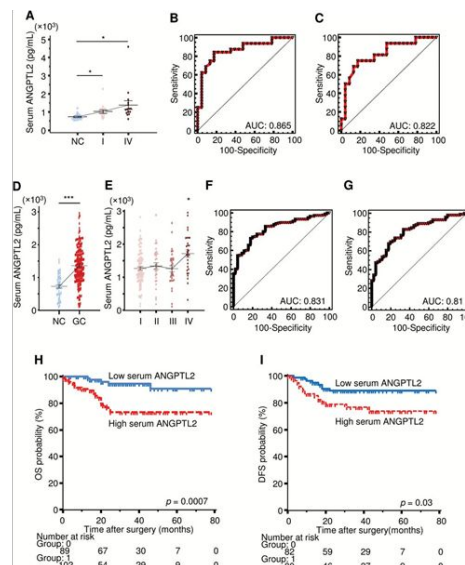
4. 検証解析は、血清 miR-203 はステージ - の胃癌患者よりも、ステージ 胃癌患者で有意に低かった。血清中の miR-203 はより高い T ステージ、脈管侵襲、リンパ節転移、腹膜転移、及び遠隔転移を有する胃癌患者で有意に低かった。血清 miR-203 の低発現は無病生存率及び全生存率の低さと関連していた。多変量解析では、血清 miR-203 の低発現がリ

ンパ節、腹膜、及び遠隔転移と関連しており、胃癌患者の予後不良の独立した予測マーカーであることを明らかにした。



5. さらに腹膜播種に関連する候補 miRNA の標的となりうる Angiotensin-like protein-2 (ANGPTL2), ならびに Metastasis associated protein (MTA) family に着目し、胃癌摘出標本と血液を用いた、Non-invasive biomarker としての有用性を検討した結果、胃癌組織における MTA-1 発現は腹膜播種予測因子として有用であること、さらに胃癌組織 ANGPTL2 高発現、並びに血清における ANGPTL2 濃度上昇は、腹膜播種と相関し予後不良群の鑑別に有用である可能性を示した。

### Serum ANGPTL2 levels in the screening phase.



### 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 3 件)

1. Serum angiotensin-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. 査読あり

2. 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. 査読あり
3. Circulating microRNA-203 predicts metastases, early recurrence, and poor prognosis in human gastric cancer.  
Imaoka H, Toiyama Y, Okigami M, Yasuda H, Saigusa S, Ohi M, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M. Gastric Cancer. 2015 Aug 2. 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

沖上 正人 (Okigami Masato)  
三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：90722596

### (2)研究分担者

問山 裕二 (Toiyama Yuji)  
三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00422824

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

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )