

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10579

研究課題名(和文) 胃癌におけるアクチビン受容体変異による新規シグナル伝達機構の解明及び臨床的意義

研究課題名(英文) The role and clinical relevance of Activin receptor type 2A mutation in gastric cancer

研究代表者

油座 築 (Yuza, Kizuki)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：00745565

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124症例を対象に次世代シーケンサーを用いて遺伝子解析を行った。8%(10例)にアクチビン2型受容体(ACVR2A)遺伝子変異を認め、全てMSI症例だった。ACVR2A遺伝子変異群の術後5年全生存率は90%であり、ACVR2A遺伝子変異の無い群の57%に比べて有意に高かった。さらに、ACVR2A遺伝子をノックアウトした胃癌細胞株を作成し実験を行った。ACVR2Aノックアウト細胞は、mock細胞に比べてその増殖能、遊走能、浸潤能が有意に低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アクチビン2型受容体(ACVR2A)遺伝子変異はマイクロサテライト不安定を示す固形癌に多く報告されている一方で、胃癌におけるACVR2Aの報告は少なく、またその役割についても研究はなされてこなかった。本研究では、胃癌の発育・進展においてアクチビンシグナルが関与しており、アクチビンシグナルが下流に伝達されないことで胃癌の生物学的悪性度が低下する可能性を示した。本研究は胃癌におけるアクチビンシグナル伝達機構の重要性を明らかにするとともに、マイクロサテライト不安定のある固形癌を研究する上で新たな視点をもたらしたと言える。

研究成果の概要(英文)：DNA extracted from 124 gastric cancer patients was analyzed by next-generation sequencing, and MSI status and ACVR2A mutations were evaluated. ACVR2A mutations were found in 8%(10/124) of gastric cancer patients, and all ACVR2A mutations accompanied with MSI. 5-year overall survival rates were significantly higher in ACVR2A-mutated group than the ACVR2A-wild-type group(90% vs. 57%). Utilizing our newly established ACVR2A knockout gastric cancer cells, we found that ACVR2A mutation cause less aggressive tumor biology, which at least partially explain the better prognosis in ACVR2A-mutated gastric cancer patients.

研究分野：消化器外科学分野，腫瘍外科学分野

キーワード：胃癌 マイクロサテライト不安定 アクチビン受容体2A型 CRISPR-Cas9 MKN74 ヒト胃癌細胞

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌は日本人の部位別罹患数で第1位であり、特に再発・転移癌は未だ予後不良である。次世代シーケンサーの登場により欧米諸国を中心として癌の原因遺伝子や癌化メカニズムの網羅的解析が近年飛躍的に進んでいるが、欧米で罹患率の低い胃癌に関しては、乳癌や大腸癌と比較して研究が遅れており、未解明の部分が多い。

アクチピンは1986年にDr. Wiley Valeによって発見されたTGF-スーパーファミリーに属する分子の一つで、細胞の分化、アポトーシス、増殖抑制などに関与し、臓器の発生段階や発癌・癌の発育進展に関与している。アクチピンは細胞内情報伝達において、Smad2やSmad3など標的となる分子をTGF-と共有していることから、TGF-と相補的に作用するといわれている。癌においては、TGF-やアクチピンは、早期においては発癌に対して抑制的に作用する一方で、進行期においては癌の浸潤や転移能の獲得に関与することが示唆されており、それぞれのステージにおいて異なる役割を果たす重要な分子と考えられている。

ミスマッチ修復遺伝子異常によるマイクロサテライト不安定性(MSI)は、リンチ症候群として知られる遺伝性発癌の原因メカニズムとして知られ、最近では、MSIを伴う大腸癌は、PD-1免疫チェックポイント阻害薬が著効することが明らかになり、注目を集めている。また、MSIを伴う大腸癌では、TGF-2型受容体やアクチピン2型受容体(ACVR2A)が、その構造上の特徴からフレームシフト変異を起こしやすく、これらの遺伝子異常がMSIを伴う大腸癌の発癌メカニズムに大きく関与していることが報告されている。すなわち、MSIを伴う場合、発癌に対し抑制的に働くTGF-やアクチピンのシグナルがしばしば欠損することが癌化の一因と考えられる。一方、進行癌においては、これらのシグナルは癌のepithelial mesenchymal transitionや浸潤・転移能に関与していることが分かってきており、これらのシグナル欠損はむしろ癌の悪性を抑制する可能性が指摘されている。実際、肺癌モデルでは、アクチピンシグナルの欠損により癌が転移能を獲得できなかったという報告もある。しかし、胃癌におけるアクチピン受容体遺伝子変異の頻度やその臨床成績の報告はほとんどなく、胃癌におけるアクチピン受容体の役割や、MSIとアクチピン受容体遺伝子変異の合併頻度について未だ不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、胃癌におけるACVR2A遺伝子変異のMSIや予後予測に関するバイオマーカーとしての可能性を探索、その臨床的意義を明らかにし、ACVR2A遺伝子異常が引き起こすシグナル伝達機構と癌細胞の生物学的特徴を解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 胃癌患者手術切除検体におけるACVR2A遺伝子変異の検索とその臨床像の解明

対象は2009年から2016年に外科切除が施行された胃癌124症例の手術検体とした。次世代シーケンサーによりACVR2A遺伝子変異について解析し、マイクロサテライト不安定性やHypermutationとの関連、臨床病理学的因子や遠隔成績との比較検討を行い、胃癌におけるACVR2A遺伝子変異の臨床像を明らかにした。

### (2) ACVR2A遺伝子異常が引き起こすシグナル伝達機構と癌細胞の生物学的特徴の解明(in vitro model)

CRISPR/Cas9遺伝子編集技術を用いたMKN74ヒト胃癌由来細胞株のACVR2A遺伝子ノックアウト細胞を作製した。その細胞を用いてシグナル伝達機構と生物学的特徴(増殖能、遊走能、浸潤能)を明らかにすることで、ACVR2A遺伝子の胃癌細胞における役割を解明した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 胃癌患者における ACVR2A 遺伝子変異の頻度と臨床病理学的因子の関連

124 例中, 13 例 (10%) が MSI で 111 例 (90%) がマイクロサテライト安定 (MSS) だった。次世代シーケンサーで調べた 435 遺伝子の中で, 最も遺伝子変異の頻度が多かったのが ACVR2A 遺伝子変異で 10 例 (8%) だった。この 10 例は全て MSI 症例であり, MSS 症例には 1 例も ACVR2A 遺伝子変異を認めず, ACVR2A 遺伝子変異と MSI とに有意な関連を認めた ( $P < 0.001$ )。ACVR2A 遺伝子変異群は, 変異を認めなかった群 114 例と比較して, 有意に胃の下部に発生する癌に多く認められたが, その他の臨床病理学的因子に差は無かった。

##### (2) ACVR2A 遺伝子変異と胃癌患者の予後

単変量解析では, ACVR2A 遺伝子変異群の術後 5 年前生存率は, 変異の無い群と比較して有意に高かった (90% vs. 57%,  $P = 0.048$ ) (図 1.)。その他, 年齢, 腫瘍径, 病理学的 T 因子, N 因子, 遠隔転移が全生存に関連する因子であった。これら 6 因子を共変量とした多変量解析を行った結果, ACVR2A 遺伝子変異が無い (ハザード比 = 8.01,  $P = 0.04$ ), 70 歳より高齢 (ハザード比 = 1.95,  $P = 0.015$ ), 遠隔転移 (ハザード比 = 3.43,  $P < 0.001$ ) がそれぞれ独立した予後不良因子であった。MSI 群と MSS 群の 5 年全生存率に差は無かった (77% vs. 57%,  $P = 0.14$ )。

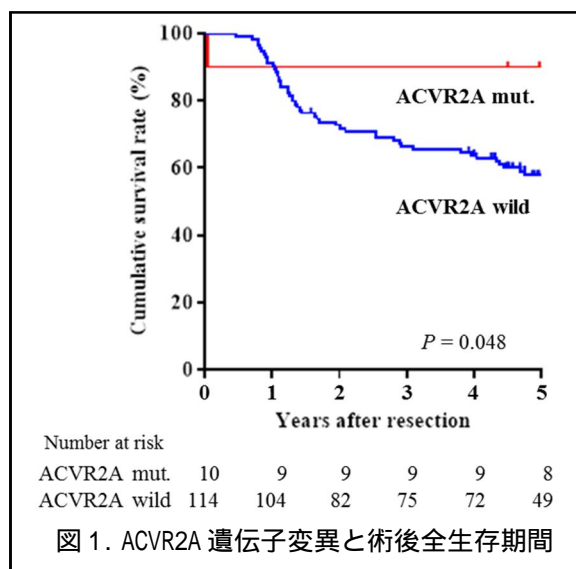


図 1. ACVR2A 遺伝子変異と術後全生存期間

##### (3) ACVR2A 遺伝子ノックアウト細胞の生物学的特徴

ACVR2A 遺伝子ノックアウト細胞は, mock 細胞と比べてその増殖能は有意に低下していた ( $P = 0.026$ )。同様に, 遊走能 ( $P < 0.001$ ), 浸潤能 ( $P = 0.029$ ) も mock 細胞と比べて低下していた (図 2.)。

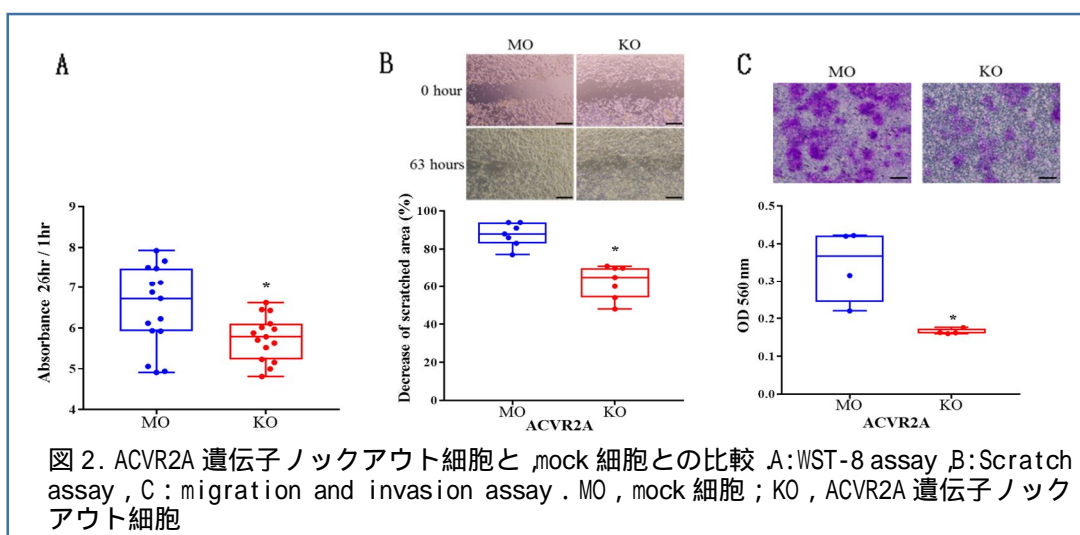


図 2. ACVR2A 遺伝子ノックアウト細胞と mock 細胞との比較 A: WST-8 assay B: Scratch assay, C: migration and invasion assay. MO, mock 細胞; KO, ACVR2A 遺伝子ノックアウト細胞

結論: 以上の結果から胃癌の発育・進展においてアクチピンシグナルが関与しており, アクチピンシグナルが下流に伝達されないことで胃癌の生物学的悪性度が低下する可能性が示された。現在, 研究成果をまとめて英文論文を執筆し投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuza Kizuki, Nagahashi Masayuki, Watanabe Satoshi, Takabe Kazuaki, Wakai Toshifumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Hypermethylation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 112103-112115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.22783	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuza K, Nagahashi M, Ichikawa H, Hanyu T, Ishikawa T, Shimada Y, Sakata J, Kameyama H, Kobayashi T, Izutsu H, Kodama K, Takabe K, Wakai T
2. 発表標題 Activin type II receptor as an affordable surrogate to identify microsatellite instability
3. 学会等名 12th Annual Academic Surgical Congress（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 油座 築, 永橋 昌幸, 市川 寛, 羽入 隆晃, 石川 卓, 中島 真人, 島田 能史, 坂田 純, 亀山 仁史, 小林 隆, 中川 悟, 井筒 浩, 兒玉 啓輔, 高部 和明, 若井 俊文
2. 発表標題 胃癌におけるマイクロサテライト不安定性とアクチビン受容体遺伝子変異の検討
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuza K, Nagahashi M, Ichikawa H, Nakajima M, Hanyu T, Ishikawa T, Shimada Y, Sakata J, Kameyama H, Kobayashi T, Nakagawa S, Sato N, Honma K, Kawasaki T, Okuda S, Takabe K, Wakai T
2. 発表標題 Association of activin type II receptor mutation with microsatellite instability in gastric cancer.
3. 学会等名 2017 ASCO Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 油座 築, 永橋 昌幸, 市川 寛, 島田 能史, 若井 俊文
2. 発表標題 胃癌におけるDNAミスマッチ修復遺伝子変異とアクチビン2型受容体遺伝子変異の検討
3. 学会等名 第5回 新潟大学医学系基礎-臨床研究交流会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuza K, Nagahashi M, Ichikawa H, Shimada Y, Nakajima M, Takabe K, Wakai T
2. 発表標題 Association between Activin receptor type 2A mutation and microsatellite instability in gastric cancer
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永橋 昌幸 (Nagahashi Masayuki)  (30743918)	新潟大学・医歯学総合病院・研究准教授  (13101)	
研究分担者	若井 俊文 (Wakai Toshifumi)  (50372470)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	
研究分担者	羽入 隆晃 (Hanyu Takaaki)  (50719705)	新潟大学・医歯学総合病院・助教  (13101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	市川 寛 (Ichikawa Hiroshi) (50721875)	新潟大学・医歯学系・助教  (13101)	
研究分担者	小杉 伸一 (Kosugi Shinichi) (90401736)	新潟大学・医歯学総合病院・特任教授  (13101)	
研究協力者	島田 能史 (Shimada Yoshifumi)		
研究協力者	中野 雅人 (Nakano Masato)		
研究協力者	茂木 大輔 (Motegi Daisuke)		
研究協力者	中野 麻恵 (Nakano Mae)		
研究協力者	臼井 賢司 (Usui Kenji)		