

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19337

研究課題名(和文) 胃癌腹膜播種のドライバー遺伝子機構の解明と治療標的分子の同定

研究課題名(英文) Identification of peritoneal dissemination-associated genes

研究代表者

田村 真吾 (Tamura, Shingo)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70751767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌腹膜播種マウスモデルとヒト胃癌200症例におけるWES/SNP/遺伝子/メチル化アレイの4データベースについて包括的統合的数理解析により、ドライバー遺伝子候補YAP1、CXCR7 およびLox11を同定した。

YAP1発現と予後不良との相関を確認した。既知のYAPの核内移行の制御ではなく、YAP1mRNA転写を抑制し蛋白機能を阻害することも明らかにした。

Lox11、CXCR7高発現群は低分化癌、リンパ節転移が多く、また進行した癌が多かった。Lox11過剰発現胃癌細胞株は有意に高い増殖能・遊走能・浸潤能を認めた。増殖、遊走、浸潤、EMTを介し、腹膜播種を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We herein identified peritoneal dissemination-associated genes, such as YAP1, CXCR7 and LOXL1 from an integrated and comprehensive analysis of WES/SNP from 200 cases of GC and gene array database from selected metastatic cell lines.

It is now recognized that YAP1 exhibits oncogenic property in GC and the nuclear accumulation correlates with poor survival. We showed that a drug suppressed the growth of GC in vitro and in vivo not by the translocation of YAP1 from cytoplasm into nuclear of cell, but by decreasing the transcription of YAP1 mRNA and protein. Furthermore, low YAP1 mRNA expression was associated with good prognosis in GC. Our findings provided an evidence that could be a novel drug effective in YAP1-dependent GC.

Lox11 and CXCR7 expressions were significantly associated with the poor differentiation, incidence of lymph node metastasis. And the transfectant of each gene in GC cells promoted proliferation, motility and inducing ENT might indicate the fostering dissemination.

研究分野：胃癌

キーワード：胃癌 腹膜播種 ドライバー遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

胃癌は本邦を含むアジアで罹患率の高い疾患であり、本邦における年齢調整死亡率は1960年代以降、年齢調整罹患率も1970年代以降減少傾向にはあるものの、2006年の罹患数は約117,000人で臓器別の罹患数で1位、2010年の死亡数は約50,000人で肺がんに次ぐ2位と、さらなる治療成績の向上が求められている。

特に胃癌の治療にあたって難渋するのは胃癌が腹膜播種をきたしやすいことである。腹膜播種を伴うと消化管蠕動障害とそれに伴うイレウス症状、腹水貯留、疼痛などの症状を呈するようになり、予後ならびにQOLを落とす大きな原因となる。特にスキルス胃癌は若年者に好発し、腹膜播種を伴うことが多いことが知られており、予後不良な疾患である。

しかし、胃癌腹膜播種転移機序については未知な部分が多く、有効な予防法や治療法の確立のためにその分子メカニズムの解明が喫緊の課題である。また、臨床的にはすべての胃癌症例が腹膜播腫再発を来すのではないことから、何らかの高リスク症例の囲い込みが必要である。

われわれは、ハイリスクの囲い込みのために以下の様に取り組んできた。

(1) 宿主側での腹膜播種補助因子：循環血液中に出現する骨髄由来細胞などの宿主側細胞が転移形成に重要な役割を担う可能性が指摘されはじめた。Kaplanらはマウス肺転移モデルにおいて、転移成立に先駆けてVEGFR-1を発現する骨髄由来の造血系骨髄前駆細胞(hematopoietic progenitor cell, HPC)が前転移ニッチ(細胞塊)を形成し、腫瘍細胞が集積しやすい状態を作ること明らかにした。われわれは胃癌894症例においてHPCの存在を示唆するVEGFR-1発現と胃癌細胞の存在を示唆するCEA/pan CKsの共存する症例において、極めて高率に肝転移/腹膜播腫を来すことを明らかにした(Mimori K, et al. Clin Cancer Res 2008)。他方、次世代シーケンサー(NGS)の出現により癌細胞に関するprecisionalな解析が可能になった。

(2) 癌細胞自身の要因：NGSを用いて骨髄・末血中に存在する胃癌腹膜播腫形成の原因となる全転写産物解析を試みた。結果、多くのHistone転写を一度に制御しうるmicroRNA760を同定、その発現低下症例において統計学的にも著しく有意にHistone蛋白の過剰発現とともに腹膜播腫を高率に来すことを明らかにしてきた(Mimori K. Clin Cancer Res 2013)

われわれは近年まで、胃癌の腹膜播腫は担癌状態にある胃癌症例において、胃癌細胞と宿主側との相互関係の上で成り立つものであり、癌細胞に注目すると同時に宿主側の原因について深く注視してきた。

### 2. 研究の目的

胃癌腹膜播種の機序を解明し、その高リスク症例を抽出する、あるいは治療開発につながるため、腹膜播種のドライバーとなる遺伝子を同定する。また治療標的となり得る分子を探索する。

### 3. 研究の方法

(1)NGS:in vivo 播種純化株/大規模臨床検体のスパコン数理統計解析

高い抗腫瘍効果を期待する分子を同定したプロセスは以下の通り

安定して腹膜播種を来すマウスモデルの構築

臨床検体の大規模症例数解析

両者を組み合わせた包括的かつ数理統計学的解析

(2)腹膜播種マウスモデル

HSC58 胃癌株化細胞(親株)をマウス胃壁内接種。腹膜播腫形成は認められない。しかし合計12回の胃壁内接種 播種形成 胃壁内接種を繰り返した子株にのみ高率に腹膜播腫を形成した。NGS および遺伝子アレイを実施し、親株に比べて子株において過剰発現をきたした遺伝子群を同定した。

・YAP1 阻害剤に関する研究：6週 BALB/c Nude マウスに対して、麻酔を行い開腹したのち、胃壁に胃癌腹膜高転移細胞株58As9Lucを10×10<sup>5</sup>個移植し、胃癌腹膜播種モデルマウスを作成する。モデルマウス作成後14日目より、Hippo経路阻害剤の投与開始(経口投与：3.1mg/kg,毎日投与,2週間、腹腔内投与：0.3mg/kg,毎日投与,12日間)(コントロール群：20匹、経口投与群：20匹、腹腔内投与群：20匹)。モデルマウス作成後14、21、28日目の時点でIVISによるイメージングを行い、28日目に安楽死させ、腹膜播種結節の個数、胃の重量、腹水量、Hippo経路の活性化状態を比較した。(想定される苦痛のカテゴリーD：担癌による苦痛)。データを増やすため、実験を2回繰り返した。

(3)胃癌臨床検体：

シンガポール大学のパトリック・タン教授は、胃癌の臨床検体約200例の遺伝子発現アレイprofile、CGHアレイ、メチレーションアレイprofile、さらに約150症例のエキソームシーケンスのデータを有しており、このデータを使用。

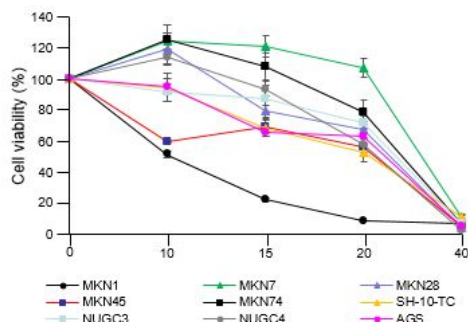
### 4. 研究成果

(1)Hippo経路関係分子YAP1：播種細胞株(子株)とヒト臨床検体間の数理学的統合解析で得られた標的分子候補

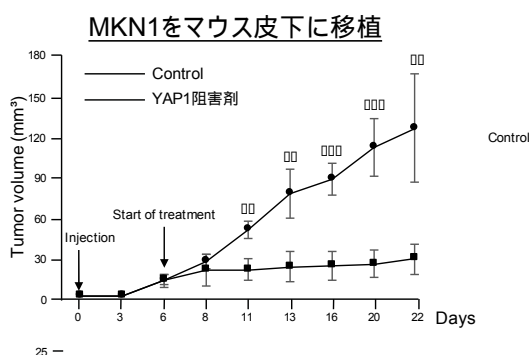
スーパーコンピュータによるGSEA解析によって、胃癌腹膜播種を規定するgene signatureは、特にECM signatureと相関関係にあった。この発見は、胃癌腹膜播種における腫瘍微小環境の重要性を示しておりDDR2の下流でHippo経路の分子YAP1の過剰発現を認めた。Hippo経路破綻は癌細胞の重

要な特性のひとつ「接触阻害の喪失」だが、細胞同士が密に接触しない腹膜播種などの浮遊状態では Yap1 が活性化すること、また cSrc は下流の Yap1 を直接活性化することは知られている。

in vitro での増殖抑制  
MKN1、SH-10-TC は Yap1 阻害感受性株  
MKN7、MKN28 は YAP1 阻害剤抵抗性株



#### YAP1 阻害による抗腫瘍効果



(2) その他のドライバー遺伝子候補として、CXCR7 および Lox11 を同定した。

CXCR7: 腹膜播種性転移細胞株で CXCR7 をノックダウンし種々の機能解析を実施すると同時に、腹膜播種モデルマウスを用いて CXCR7 阻害剤の播種抑制効果について確認した。当科の胃癌臨床検体では、CXCR7 高発現群は、低発現群に比べ有意に予後不良であり、遠隔転移症例が有意に多かった。CXCR7 過剰発現は胃癌腹膜播腫の危険因子となる biomarker として、あるいは CXCR7 阻害剤は、胃癌腹膜播腫阻害剤として期待される。

Lox11: 一方、当科胃癌症例において、Lox11 高発現群は低発現群に比較して有意に低分化癌、リンパ節転移が多く、また Stage 以上の進行癌が多かった。多変量解析では Lox11 発現量は独立予後不良因子であった。Lox11 過剰発現胃癌細胞株は有意に高い増殖能・遊走能・浸潤能を認め、また E-cadherin と Vimentin の発現量が低下していた。Lox11 はリシル酸化酵素 (LOX family) をコードする遺伝子の 1 つで、細胞外基質の生合成に必要である。LOX family は FAK/Src などのシグナル回路を制御することで細胞マトリックス

接着や細胞遊走を制御する。

二つの遺伝子については、胃癌細胞の増殖、遊走、浸潤、EMT を介して、腹膜播種を制御する可能性があり、治療標的やバイオマーカーとなることが示唆された。

(3) 同定した標的候補遺伝子について、当科の 196 例の胃癌臨床検体において RTPCR 法で予後因子としての意義を確認し発現量と臨床病理学的因子及び予後との関連を検討した。さらに腹膜播種性転移細胞株を用いて、候補遺伝子をノックダウンし種々の機能解析を実施すると同時に、モデルマウスを用いて播種抑制効果について確認した。

#### 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〕連携研究者 三森功士 (計 22 件)

1. Clinical Significance of FANCD2 Gene Expression and its Association with Tumor Progression in Hepatocellular Carcinoma. Komatsu H, Masuda T, Iguchi T, Nambara S, Sato K, Hu Q, Hirata H, Ito S, Eguchi H, Sugimachi K, Eguchi H, Doki Y, Mori M, Mimori K. *Anticancer Res.* 2017,37(3),1083-1090.
2. Clinical Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Sudo T, Nishida R, Kawahara A, Saisho K, Mimori K, Yamada A, Mizoguchi A, Kadoya K, Matono S, Mori N, Tanaka T, Akagi Y. *Ann Surg Oncol.* 2017 Feb, Epub.
3. Downregulation of ST6GALNAC1 is associated with esophageal squamous cell carcinoma development. Iwaya T, Sawada G, Amano S, Kume K, Ito C, Endo F, Konosu M, Shioi Y, Akiyama Y, Takahara T, Otsuka K, Nitta H, Koeda K, Mizuno M, Nishizuka S, Sasaki A, Mimori K. *Int J Oncol.* 2017,50(2),441-447.
4. The Expression of CCAT2, a Novel Long Noncoding RNA Transcript, and rs6983267 Single-Nucleotide Polymorphism Genotypes in Colorectal Cancers. Kasagi Y, Oki E, Ando K, Ito S, Iguchi T, Sugiyama M, Nakashima Y, Ohgaki K, Saeki H, Mimori K, Maehara Y. *Oncology.* 2017,92(1),48-54.
5. Attenuated RND1 Expression Confers Malignant Phenotype and Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. Komatsu H, Iguchi T, Masuda T, Hirata H, Ueda M, Kidogami S, Ogawa Y, Sato K, Hu Q, Nambara S, Saito T, Sakimura S, Uchi R, Ito S, Eguchi H, Sugimachi K, Eguchi H, Doki Y, Mori M, Mimori K. *Ann Surg Oncol.*

- 2017,24(3),850-859.
6. miR-146a Polymorphism (rs2910164) Predicts Colorectal Cancer Patients' Susceptibility to Liver Metastasis. Iguchi T, Nambara S, Masuda T, Komatsu H, Ueda M, Kidogami S, Ogawa Y, Hu Q, Sato K, Saito T, Hirata H, Sakimura S, Uchi R, Hayashi N, Ito S, Eguchi H, Sugimachi K, Maehara Y, Mimori K. PLoS One. 2016,11(11),e0165912.
  7. Overexpression of CXCR7 Is a Novel Prognostic Indicator in Gastric Cancer. Nambara S, Iguchi T, Oki E, Tan P, Maehara Y, Mimori K. Dig Surg. 2016
  8. Somatic mutations in plasma cell-free DNA are diagnostic markers for esophageal squamous cell carcinoma recurrence. Ueda M, Iguchi T, Masuda T, Nakahara Y, Hirata H, Uchi R, Niida A, Momose K, Sakimura S, Chiba K, Eguchi H, Ito S, Sugimachi K, Yamasaki M, Suzuki Y, Miyano S, Doki Y, Mori M, Mimori K. Oncotarget. 2016,7(38),62280-62291.
  9. HMGA1 silencing reduces stemness and temozolomide resistance in glioblastoma stem cells. Colamaio M, Tosti N, Puca F, Mari A, Gattardo R, Kuzay Y, Federico A, Pepe A, Sarnataro D, Ragozzino E, Raia M, Hirata H, Gemei M, Mimori K, Del Vecchio L, Battista S, Fusco A. Expert Opin Ther Targets. 2016,20(10),1169-79.
  10. 8q24 Polymorphisms and Diabetes Mellitus Regulate Apolipoprotein A-IV in Colorectal Carcinogenesis. Sugimachi K, Yamaguchi R, Eguchi H, Ueda M, Niida A, Sakimura S, Hirata H, Uchi R, Shinden Y, Iguchi T, Morita K, Yamamoto K, Miyano S, Mori M, Maehara Y, Mimori K. Ann Surg Oncol. 2016,23(Suppl 4),546-551.
  11. Expression of PD-L1 and HLA Class I in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Prognostic Factors for Patient Outcome. Ito S, Okano S, Morita M, Saeki H, Tsutsumi S, Tsukihara H, Nakashima Y, Ando K, Imamura Y, Ohgaki K, Oki E, Kitao H, Mimori K, Maehara Y. Ann Surg Oncol. 2016,23(Suppl 4),508-515.
  12. Rapid diagnosis of lymph node metastasis in breast cancer using a new fluorescent method with  $\gamma$ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green. Shinden Y, Ueo H, Tobo T, Gamachi A, Utou M, Komatsu H, Nambara S, Saito T, Ueda M, Hirata H, Sakimura S, Takano Y, Uchi R, Kurashige J, Akiyoshi S, Iguchi T, Eguchi H, Sugimachi K, Kubota Y, Kai Y, Shibuta K, Kijima Y, Yoshinaka H, Natsugoe S, Mori M, Maehara Y, Sakabe M, Kamiya M, Kakareka JW, Pohida TJ, Choyke PL, Kobayashi H, Ueo H, Urano Y, Mimori K. Sci Rep. 2016,6:27525.
  13. HOXB7 Expression is a Novel Biomarker for Long-term Prognosis After Resection of Hepatocellular Carcinoma. Komatsu H, Iguchi T, Masuda T, Ueda M, Kidogami S, Ogawa Y, Nambara S, Sato K, Hu Q, Saito T, Hirata H, Sakimura S, Uchi R, Hayashi N, Ito S, Eguchi H, Sugimachi K, Eguchi H, Doki Y, Mori M, Mimori K. Anticancer Res. 2016,36(6),2767-73.
  14. Aberrant Methylation of FOXE1 Contributes to a Poor Prognosis for Patients with Colorectal Cancer. Sugimachi K, Matsumura T, Shimamura T, Hirata H, Uchi R, Ueda M, Sakimura S, Iguchi T, Eguchi H, Masuda T, Morita K, Takenaka K, Maehara Y, Mori M, Mimori K. Ann Surg Oncol. 2016,23(12),3948-3955.
  15. Decreased Expression of Fructose-1,6-bisphosphatase Associates with Glucose Metabolism and Tumor Progression in Hepatocellular Carcinoma. Hirata H, Sugimachi K, Komatsu H, Ueda M, Masuda T, Uchi R, Sakimura S, Nambara S, Saito T, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Ito S, Terashima K, Sakamoto K, Hirakawa M, Honda H, Mimori K. Cancer Res. 2016,76(11),3265-76.
  16. Increased Copy Number of the Gene Encoding SF3B4 Indicates Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. Iguchi T, Komatsu H, Masuda T, Nambara S, Kidogami S, Ogawa Y, Hu Q, Saito T, Hirata H, Sakimura S, Uchi R, Hayashi N, Ito S, Eguchi H, Sugimachi K, Maehara Y, Mimori K. Anticancer Res. 2016,36(5),2139-44.
  17. Downregulation of SIRT4 Expression Is Associated with Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Nakahara Y, Yamasaki M, Sawada G, Miyazaki Y, Makino T, Takahashi T, Kurokawa Y, Nakajima K, Takiguchi S, Mimori K, Mori M, Doki Y. Oncology. 2016,90(6),347-55.
  18. Integrated Molecular Profiling of Human Gastric Cancer Identifies DDR2 as a Potential Regulator of Peritoneal Dissemination. Kurashige J, Hasegawa T, Niida A, Sugimachi K, Deng N, Mima K, Uchi R, Sawada G, Takahashi Y, Eguchi H, Inomata M, Kitano S, Fukagawa T, Sasako M, Sasaki H, Sasaki S, Mori M, Yanagihara K, Baba H, Miyano S, Tan P, Mimori K. Sci Rep. 2016,6:22371.
  19. Clinical and biological significance of circulating tumor cells in cancer. Masuda T, Hayashi N, Iguchi T, Ito S, Eguchi H, Mimori K. Mol Oncol. 2016,10(3),408-17.
  20. Integrated Multiregional Analysis Proposing

a New Model of Colorectal Cancer Evolution. Uchi R, Takahashi Y, Niida A, Shimamura T, Hirata H, Sugimachi K, Sawada G, Iwaya T, Kurashige J, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Chiba K, Shiraishi Y, Nagae G, Yoshida K, Nagata Y, Haeno H, Yamamoto H, Ishii H, Doki Y, Inuma H, Sasaki S, Nagayama S, Yamada K, Yachida S, Kato M, Shibata T, Oki E, Saeki H, Shirabe K, Oda Y, Maehara Y, Komune S, Mori M, Suzuki Y, Yamamoto K, Aburatani H, Ogawa S, Miyano S, Mimori K. PLoS Genet. 2016,12(2),e1005778.

21. Genomic Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a Japanese Population. Sawada G, Niida A, Uchi R, Hirata H, Shimamura T, Suzuki Y, Shiraishi Y, Chiba K, Imoto S, Takahashi Y, Iwaya T, Sudo T, Hayashi T, Takai H, Kawasaki Y, Matsukawa T, Eguchi H, Sugimachi K, Tanaka F, Suzuki H, Yamamoto K, Ishii H, Shimizu M, Yamazaki H, Yamazaki M, Tachimori Y, Kajiyama Y, Natsugoe S, Fujita H, Mafune K, Tanaka Y, Kellsell DP, Scott CA, Tsuji S, Yachida S, Shibata T, Sugano S, Doki Y, Akiyama T, Aburatani H, Ogawa S, Miyano S, Mori M, Mimori K. Gastroenterology. 2016,S0016-5085(16)00134-7.

22. Clinical and biological significance of transcription termination factor, RNA polymerase I in human liver hepatocellular carcinoma. Komatsu H, Iguchi T, Ueda M, Nambara S, Saito T, Hirata H, Sakimura S, Takano Y, Uchi R, Shinden Y, Eguchi H, Masuda T, Sugimachi K, Eguchi H, Doki Y, Mori M, Mimori K. Oncol Rep. 2016,35(4):2073-80.

〔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

田村 真吾 (TAMURA, Shingo)  
九州大学病院別府病院 内科・助教  
研究者番号：7 0 7 5 1 7 6 7

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

三森 功士 (MIMORI, Koshi)  
九州大学病院別府病院外科・教授

堀内 孝彦 (HORIUCHI, Takahiko)  
九州大学病院別府病院内科・教授