

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461984

研究課題名(和文) 胃癌のバイオマーカーによるリスク層別化キットと低分子抗癌剤の開発

研究課題名(英文) Development of risk stratification kit and small molecular anticancer drug by biomarker of gastric cancer

研究代表者

大島 貴 (OSHIMA, Takashi)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：10448665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： StageII/III胃癌根治切除後の再発リスク層別化マーカー検索では、まずマーカーの候補検索を定量PCR法および探索的プロテオミクスにて行い、合計16の候補を同定した。次にこれらのマーカー候補について、tissue microarrayを用いた免疫染色でその発現を検討した結果、SPARC, EZH2, ERBB2, p53の4つのタンパクの組み合わせによる再発リスクの層別化が可能であった。

KIAA1199をターゲットとした低分子抗癌剤の開発では、胃癌細胞に対する抗腫瘍効果の検討により12種類に絞り込まれ、胃癌に対する5-FUとの併用効果を検討した結果、一つの薬剤で相乗効果が確認された。

研究成果の概要(英文)： We searched for the candidates of recurrence risk stratification markers of Stage II/III gastric cancer by quantitative PCR method and exploratory proteomics. 13 genes were identified by the quantitative PCR method, and 4 proteins were identified by exploratory proteomics. Then we examined the expression of these marker candidates by immunostaining using tissue microarray, it was possible to stratify the risk of recurrence with the combination of SPARC, EZH2, ERBB2, p53.

In development of small molecular anticancer drugs targeting KIAA 1199, it was narrowed down to 12 kinds of drugs due to the antitumor effect on gastric cancer cells. We then examined the effect of combination with 5-FU on gastric cancer by Chou and Talaly method, synergistic effect was confirmed in one drug. We are planning to conduct animal experiments using this drug.

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

StageII/III胃癌の標準治療は、根治切除後の補助化学療法であるが、その治療成績は依然として十分ではなく、新しい治療法の開発が望まれている。その中において、「バイオマーカーによる個別化治療」と「新しい分子標的薬の開発」は期待されている領域である。

申請者らは、外科手術で得られる胃癌組織と近接正常粘膜の凍結検体を用い、これらの領域について研究を進めてきた。

申請者らは、前治療歴のない、術後5年以上経過したStageII/III胃癌527症例の胃癌組織および近接正常粘膜の凍結検体からRNAを抽出し、マイクロアレイを用いた網羅的検索、SAGE法およびCAST法を用いた遺伝子選択などからバイオマーカーの候補として130 遺伝子の発現量を定量PCR 法にて測定し、臨床病理学因子および治療成績との関連性を検討することで10 種類の独立した予後不良因子として、KIAA1199, SPARC, INHBA, SRPX2, IGF1R, MMP9, RECK, REG4, PDGFR, TNS4を同定した。次に異なるコホートの312 症例の検体を用いて再現性を検証した結果、3 種類の予後不良因子、KIAA1199, SPARC, INHBAで再現性が得られた。これらのマーカーを用いたStage II/III胃癌根治切除後の再発リスク層別化とそれに基づいた個別化治療が可能になれば、Stage II/III胃癌の治療成績の向上が期待されるところと考えられた。

次に、これらの予後不良因子のうち、KIAA1199の発現は、StageII/III胃癌において、手術単独症例群では生存に関連を認めなかったが、S-1 の補助化学療法を施行した症例群では独立した予後不良因子であった。そこで、胃癌細胞でKIAA1199 をノックダウンしてコントロールと比較した結果、胃癌細胞の増殖能および浸潤能の著明な抑制効果が確認され、さらに5-FU に対する感受性が増強することを発見した。すなわち、KIAA1199 は胃癌の増殖および浸潤に強く関わっており、さらに

5-FU の耐性因子である可能性が示唆され、胃癌に対する新規ターゲットとしての有用である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

(1) Stage II/III胃癌根治切除後の再発リスク層別化マーカーの組み合わせの検索

異なるコホートより再現性の得られた予後不良因子：KIAA1199, SPARC, INHBAをリスク層別化マーカー候補とし、さらに異なるコホート1000症例を用いて、tissue microarray を用いた免疫染色を行い、Stage II/III胃癌根治切除後の再発リスク層別化が可能な組み合わせを検索する

(2) KIAA1199を標的とした低分子抗癌剤の開発

連携研究者とともにKIAA1199 を標的とした多数の低分子薬剤の多候補の設計および作成を行い、胃癌細胞株を用いて抗腫瘍効果と既存の抗癌剤との併用効果についての評価を行い、低分子抗癌剤として有用な薬剤を絞り込む。次にヌードマウスを用いたヒト胃癌移植モデルにこれらの薬剤を投与し、抗腫瘍効果の検討を行う。ヌードマウスは屠殺後に解剖を行い、各臓器における病理組織学的な検討を行う。

3. 研究の方法

(1) Stage II/III胃癌根治切除後の再発リスク層別化マーカー検索

異なるコホートより再現性の得られた予後不良因子をリスク層別化マーカー候補として、リスク層別化候補検索の症例とは異なる胃癌のコホート約1000 症例からtissue microarrayを作成し免疫染色を施行した。染色細胞の割合と染色強度によって0, 1+, 2+, 3+に分類し、3+の染色強度を示した症例を発現陽性とする。次にリスクを層別化する予後不良因子の最小限の組み合わせを検索した。

例えば3種類のリスク層別化マーカーで 0 因子または 1 因子の発現陽性， 2 因子または 3 因子の発現陽性の 2 群に分け，明確に層別化が出来るか検討した。

(2) KIAA1199 をターゲットとした低分子抗癌剤の開発

KIAA1199 蛋白を標的とした低分子抗癌剤の設計と作成

KIAA1199 蛋白の分子構造をターゲットとして Super Computer を用いて低分子薬剤の候補を約 1000 種類設計し，これらの compounds を作成した。

in vitro の検討による薬剤の選別

これらの低分子薬剤の候補について，二つの胃癌細胞株 (MKN-45, MKN-74) を用いて，各薬剤を 1 μ M および 10 μ M 投与した場合の抗腫瘍効果について，MTT assay を用いたスクリーニングを行い，2 種の胃癌細胞株において，コントロールと比較して 70% 以上の抗腫瘍効果が得られる低分子薬剤を有効な薬剤として，候補薬剤の絞り込みを行った。

既存の抗癌剤と併用した場合の相乗効果の検討

で絞り込んだ薬剤と既存の抗癌剤との併用効果について，Chou and Talaly 法を用いて検討し，さらに薬剤候補の絞り込みを行った。

ヌードマウスを用いた xenograft モデルによる検討胃癌細胞移植ヌードマウスを用い

て得た至適投与法で，単独および他の抗癌剤との併用投与を行い，その効果について検討する。単独および併用投与において，control 群および投与量を変化させた薬剤投与群をおき，最大耐用量を明らかにするとともに抗腫瘍効果が濃度依存性であるかを明らかにする。

臓器障害の有無についての確認薬剤を投与した全てのマウスについて解剖を行い，脳，肺，消化管，肝臓，腎臓，膵臓，脾臓，脊椎，

大腿骨への薬剤の影響について，病理組織標本を作成して評価する。

4. 研究成果

(1) SPARC, INHBA, KIAA1199 による StageII/III 胃癌の再発リスクの層別化

本研究で，当初リスク層別化候補として同定された SPARC, INHBA, KIAA1199 では，tissue microarray を用いた検討で，単独，組み合わせ共に StageII/III 胃癌の再発リスクを有意に層別化することはできなかった。そこで遺伝子及びタンパクレベルでリスク層別化マーカー候補の再検索を行った。

(2) StageII/III 胃癌根治切除後の再発リスク層別化マーカー候補の遺伝子レベルの再検索

StageII/III 胃癌根治切除後の再発リスク層別化マーカー候補の遺伝子レベルの再検索では，統計解析方法を変更して再検索した。527 例と 312 例のコホートを population 1 および population 2 とし，まず population 1 において，各遺伝子の発現量を最大カイ二乗検定で求めた cut off 値で 2 群に分け，多変量解析にて独立した予後規定因子となる遺伝子を同定した。次に population 2 において population 1 で独立した予後規定因子となった遺伝子について多変量解析で検証し，population 1 と比較して hazard ratio に矛盾がなく，subgroup の症例数に偏りのない遺伝子をマーカー候補とした。その結果，SPARC, INHBA, KIAA1199 の他に ERBB2, CXCR4, VSNL1, SRPX2, IGF1R, MRP1, CEACAM7, TP53, EZH2, PDGFRB, VCAM1 がリスク層別化マーカー候補として同定された。

(3) StageII/III 胃癌根治切除後の再発リスク層別化マーカー候補のタンパクレベルの検索

StageII/III 胃癌根治切除後の再発リス

ク層別化マーカー候補のタンパクレベルの検索では、液体クロマトグラフィーを用いた探索的プロテオミクスを用いてリスク層別化マーカー候補検索をおこなった。対象症例を T4a, NX, M0, StageIII 胃癌で根治切除後に S-1 の補助化学療法を 1 年間投与した症例に限定し、5 年以上無再発・生存中の症例 12 例(無再発症例群)と 3 年未満で再発・死亡した症例 12 例(再発症例群)の凍結胃癌組織からタンパク質を抽出し、液体クロマトグラフィーを用いた探索的プロテオミクスを行い、1756 種類のタンパク質を同定した。これらのタンパク質について、無再発症例群と再発症例群間で発現の max fold change > 2 かつ ANOVA (P) < 0.001 のタンパク質を探索した結果、4 つのタンパク質 : SPARC, CLC, PRG2, PRG3 がリスク層別化マーカー候補として同定された。

(4) Tissue microarray による免疫染色を用いた StageII/III 胃癌根治切除後の再発リスク層別化マーカーの組み合わせの検索

遺伝子レベルで再検索した再発リスク層別化マーカー候補 : SPARC, INHBA, KIAA1199, ERBB2, CXCR4, VSNL1, SRPX2, IGF1R, MRP1, CEACAM7, TP53, EZH2, PDGFRB, VCAM1 と、液体クロマトグラフィーを用いた探索的プロテオミクスで同定した再発リスク層別化マーカー候補 : SPARC, CLC, PRG2, PRG3 について、tissue microarray を用いた免疫染色にてその発現を検討した結果、250 症例までの途中経過であるが、SPARC, EZH2, Her2, p53 の組み合わせで、再発リスクを層別化することが可能であった(5 年生存率 : 58% および 33%, P=0.0285)

(5) KIAA1199 蛋白の分子構造をターゲットとして設計・作成した低分子薬剤の候補981種類について、二つの胃癌細胞株 (MKN-45, MKN-74) を用いて、各薬剤を1 μ Mおよび10

μ M投与した場合の抗腫瘍効果について、MTT assayを用いたスクリーニングを行い、2 種の胃癌細胞株において、コントロールと比較して70%以上の抗腫瘍効果が得られる低分子薬剤を検索した結果、12種類の低分子薬剤が同定された。

(6) 既存の抗癌剤と併用した場合の相乗効果の検討

スクリーニングにより絞り込まれた12種類の薬剤について、5-FUおよびpaclitaxelとの併用効果について、Chau and Talaly法 で評価した結果、5-FUとの同時投与での相乗効果が1種類の低分子薬剤で認められた。

この薬剤を用いての動物実験を施行する予定である。

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)

Higuchi A, Oshima T, Yoshihara K, Sakamaki K, Aoyama T, Suganuma N, Yamamoto N, Sato T, Cho H, Shiozawa M, Yoshikawa T, Rino Y, Kunisaki C, Imada T, Masuda M. Clinical significance of platelet-delivered growth factor receptor-gene expression in stage II/III gastric cancer with S-1 adjuvant chemotherapy. *Oncology letters* 13: 905-911, 2017. 査読有

Numata K, Oshima T, Sakamaki K, Yoshihara K, Aoyama T, Hayashi T, Yamada T, Sato T, Cho H, Shiozawa M, Yoshikawa T, Rino Y, Kunisaki C, Akaike M, Imada T, Masuda M. Clinical significance of IGF1R gene expression in patients with Stage II/III gastric cancer who receive curative surgery and adjuvant chemotherapy with S-1. *Journal of Cancer*

Research and Clinical Oncology 142: 415-422, 2016. 査読有

大島貴, 吉川貴己: 胃癌に対する個別化治療の現状と今後. 科学評論社, 腫瘍内科 43-51, 2015. 査読無

Oshima T, Yoshihara K, Aoyama T, Hasegawa S, Sato T, Yamamoto N, Shiozawa M, Yoshikawa T, Numata K, Kunisaki C, Tanaka K, Akaike M, Imada T, Masuda M. Relation of INHBA Gene Expression to Outcomes in Gastric Cancer after Curative Surgery. Anticancer Research 34: 2303-2309, 2014. 査読有

Yamada T, **Oshima T**, Yoshihara K, Sato T, Nozaki A, Shiozawa M, Ota M, Yoshikawa T, Akaike M, Numata K, Rino Y, Kunisaki C, Tanaka K, Imada T, Masuda M. Impact of overexpression of Sushi repeat-containing protein X-linked gene on outcomes of gastric cancer. Journal of Surgical Oncology 109: 836-840, 2014. 査読有

[学会発表](計7件)

Oshima T, Kimura Y, Sakamaki K, Miyagi Y, Yamanaka S, Sato T, Shiozawa M, Yoshikawa T, Rino Y, Oue N, Yasui W, Imada T, Masuda M. Search for a combination of recurrence risk stratification markers after curative resection of gastric cancer. American Association of Cancer Research Annual Meeting 2017, 2016/3/31-4/5, Washington Convention Center, Washington DC, United States of America.

大島貴, 木村弥生, 坂巻顕太郎, 宮城洋

平, 吉川貴己, 森田智視, 山中正二, 長晴彦, 塩澤学, 利野靖, 円谷彰, 安井弥, 今田敏夫, 益田宗孝: Search for biomarkers of Stage II/III gastric cancer using clinical specimens with the goal of personalized therapy. 第89回日本胃癌学会総会(指定ワークショップ) 2017/3/8-10, 広島国際会議場, 広島

大島貴, 木村弥生, 坂巻顕太郎, 宮城洋平, 山中正二, 吉川貴己, 塩澤学, 大上直秀, 仙谷和弘, 利野靖, 安井弥, 今田敏夫, 益田宗孝, Stratification Markers for the risk of recurrence after curative resection of stage II or III gastric cancer. 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/6-8, パシフィコ横浜, 横浜

Oshima T, Sakamaki K, Miyagi Y, Cho H, Shiozawa M, Yoshikawa T, Rino Y, Kunisaki C, Tsuburaya A, Imada T, Masuda M. Stratification Markers for the Risk of recurrence after Curative Resection of Stage II or III Gastric Cancer. American Association of Cancer Research Annual Meeting 2016, 2016/4/16-20, Ernest N Morial Convention Center, New Orleans, Louisiana, United States of America.

Oshima T, Sakamaki K, Miyagi Y, Cho H, Shiozawa M, Yoshikawa T, Rino Y, Kunisaki C, Tsuburaya A, Imada T, Masuda M. Stratification Markers for the Risk of recurrence after Curative Resection of Stage II or III Gastric Cancer and Potential Clinical Applications, American Society of Clinical Oncology Annual Meeting 2015, 2015/5/29-6/4, McCormick Place, Chicago, Illinois, United States of America.

大島貴，木村弥生，中居祐介，坂巻顕太郎，宮城洋平，山中正二，長晴彦，塩澤学，吉川貴己，利野靖，安井弥，今田敏夫，益田宗孝：Stage II/III 胃癌根治切除後のリスク層別化マーカー検索と臨床応用。日本癌治療学会学術集会（指定シンポジウム）2015/10/29-31，国立京都国際会館，京都

Oshima T, Sakamaki K, Miyagi Y, Shiozawa M, Kunisaki C, Yoshikawa T, Rino Y, Imada T, Masuda M. Assessment of Risk Stratification Markers after Resection of Stage II or III Gastric Cancer and Potential Clinical Applications. American Association of Cancer Research Meeting 2014, 2014/4/18-22, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America.

〔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 大島 貴(Oshima, Takashi)
横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：10448665

(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 NouriNeamati (NEAMATI Nouri)