

令和元年6月13日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10495

研究課題名(和文) PAR1の消化管癌浸潤・転移における関与の解析とその制御の確立

研究課題名(英文) Protease activated receptor 1 and its related substance in progression of gastrointestinal cancer

研究代表者

廣野 靖夫 (Hirono, Yasuo)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師

研究者番号：10324154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌の腹膜播種の制御を目的にマウスの播種モデルにおいてPAR1活性を抑制したが、化学療法を超える効果はなく、併用による相乗効果も得られなかった。PAR1の活性化により誘導されるRibophorin II (RPN2)は、胃癌の進展に関与し、独立予後因子であった。docetaxelとcisplatinの薬剤耐性にも関与することが確かめられ、DCS療法においては効果予測因子として有用であることが示唆された。また今回の検討では大腸癌進展とPAR1には強い相関は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管癌の治療法の確立は急務であり、今回PAR1を通じた一連の研究の中で、Ribophorin II (RPN2)が胃癌の悪性度や化学療法の際の耐性機序と関連し、これを制御すると浸潤能が低下することや、化学療法の効果予測因子や予後予測因子として有用であることを新たに見出したことは、今後の胃癌治療に大きく役立つと思われ、非常に意義のあることと思われる。今後、更なる研究をしていく必要があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Although PAR1 activity of gastric cancer cell line was suppressed by antagonist SCH79797 in a mouse's peritoneal metastasis model to control peritoneal dissemination of gastric cancer, there was no effect beyond chemotherapy and the combination of paclitaxel and SCH79797 had no synergistic effect. Ribophorin II (RPN2) induced by PAR1 activation was involved in the progression of gastric cancer and was an independent prognostic factor. It was confirmed that it is also involved in drug resistance of docetaxel and cisplatin, and it is suggested that it is useful as an effect predictor in DCS therapy. Moreover, in this examination, strong correlation was not recognized between colorectal cancer progression and PAR1.

研究分野：腫瘍進展・腫瘍制御

キーワード：PAR1 胃癌 RPN2 化学療法 大腸癌

## 1. 研究開始当初の背景

Protease activated receptor (以下 PAR) はプロテアーゼによって活性化される G 蛋白結合受容体として見出され、今までに 4 種が同定されている。これらのうち PAR1,3,4 はトロンビンにより、PAR2 はセリンプロテアーゼ (トリプシンなど) によって活性化される。これまで PAR family はトロンビンに対する血小板や血管内皮細胞での役割を中心に血液凝固、血管疾患の分野で研究されてきた。またトリプシンが深く関与する膵炎などの炎症性疾患での役割も研究されている。血液凝固異常や炎症と癌の関連は古くから知られており、PAR family が癌の進展にも関与していると考えられる。

我々は胃癌における PAR1 や PAR2 発現と浸潤・転移との関連や予後因子としての意義を明らかにした (J Surg Oncol 2006, Anticancer Res 2008)。更に PAR1 の活性化が胃癌細胞の増殖・浸潤を促進させることを報告してきた (BMC cancer 2010, Int J Oncol 2013)。同時に細胞形態を大きく変化させ上皮間葉転換 (以下 EMT) が生じていることを見出し報告してきた (Int J Oncol 2014)。

## 2. 研究の目的

本研究では更にこのメカニズムを検討し、PAR1 の活性化を制御することで癌の進展を抑制し、治療に応用することが可能かを in vivo で検討する。また薬剤耐性などに関与していないかも検討し、化学療法における有用性を検討する。更に大腸癌の進展においても PAR1 が関与しているかも検討する。PAR1 関連物質による消化管癌の治療への応用を探ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

これまでの研究で用いてきた胃癌の PAR1 強制発現株 (MKN45/PAR1) を用いて、in vivo の検討を行う。これまでの検討で胃癌では PAR1 と腹膜転移に強い相関を認めるため、ヌードマウスの腹腔内に移植して、腹膜転移モデルを作成する。あらかじめトロンビンで活性化しておいた MKN45/PAR1 株  $5 \times 10^6$  個を PBS500 $\mu$ l で希釈して腹腔内へ注入する。Day8,15,22,29 に PAR1 特異的アンタゴニスト (SCH79797) 70nM 及びパクリタキセル 40nM を腹腔内へ追加投与して転移制御を試みる。また抗癌剤との併用効果も検討する。活性化 PAR1 により誘導される Ribophorin II (RPN2) が胃癌とどのように関連するかを検討する。また薬剤耐性との関連を検討し、化学療法の際の Biomarker と成り得るかを検討した。大腸癌培養細胞株でも PAR1 の発現を検討するとともに、大腸癌切除検体での PAR1 の発現を検討し、増殖・浸潤能への関与を調べる。

## 4. 研究成果

### (1) 転移抑制試験

PAR1 発現抑制による直接的な抗腫瘍効果を確認するために、MKN45/PAR1 を用いたヌードマウスの胃癌腹膜播種モデルに対するパクリタキセル及び PAR1 アンタゴニスト (SCH79797) の効果を確認した。腹水量と腫瘍重量、それぞれの検討では PAR1 アンタゴニスト (SCH79797) は単独でも一定の増殖抑制効果は認めるものの、パクリタキセルの増殖抑制効果には及ばず、両者を併用しても有意な上乗せ効果は得られなかった (図 1 左と中央)。PAR1 発現抑制による抗癌剤の抗腫瘍効果の増強は期待できないと考えられた。また生存曲線でもコントロール群とアンタゴニスト群には差がなく、パクリタキセル単独群とパクリタキセル+アンタゴニスト群にも有意差はなく、上記の結果を裏付けるものであった (図 1 右)。

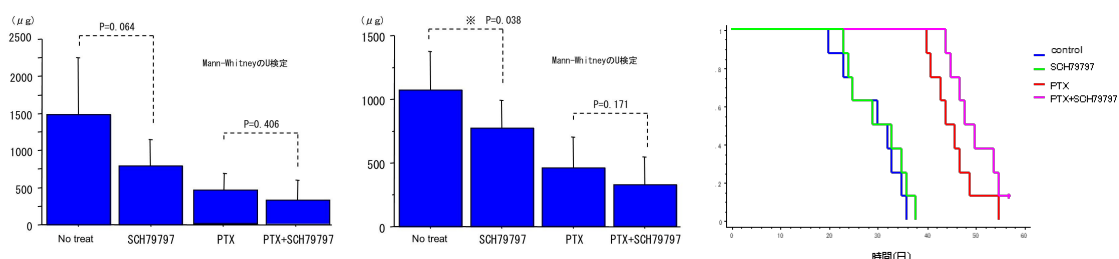


図 1 左：腹水量での比較、中央：腫瘍重量での比較、右：生存曲線

### (2) 胃癌における RPN2 発現の意義と化学療法におけるバイオマーカーとしての有用性

当科でこれまで胃癌細胞株において PAR1 の活性化により薬剤耐性に関与する RPN2 の発現が誘導されることを見出しており (Oncotarget 2015)、胃癌における RPN2 発現の意義を検討した。242 例の切除標本を免疫組織学的に検討し、49% に発現を認めた。深達度やリンパ節転移、腹膜転移、進行度と強く相関し、進展と関連すると考えられた。発現例は予後も不良であ

った(図2)。多変量解析でRPN2発現は独立予後因子であることが確かめられた。PAR1強発現しているMKN74細胞株をCRISPR/Cas9 technologyにてRPN2遺伝子をノックアウトして発現を低下させると浸潤能は有意に低下したが(図3)、PAR1を発現していないMKN45細胞株にsiRNAを用いてRPN2発現を抑制しても、浸潤能は低下しなかった。胃癌の浸潤にPAR1とRPN2の発現が何らかの関与がある可能性が示唆された。

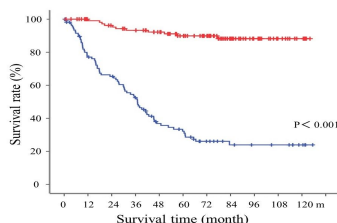


図2 RPN2発現と予後

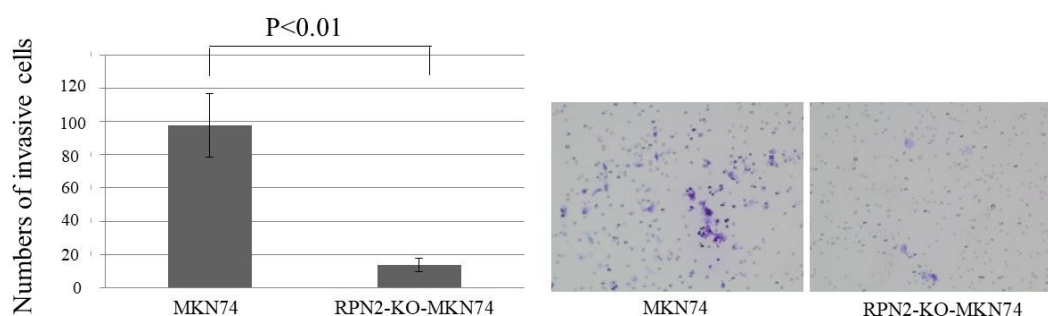


図3 MKN74におけるRPN2発現による浸潤能の変化

さらに化学療法との関与を確認するために、進行再発胃癌で用いられているDCS(Docetaxel+cisplatin+S-1)療法においてRPN2発現がBiomarkerと成り得るかを検討した。DCS療法施行例40例に対して19例に免疫組織化学的にRPN2発現を認め、臨床学的奏効度や組織学的奏効度とRPN2発現には有意な相関を認めた。陰性例ほど奏効例が多く、薬剤耐性との関連が示唆された。MKN74細胞株でcisplatinとdocetaxelに対する薬剤耐性をみるとRPN2遺伝子をノックアウトすると感受性が向上し、RPN2発現がcisplatinとdocetaxelを用いるDCS療法の不応と関与していることを見出した(図4)。PAR1-RPN2と薬剤耐性の関連の可能性が示唆された。

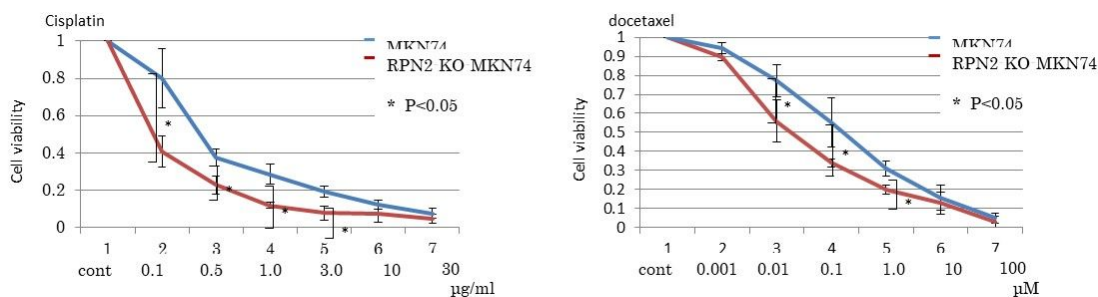


図4 MKN74におけるdocetaxel(左)とcisplatin(右)に対する感受性の変化

### (3)大腸癌におけるPAR1

大腸癌におけるPAR1の役割を確かめるため、まず大腸癌細胞株でPAR1のORFに対してRT-PCR法にて発現を検討した。HT29, LoVo, DLD-1, Colo320には強発現を認めた。SW480は弱発現、SW620はほとんど発現を認めなかった。次に大腸癌切除症例128例から抽出したmRNAを用いてRT-PCR法で正常と癌部を比較することでPAR1発現の検討を行い、各臨床病理学的因子や予後との検討を行った。28%に発現を認め、進行度とともに増加傾向はあるものの、深達度や脈管侵襲などとは有意な相関がなく、リンパ節転移や肝転移も亢進例に多い傾向はあるものの有意な相関までは得られず、予後にも有意差は認めなかった。数例ではあるが肝転移巣を用いた検討ではPAR1が発現しており、何らかの関連があると思われる、更なる検討が必要と思われた。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Yoshida Y, Goi T, Kurebayashi H, Morikawa M, Hirono Y, Katayama K. Prokineticin 2 expression as a novel prognostic biomarker for human colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018.7. 9(53):30079-30091. 査読有  
DOI: 10.18632/oncotarget.25706.

Fujimoto D, Goi T, Koneri K, Hirono Y. RPN2 is effective biomarker to predict the outcome of combined chemotherapy docetaxel and cisplatin for advanced gastric cancer. *Oncotarget*. 2018.3. 9(20):15208-15218. 査読有  
DOI: 10.18632/oncotarget.24622.

Fujimoto D, Goi T, Hirono Y. Expression of ribophorine II is a promising prognostic factor in human gastric adenocarcinoma. *International Journal of Oncology*. 2017.2. 50(2):448-456. 査読有  
DOI: 10.3892/ijo.2016.3822.

### 〔学会発表〕(計7件)

藤本大裕、廣野靖夫、五井孝憲、他. RPN2 is biomarker to predict the outcome of combined chemotherapy docetaxel and cisplatin/進行胃癌における術前 DCS 療法に対する効果予測因子. 第 91 回日本胃癌学会総会. 2019.2.27-3.1. 東京.

藤本大裕、廣野靖夫、五井孝憲、他. 進行胃癌における術前 DCS 療法に対する効果予測因子. 第 118 回日本外科学会定期学術集会. 2018.4.5-7. 東京.

藤本大裕、廣野靖夫、五井孝憲、他. 進行胃癌に対する術前補助化学療法におけるドセタキセルと RPN2 の発現による効果予測. 第 76 回日本癌学会学術総会. 2017.9.28-30. 横浜.

藤本大裕、廣野靖夫、五井孝憲、他. 胃癌における変異型 p53 と RPN2 の関連. 第 72 回日本消化器外科学会総会. 2017.7.20-22. 金沢.

Fujimoto D , Goi T , Hirono Y , et al. Expression of Ribophorine II (RPN2) is a new prognostic factor in human gastric adenocarcinoma. *ESMO ASIA 2016*(European Society for Medical Oncology). 2016.12.16-19. Singapore.

藤本大裕、廣野靖夫、五井孝憲 他. 胃癌における RPN2 発現の臨床病理学的意義. 第 71 回日本消化器外科学会総会. 2016.7.14-16. 徳島.

藤本大裕、廣野靖夫、五井孝憲 他. PAR1 による EMT と Hippo-YAP pathway の関係. 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016.4.14-16. 大阪.

### 〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：藤本 大裕（平成 30 年 3 月末で削除）

ローマ字氏名：(FUJIMOTO, daisuke)

所属研究機関名：福井大学

部局名：学術研究院医学系部門（付属病院部）

職名：助教

研究者番号（8 桁）：50646354

研究分担者氏名：五井 孝憲

ローマ字氏名：(GOI, takanori)

所属研究機関名：福井大学

部局名：学術研究院医学系部門

職名：教授

研究者番号（8 桁）：60225638

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。