

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16521

研究課題名(和文) FRAS1 を標的とした胃癌肝転移特異的な治療・診断法の開発

研究課題名(英文) Fraser extracellular matrix complex subunit 1 promotes liver metastasis of gastric cancer

研究代表者

清水 大 (Shimizu, Dai)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：50723037

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)：我々は、肝転移を有する胃癌患者の原発巣で有意に発現が上昇している遺伝子群を RNA sequencingの結果から抽出し、その遺伝子群からFRAS1を胃癌肝転移関連分子として着目した。CRISPR-Cas9システムを用いてFRAS1のノックアウト株を作成し、FRAS1ノックアウトに伴い増殖能・接着能・遊走能・浸潤能が有意に低下することを示した。また、FRAS1高発現症例は有意に累積肝転移発生率が高かった。マウス肝転移モデルを用いて、FRAS1が転移巣形成においてより肝転移巣形成に重要な役割を果たしている事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌肝転移は有効な根治治療が確立されておらず致死的な病態である。胃癌が肝転移をきたすメカニズムや、肝転移を誘導する分子の解明は、胃癌の肝転移予測ならびに治療法の開発に不可欠である。今回我々はFRAS1を胃癌肝転移関連分子として同定し、その遺伝子発現が胃癌細胞の悪性度に関与することを明らかにした。また、胃癌患者コホートにおいてFRAS1発現は独立した肝転移予測因子であった。さらに動物実験では、FRAS1発現が肝転移に特徴的に関与する可能性を示した。今後、FRAS1が胃癌肝転移の予測マーカーならびに治療標的となる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recurrence pattern-specific transcriptome analysis was performed to identify liver metastasis-associated genes, and consequently FRAS1 was identified as a liver metastasis-associated gene. The proliferation of FRAS1 knockout cell line (FRAS1-KO) was attenuated compared with that of the parental cell line through increased caspase activity and alteration of the cell cycle. FRAS1-KO cells exhibited increased responsiveness to oxygen stress and diminished stemness, invasiveness, and migration. Mouse models of GC revealed decreases in tumor formation and generation of metastasis by FRAS1-KO cells. Moreover, the cumulative rate of liver recurrence was significantly increased in patients with GC with high levels of FRAS1 expression. FRAS1 contributes to the malignant potential of GC, metastasis, and liver recurrence and may therefore serve as a predictive marker or a target for treating liver metastasis.

研究分野：消化器癌

キーワード：胃癌 肝転移 FRAS1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌診療は、検診の普及や内視鏡の早期胃癌診断技術向上、およびヘリコバクターピロリ除菌療法による発癌予防によって大きく発展した。しかし、進行再発胃癌は依然として予後不良であり、克服すべき重要な課題である。進行再発胃癌に対して国内承認を得ている分子標的治療薬は、HER2 陽性胃癌に対する trastuzumab (ToGA 試験、Bang YJ, et al Lancet 2010) と、ramucirumab (Rainbow 試験、Wilke H, et al Lancet Oncol. 2014) のみである。今後これに PD-1 阻害薬が加わることが期待されているが (KEY-NOTE 試験) 個別化治療時代の到来とは言い難い。また診断的腫瘍マーカーについては、CEA・CA19-9 といった古典的マーカーの普及から 20 年以上が経つ今も感度・特異度ともに不十分のまま汎用されており、それら以上に有用な新規マーカーの実用化には至っていない。

2007 年に本邦における大規模第 Ⅲ 相臨床試験 (ACTS-GC 試験) によって胃癌の術後補助化学療法としての S-1 単独療法が有意に生存期間を延長したが (Sakuramoto S, et al. N Engl J Med. 2007) その主因は腹膜播種再発率の低下であった (Sasako M. et al. J Clin Oncol. 2011)。さらに腹膜播種においては、タキサン系薬剤の腹腔内投与を含めた新たな治療ストラテジーの開発が進んでいる (Yamaguchi H, et al. World J Gastrointest Oncol. 2015)。一方で肝転移をはじめとする血行性転移においては十分に制御されているとは言い難い。手術による肝転移の予後改善の可能性が報告され (Kodera Y, et al. Gastric Cancer. 2014) 胃癌治療ガイドライン (2014 年 第 5 版) において、はじめて胃癌肝転移に対する外科的切除に関する方向性が示されたが、肝転移に対する新たな治療手法の開発は進んでおらず、肝転移の克服は重要な課題となってきた。

2. 研究の目的

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、また転移先臓器や転移経路によってその分子学的背景は異なるとされ、これまで様々な議論がなされてきた。(Brosnan JA, et al. Semin Cell Dev Biol. 2012; 右図)。近年では次世代シーケンサーやマイクロアレイといった網羅的な解析手法により、この分子生物学的な背景が明らかにされつつある。我々は、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析を肝転移に的を絞って応用することで、肝転移に特化した鋭敏な診断マーカーおよび分子標的治療薬開発の糸口をつかむことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

・ノックアウト (以下 KO) 細胞株の樹立

FRAS1 の高発現胃癌細胞株に対して、CRISPR/Cas9 protein 法を用いたゲノム編集による KO 株を作成し、シングルセルクローニングを行い、nucleotides sequence 法にてゲノム編集の成否を確認し、KO 株を樹立する。

・FRAS1 の機能解析

上記で得られた KO 細胞株と親株の間で増殖能、浸潤能、遊走能、接着能を比較する。細胞株の増殖および浸潤能は Cell Proliferation Assay および Matrigel Invasion Assay、遊走能を Wound healing Assay、接着能を ECM Cell Adhesion Assay により評価する。

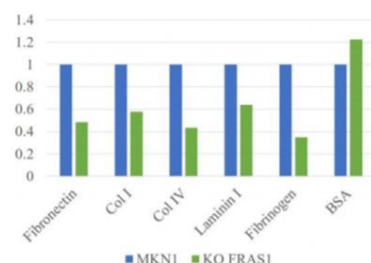
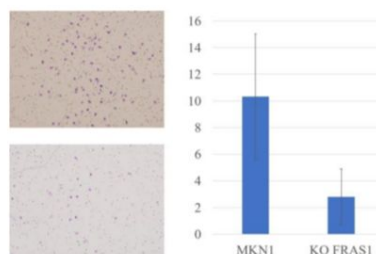
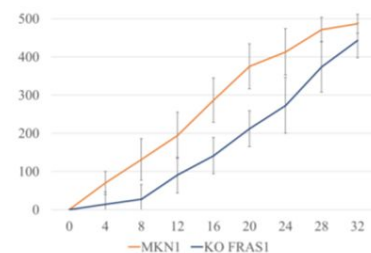
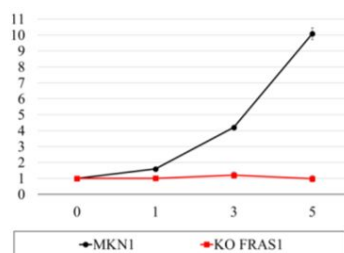
・FRAS1 発現の臨床的意義の検証

当教室が継続して胃癌患者から収集した検体を対象とする。癌部および非癌部組織中の FRAS1 mRNA 発現度を定量的 PCR 法で定量する。FRAS1 発現度と、再発形式や予後を含めた各種臨床病理学的因子との相関を検討する。

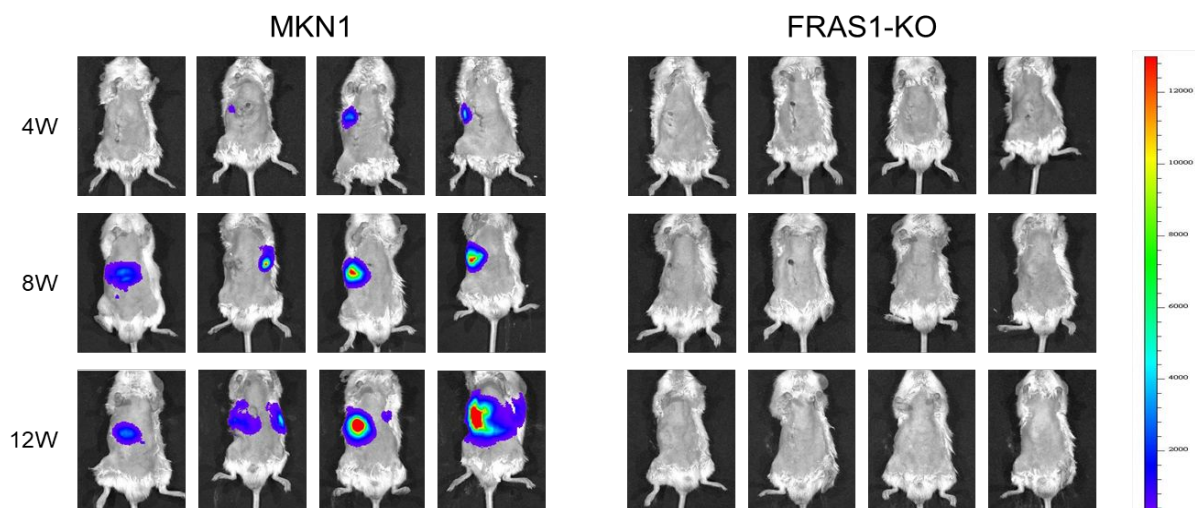
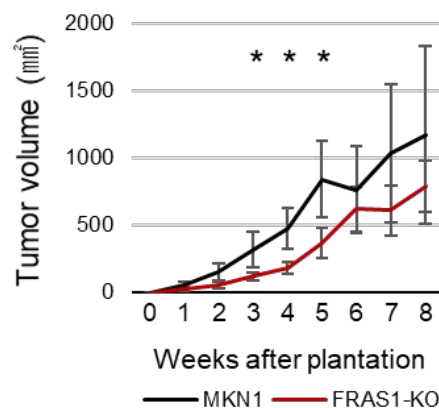
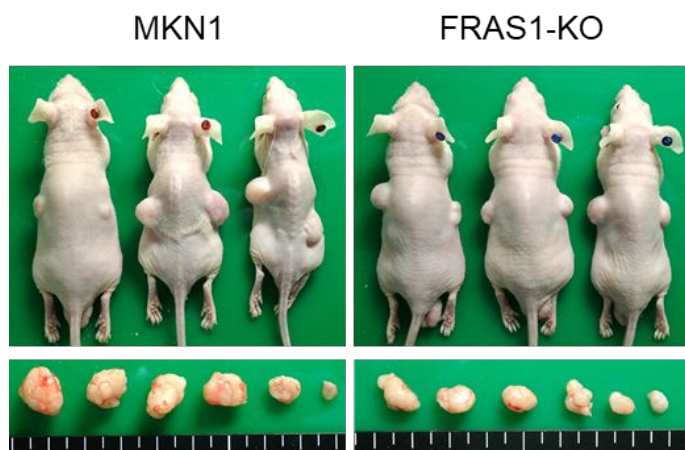
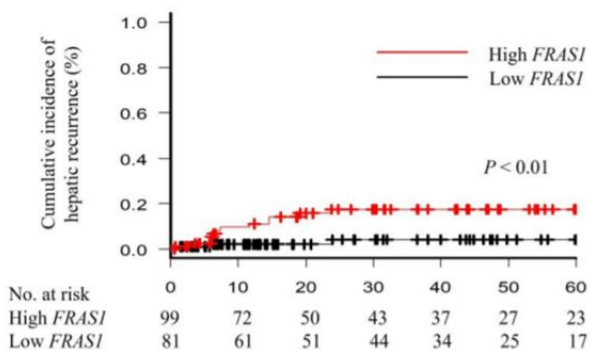
4. 研究成果

・FRAS1 の機能解析

FRAS1 ノックアウト細胞株と親株の間で増殖能 (右図左上)、浸潤能 (同左下)、遊走能 (同右上)、接着能 (同右下) を比較すると、いずれにおいても抑制されていた。



・FRAS1 発現の臨床的意義の検証
 FRAS1 mRNA 高発現奨励において、累積肝転移再発は有意に高率であった（右図）。
 ・マウス担癌モデルを用いた FRAS1 の機能評価
 皮下腫瘍モデルにおいては、FRAS1 ノックアウト細胞では親株に比べて有意に腫瘍径が小さかったが、皮下に生着し腫瘍を形成した（下図上段）。肝転移モデルにおいては、親株が肝転移を形成するのに対し、FRAS-1 ノックアウト細胞はほとんど生着しなかった（下図下段）。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- ・ 第 118 回日本外科学会定期学術集会、FRAS1 遺伝子発現と胃癌悪性度に関する検討
- ・ 第 91 回日本胃癌学会総会、FRAS1 is involved in the tumorigenesis of liver metastasis from gastric cancer
- ・ 第 119 回日本外科学会定期学術集会、ゲノム編集技術を応用した新規胃癌肝転移関連分子 FRAS1 の機能解析

〔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：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(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。