

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19879

研究課題名(和文) Transcriptome解析により同定した胃癌腹膜播種再発責任分子の機能解析

研究課題名(英文) Identification of a novel molecule relevant to development of peritoneal metastasis from gastric cancer

研究代表者

神田 光郎 (KANDA, Mitsuro)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00644668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜播種は最も高頻度かつ重篤な胃癌再発形式である。再発形式特異的網羅的発現比較解析により、腹膜播種症例で特異的に発現亢進する分子としてsynaptotagmin VIII (SYT8)を同定した。胃癌原発巣組織中SYT8発現量は、腹膜播種を有する、あるいは治癒切除術後に腹膜播種再発を来した症例で有意に高値であった。siRNA法を用いたSYT8のノックダウンにより、胃癌細胞株の浸潤能、遊走能および5-FU抵抗性が有意に低下した。マウス腹膜播種モデルに対するsiRNAの腹腔内投与は腹膜播種形成を阻害し、生存期間を有意に延長した。SYT8は胃癌腹膜播種の新たな診断、治療標的となるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Advanced gastric cancer (GC) frequently recurs because of undetected micrometastases even after curative resection. Peritoneal metastasis has been the most frequent recurrent pattern after gastrectomy and is incurable. We conducted a recurrence pattern-specific transcriptome analysis and synaptotagmin VIII (SYT8) was identified as a candidate biomarker specific to peritoneal metastasis. Expression levels of SYT8 mRNA in GC tissues were elevated in patients with peritoneal recurrence or metastasis. SYT8 levels served as an independent prognostic marker for peritoneal recurrence-free survival of patients with stage II/III GC. Inhibition of SYT8 by GC cells correlated with decreased invasion, migration, and fluorouracil resistance. Intraperitoneal administration of SYT8-siRNA inhibited the growth of peritoneal nodules and prolonged survival of mice engrafted with GC cells. SYT8 represents a promising target for the detection, prediction and treatment of peritoneal metastasis of GC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：Transcriptome解析 胃癌 腹膜播種 個別化治療

## 1. 研究開始当初の背景

進行胃癌は依然として予後不良であり、罹患率の高い本邦において克服すべき重要な疾患である。予後を大きく左右する再発転移形式には、腹膜播種転移、リンパ節転移、肝転移をはじめとする血行性転移という全く異なる3つの経路が存在する。原発巣から生じた遊離癌細胞が生着・増殖して転移巣を形成するには多段階の過程が必要であり、接着分子、蛋白分解酵素、増殖因子、血管新生因子、ケモカインなど多くの分子が関与しているとされる。古くは1889年にPagetにより提唱された“seed and soil theory”にある、「癌の転移の成立は癌細胞の増殖に適した微小環境を有する臓器にのみ可能である」という仮説をめぐり、様々な議論がなされてきた。近年、マイクロアレイや次世代シーケンサーなどの網羅的な遺伝子解析法の登場により、転移先臓器特有の転移巣形成において鍵となる分子の存在が注目されている(Brastianos PK, et al. J Natl Compr Canc Netw 2013. De Mattos-Arruda L, et al. Mol Oncol 2013)。胃癌においても、癌細胞が播種性、血行性あるいはリンパ行性にひろがり転移が生ずるには、それぞれの転移経路において固有の分子機序が存在すると考えられる。胃癌に対する分子標的治療薬は選択肢が限られており、まだまだ個別化治療時代の到来とは言い難い。現状では遠隔転移を有する胃癌はStage IV胃癌として一括して扱われており、ここに転移巣成立機序の異なるであろう腹膜播種、血行性転移、リンパ行性転移の全てが内包されていることが問題である。治療の個別化に役立つ効果的な診断・治療アプローチを開発するためには、転移形式に応じた分子生物学的背景を解明するという視点も有望と考えた。

申請者は予備実験として、新たな標的分子となりうる胃癌再発形式別のdriver遺伝子を同定すべく、次世代シーケンサーによるTranscriptome解析を行った。Stage III胃癌で治療切除術が施行され、術後補助療法としてS-1内服を行った症例を経過に応じて群分けした。5年以上の長期無再発群、腹膜播種再発群、肝転移再発群、リンパ節再発群の4群において、各4例の胃癌原発巣組織から得られたRNAを対象に、HiSeq (Illumina社)を用いて発現プロファイリングを行った。胃癌再発の約半数を占め、効果的な治療法の確立されていない腹膜播種再発に着目し、腹膜播種再発例において特異的に高発現している分子の検出を試みた。57751分子の発現を網羅的に解析し4群間比較を行った結果、腹膜播種再発群において特異的に、有意な発現増加を認める分子を22種同定した。なかでもsynaptotagmin 8 (SYT8)は、悪性腫瘍における役割は現時点で不明であり探索的ではあるが、カルシ

ウム誘発性の小胞輸送を調節する膜貫通型蛋白であり、各種増殖因子を介した腫瘍細胞の増殖や抗癌剤の代謝に関連している可能性があるため、第一候補遺伝子として着目した。

## 2. 研究の目的

前述の予備データ結果をもとに、SYT8を有望な腹膜播種転移のdriver候補遺伝子として抽出したので、その胃癌における機能、腹膜播種巣形成および抗癌剤感受性への影響、発現と長期予後への関連を評価し、診断・治療における臨床応用に向けての基盤を作るため、以下を目的とした。

- (1) SYT8の胃癌細胞株の増殖能、遊走能、浸潤能への関与
- (2) SYT8発現と、主要な転移能に関与する癌関連分子の発現の相関性
- (3) SYT8発現と胃癌細胞株の5-FU感受性との関係
- (4) マウス腹膜播種モデルにおける播種巣形成能へのSYT8特異的siRNA投与の効果
- (5) 臨床検体の胃癌組織中のSYT8発現度解析による、腹膜播種再発経過や長期予後との相関性の検討

## 3. 研究の方法

網羅的遺伝子発現解析により検出した、胃癌腹膜播種再発のdriver遺伝子候補であるSYT8についての詳細な発現・機能解析を行うべく、以下の実験を行った。

### <胃癌細胞株を対象としたin vitro実験>

- (1) SYT8の機能解析
 

胃癌細胞株に対して、SYT8のノックダウン実験を行った。ノックダウンはsiRNA法により行い、細胞株の増殖・浸潤能はCell Proliferation AssayおよびMatrigel Invasion Assay、遊走能をWound healing assayにより評価した。
- (2) SYT8と癌関連主要signaling pathwayの関係性
 

11種の細胞株においてSYT8発現量を評価した。同じ細胞株を対象に、Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (QIAGEN社)を用いて84種の癌の増殖および転移に関連する分子の発現を網羅的に解析し、SYT8発現度との相関性を調べた。
- (3) SYT8と5-FU系抗腫瘍剤感受性
 

5-FU系抗腫瘍剤であるS-1は現在の胃癌治療のKey drugであり、腹膜播種制御に一定の効果は示されているが、抵抗性を獲得する症例が臨床で大きな問題となっている。そこで、胃癌細胞株における5-FU感受性をWST-1 assayによって調べ、SYT8

の発現度との相関性を検討した。さらに、SYT8 高発現胃癌細胞株に対して SYT8 をノックダウンし、5-FU 感受性の変化を調べた。

#### < 腹膜播種モデルを用いた in vivo 実験 >

##### (4) siRNA の腹膜播種抑制効果

上記 in vitro 実験により確認されたノックダウンの手法および結果を応用して、特異的 siRNA の腹膜播種抑制効果について検証した。MKN45 を腹腔内に播種することでマウス腹膜播種モデルを作成し、腹膜播種巣形成能（腹囲、腫瘍総重量、腹水量）および生存期間について、コントロール、siControl、SYT8 に対する siRNA 投与の3群間で比較した。腹膜播種の生体内モニタリングの方法として、ルシフェラーゼ標識細胞を用いての in vivo imaging 法を採用した。

#### < SYT8 発現の臨床的意義の検証 >

##### (5) 胃組織中 SYT8 発現量の測定

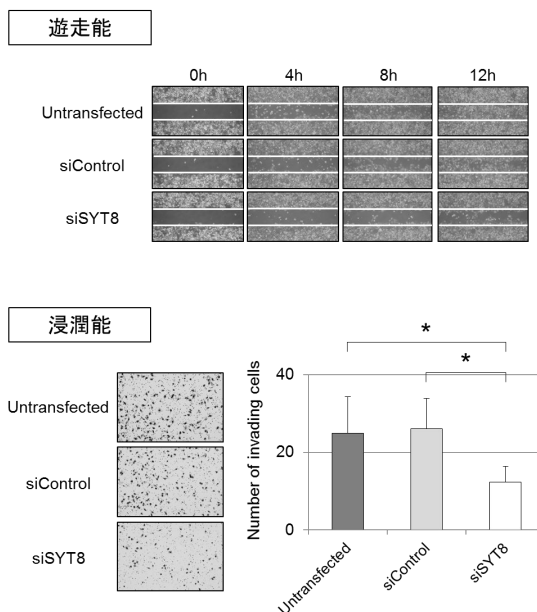
胃癌腹膜播種の新規再発予測マーカーを提案すべく、当教室で継続して胃癌患者から収集した胃組織検体（癌部および非癌部）を対象に、定量的 PCR 法によって多検体における SYT8 mRNA 発現度を調べた。さらに、切除切片を用いて SYT8 の免疫染色を行い、蛋白レベルでの発現解析も行った。SYT8 発現度と、腹膜再発・予後、各種臨床病理学的因子との相関性を調べた。

#### 4. 研究成果

#### < 胃癌細胞株を対象とした in vitro 実験 >

##### (1) SYT8 の機能解析

胃癌細胞株に対する SYT8 のノックダウンにより、胃癌細胞株の遊走能、浸潤能が有意に低下した。



一方で増殖能には明らかな影響は見られなかった。

##### (2) SYT8 と癌関連主要 signaling pathway の関係性

11 種の細胞株において SYT8 発現量と 84 種の癌関連分子の発現を網羅的に解析したところ、ERBB3 および SNAI3 が SYT8 発現度と有意な相関性を示した。これら分子との協調的発現により癌進展に寄与することが示唆された。

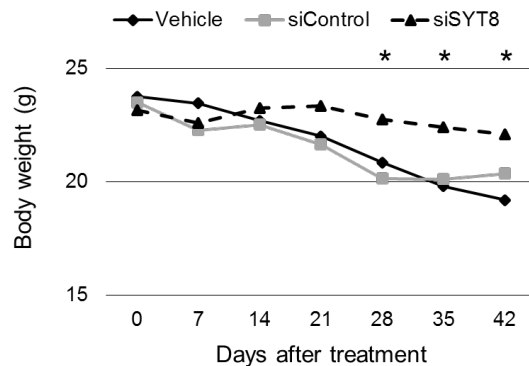
##### (3) SYT8 と 5-FU 系抗腫瘍剤感受性

胃癌細胞株に siRNA を用いて SYT8 をノックダウンしたところ、5-FU への感受性が改善した。このことから、SYT8 は 5-FU 抵抗性に関与していることが示された。

#### < 腹膜播種モデルを用いた in vivo 実験 >

##### (4) siRNA の腹膜播種抑制効果

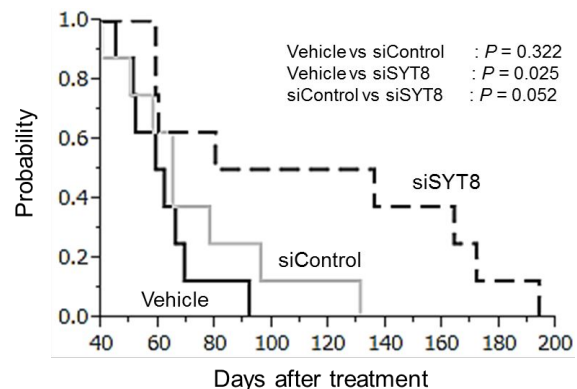
MKN45 を腹腔内に播種して作成したマウス腹膜播種モデルに対して、SYT8 特異的 siRNA の治療効果を調べた。有害事象は特に認めなかった。6 週間の治療期間中、治療群は体重が維持されたが、コントロール群および siControl 群は経時的に体重減少を認めた。



6 週間の siRNA 投与によって、生存期間は有意に延長した。

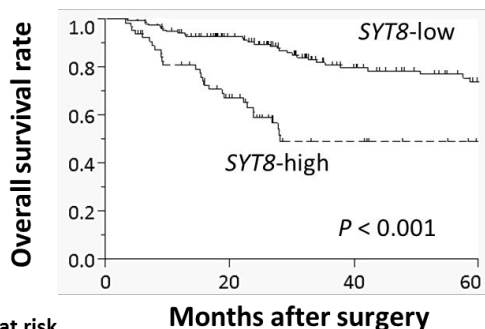
これらの結果から、SYT8 阻害が胃癌腹膜播種抑制効果を有することが示された。

#### < SYT8 発現の臨床的意義の検証 >



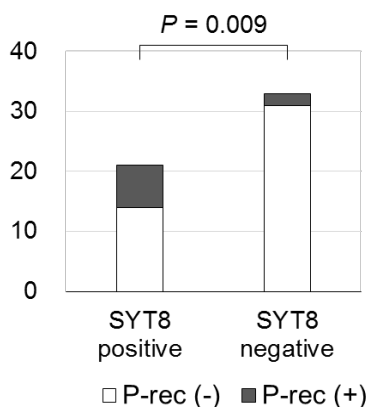
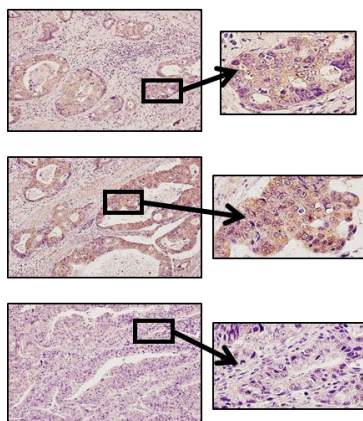
##### (5) 胃組織中 SYT8 発現量の測定

胃癌組織中の SYT8 mRNA 発現量は、非癌部組織と Stage I 胃癌組織の間に差を認めなかった。一方で、Stage II/III 胃癌症例では、のちに腹膜播種再発を生じた症例での SYT8 mRNA 発現量は、生じなかった症例と比較して有意に高値であった。Stage IV 胃癌では、腹膜播種を有していた症例群において SYT8 mRNA 発現量は著明に高値を呈していた。SYT8 高値は、Borrmann type 4/5、深達度、低分化型、浸潤性発育、進行病期と有意な相関を示した。SYT8 高発現群は、有意に予後不良あり、また根治的切除術後の腹膜播種再発の独立予後不良因子であった。



No. at risk	Months after surgery			
SYT8-low	162	119	69	45
SYT8-high	65	37	18	11

免疫組織化学染色法によって評価した SYT8 蛋白発現の腫瘍内陽性群では、有意に腹膜播種発生率が高かった。



Transcriptome 解析により同定した SYT8

は、胃癌腹膜播種の診断マーカーおよび治療標的として有望な分子であるものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kanda M, Shimizu D, Tanaka H, Tanaka C, Kobayashi D, Hayashi M, Iwata N, Niwa Y, Yamada S, Fujii T, Sugimoto H, Murotani K, Fujiwara M, Kodera Y. Significance of SYT8 For the Detection, Prediction, and Treatment of Peritoneal Metastasis From Gastric Cancer. *Annals of Surgery*. 2016 Dec 6. doi: 10.1097/SLA.0000000000002096. [Epub ahead of print] 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

神田光郎, 田中晴祥, 田中千恵, 小林大介, 岩田直樹, 山田 豪, 中山吾郎, 藤井努, 杉本博行, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘. 胃癌腹膜播種特異的関連分子の発現、機能および 5-FU 感受性への影響に関する検討. 第 50 回制癌剤適応研究会. 2017 年 3 月 17 日. ホテルクレメント徳島 (徳島県・徳島市寺島本町)

神田光郎, 清水 大, 田中晴祥, 小林大介, 田中千恵, 高見秀樹, 林 真路, 岩田直樹, 丹羽由紀子, 山田 豪, 藤井 努, 中山吾郎, 杉本博行, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘. 新規胃癌腹膜播種関連分子の同定と、その診断的および治療的意義に関する検討. 第 13 回日本消化管学会総会学術集会. 2017 年 2 月 18 日. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市熱田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: SYT8、SYT13、ANOS1 発現量による胃癌腹膜播種の検査方法、検査キット及び分子標的治療薬スクリーニング方法

発明者: 神田 光郎

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類: 用途特許

番号: 特願 2015-159756

出願年月日: 平成 27 年 8 月 13 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 光郎 (KANDA, Mitsuro)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 00644668