

令和元年5月23日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16538

研究課題名(和文) GNG4 およびASGR2 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) Development of Diagnostics and Therapeutics targeting GNG4 and ASGR2.

研究代表者

田中 晴祥 (TANAKA, Haruyoshi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：80793504

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)：胃癌は未だ予後不良な疾患の一つで、とりわけ肝転移を伴うものは治療法の開発が進んでいない。当研究室ではこの胃癌肝転移に着目し、これに特化した診断治療法を開発した。肝転移を伴う胃癌患者の組織を採取し解析したところ、肝転移患者に特異的に発現する(はたらく)遺伝子としてGNG4とASGR2遺伝子を発見した。これらが高発現する胃癌患者の予後は不良であった。この発現を抑えた(ノックアウト/ノックダウン、以後KO/KD)細胞は増殖力が減少した。マウスに肝転移として生着する能力はKO/KD細胞で減少した。ASGR2とGNG4の発見は胃癌肝転移に特化した診断薬・治療薬の開発につながる可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果により、転移先臓器に特異的な遺伝子発現の変動が起こるという仮説が胃癌肝転移においても成り立つことが証明された。また、胃癌肝転移に関連する遺伝子が2つ発見され、これらの分子生物学的な理解が深まったといえる。今後この2つの遺伝子を標的とした胃癌肝転移に対する新規抗癌剤や診断薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Gastric cancer is still one of the diseases with poor prognosis. Among them, strategy for stage IV gastric cancer with distant metastasis, especially liver metastasis, is currently under development. We focused on this gastric cancer liver metastasis and developed a specialized diagnostic treatment. We collected cancer tissues from gastric cancer patients with liver metastasis and found GNG4 and ASGR2 as genes that specifically function (express) in liver metastasis patients. Cells that suppressed the function of this gene (knockout/knockdown; KO/KD) had reduced proliferation. The ability forming liver metastases in mice was reduced in KO/KD cells. GNG4 and ASGR2 might to have the potential for diagnostics and/or therapeutics specifically for liver metastasis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 肝転移 網羅的解析 ASGR2 GNG4

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、ヘリコバクターピロリ除菌療法による発癌予防、検診の普及や内視鏡の早期胃癌診断能向上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。進行再発胃癌に対す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)、最近では ramucirumab (Rainbow 試験、Wilke H, et al Lancet Oncol. 2014) のみが国内承認を得ている状況である。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 年以上が経つ現在でも感度・特異度ともに不十分な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。

一方、2007 年に本邦における大規模第 3 相臨床試験 (ACTS-GC 試験) におい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)、補助化学療法により腹膜転移再発率は大きく低下しているものの (Sasako M. et al. J Clin Oncol. 2011)、肝転移をはじめとする血行性転移再発については十分に制御されているとは言い難い。胃癌治療ガイドラインにおいても第 4 版で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ており、臨床の現場では胃癌診療における肝転移の重要性が増している。

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とされており、そのメカニズムの実際については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)。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、転移のメカニズムの分子生物学的な背景が明らかにされつつある。網羅的解析法を肝転移に的を絞った発現解析に応用することで、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。

2. 研究の目的

研究代表者は、胃癌肝転移の成立に関わり、肝転移を制御するにあたり新たな治療標的となりうる分子を同定すべく、肝転移を有する胃癌症例 4 例から得られた原発巣、肝転移巣、および非癌部を対象として次世代シーケンサー HiSeq (Illumina 社) を用いて Transcriptome 解析を行った。その結果、胃非癌部に比して肝転移巣のみならず胃原発巣でも発現亢進している、すなわち原発巣で既に強発現し、転移を成立させる機能的側面を持っている可能性がある遺伝子として、シグナル伝達因子である Guanine Nucleotide Binding Protein, Gamma 4 (GNG4) を抽出した。同様に、膜輸送蛋白のひとつである Asialoglycoprotein Receptor 2 (ASGR2) も同定された。これらは、training set としての胃癌患者 78 例の mRNA 定量解析においても有望な結果が得られた。これらの予備データをもとに、本研究では GNG4 および ASGR2 を胃癌肝転移に対する診断マーカーおよび治療標的分子候補として、その発現および機能を詳細に検討していく。

- (1) *in vitro* 実験で GNG4・ASGR2 のノックアウト・ノックダウン(以下 KO/KD)細胞株を作成し、これを用いて増殖能、遊走能、接着能、浸潤能、アポトーシスについて解析する。
- (2) *in vivo* 実験で KO/KD 細胞株を用いて、マウス肝転移モデルにおける肝転移巣形成能を評価し、今後胃癌肝転移の新たな治療標的となりうるかを検討する。
- (3) 臨床検体(胃癌組織、肝転移巣組織)における GNG4・ASGR2 mRNA 発現を定量し、予後・臨床病理学的因子との相関性を解析することで、その臨床的意義を検討する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* study

KO/KD 細胞株の作成および機能解析

GNG4 の高発現胃癌細胞株である MKN1 に対して、CRISPR/Cas9 protein 法によるゲノム編集を行い、シングルセルクローニングを行う。western blotting 法にてゲノム編集の成否を確認し、KO 株を樹立する。ASGR2 については、高発現胃癌細胞株である MKN1 および N87 に

対して siRNA 法による機能阻害を行う。

GNG4・ASGR2の機能解析

上記で得られた KO/KD 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・浸潤能は Cell Proliferation Assay および Matrigel Invasion Assay、遊走能を Wound healing assay により評価する。

GNG4・ASGR2のアポトーシスおよび細胞周期への影響

GNG4・ASGR2 が胃癌細胞の悪性度に関与する背景にある機序の理解を深めるべく、flow cytometry を用いて、KO/KD による GNG4・ASGR2 のアポトーシスおよび細胞周期 G0/G1 期比への関与を調べる。アポトーシスは、Annexin V 染色により評価し、細胞周期を Muse Cell Cycle Kit により、Caspase 活性を Caspase Fluorometric Assay Kit を用いて評価する。

GNG4・ASGR2の関連分子の検索

12 種の胃癌細胞株に対して、84 の EMT 関連分子、細胞増殖およびアポトーシスに関与する主要な pathway 関連遺伝子の発現を PCR array で網羅的に定量し、GNG4・ASGR2 発現レベルとの相関を解析する。加えて、GNG4 に関しては親株および KO 細胞株について、Antibody Array 法による pathway 解析を行い、下流分子の探索を行う。

(2) in vivo study

マウス肝転移モデルにおける GNG4・ASGR2 の機能解析

前述の肝転移モデルに対して、肝転移巣形成能（数、大きさ）および生存期間について、親株と KO-GNG4 との 2 群間、および親株（non-targeting siRNA）と KD-ASGR2 との 2 群間で比較する。

(3) 胃癌組織および胃癌患者血清を用いた研究

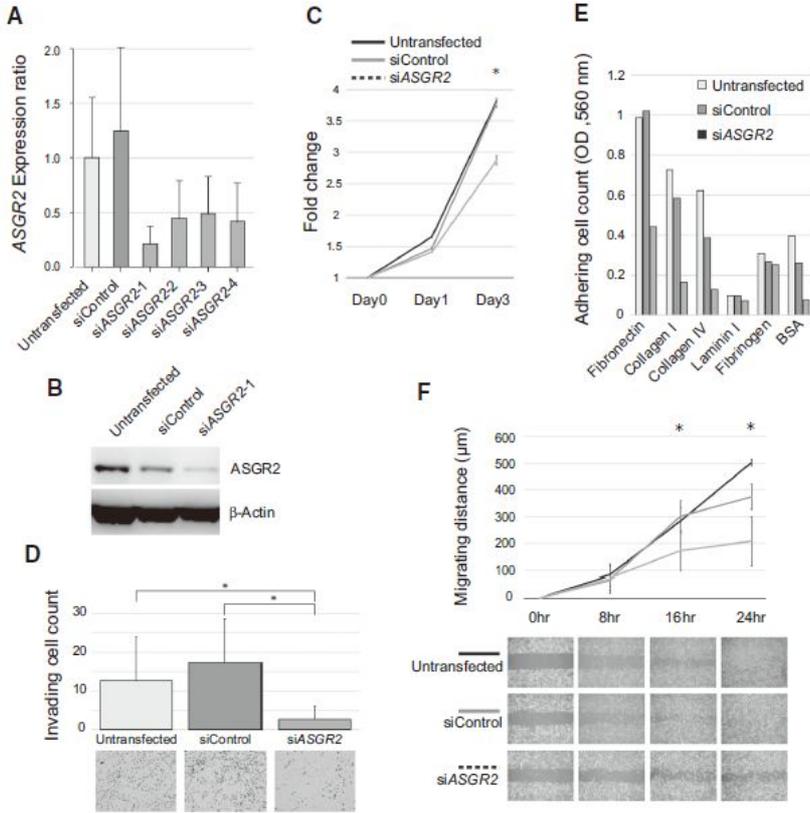
GNG4・ASGR2 発現の臨床的意義の検証

癌部および非癌部組織中の GNG4・ASGR2 mRNA 発現度を定量的 PCR 法で定量する。GNG4・ASGR2 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。

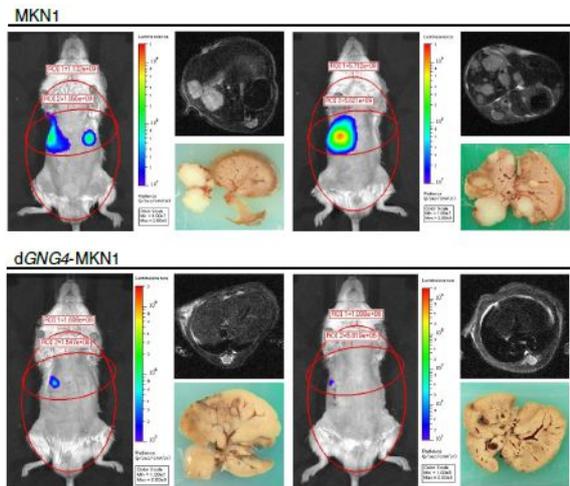
4. 研究成果

胃癌細胞株である MKN1 に対して CRISPR/Cas9 protein 法によるゲノム編集を行い、シングルセルクローニングを経て GNG4-KO 細胞株を樹立した。KO 効果は、western blotting 法にて確認した。ASGR2 については siRNA による ASGR2 mRNA 発現量低下を確認した(図 1A)。ASGR2-KD 細胞株と親株の間で増殖能、浸潤能、接着能、遊走能を比較したところ、ASGR2-KD 株では親株に比較していずれも有意に低下していた(図 1C-F)。GNG4-KO 株では、増殖能のみ低下した。Annexin V 染色では、GNG4-KO 株は親株に比較して前期アポトーシス細胞が増加していた。GNG4-KO 株ではミトコンドリア膜電位の脱分極が観察されるとともに Caspase 3 および 9 の活性が亢進しており、ミトコンドリアに関連したアポトーシス経路が活性化していることが判明した。NOD-SCID マウスの門脈内にヒト胃癌細胞株を注入することでマウス肝転移モデルを作成したところ、GNG4 および ASGR2 の KO/KD により肝転移形成能が低下した(図 2)。GNG4 および ASGR2 の mRNA 高発現群では低発現群に比べて有意に予後不良であり、とくに治癒切除後の肝再発の頻度が高いことが判明した(図 3)。

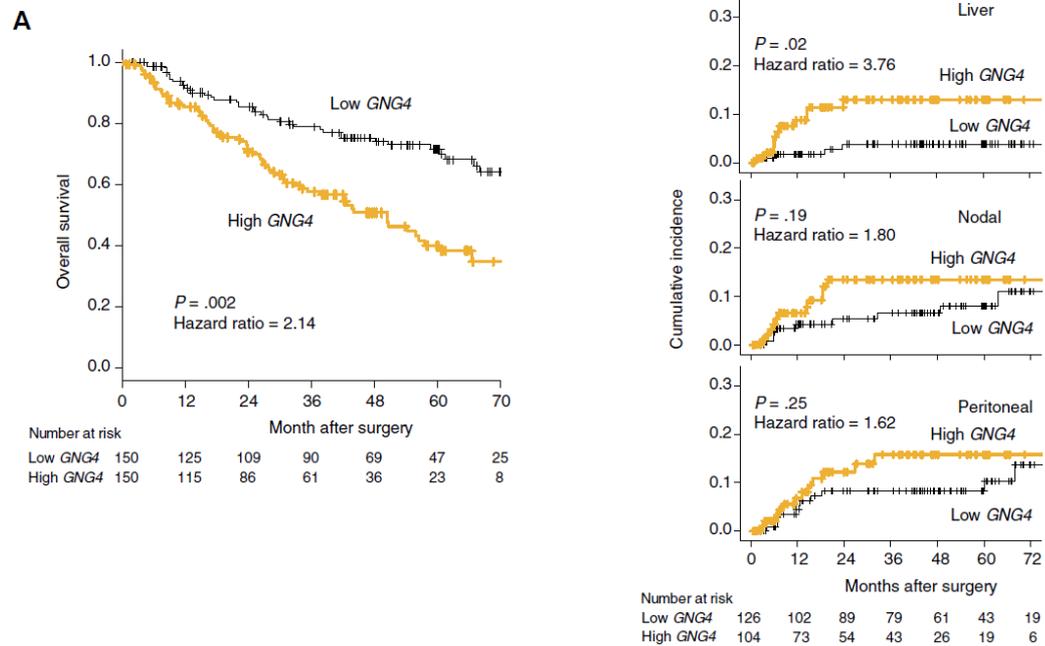
1



2



3



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Haruyoshi Tanaka, Mitsuro Kanda, Takashi Miwa, Chie Tanaka, Daisuke Kobayashi, Shinichi Umeda, Masahiro Shibata, Masaya Suenaga, Norifumi Hattori, Masamichi Hayashi, Naoki Iwata, Suguru Yamada, Goro Nakayama, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Koderu. Pattern-Specific Transcriptomics Identifies ASGR2 as a Predictor of Hematogenous Recurrence of Gastric Cancer. *Molecular Cancer Research* 16:1420-1429, 2018. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0467 査読有り

〔学会発表〕(計 6 件)

Haruyoshi Tanaka, Mitsuro Kanda, Masaya Suenaga, Masamichi Hayashi, Chie Tanaka, Suguru Yamada, Goro Nakayama, Masahiko Koike, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Koderu. Pattern-specific Transcriptomics Identifies ASGR2 as a Predictor of Hematogenous Recurrence of Gastric Cancer. 第 77 回日本癌学会学術総会 (大阪) 2018.9.29

田中晴祥, 神田光郎, 三輪高嗣, 梅田晋一, 小林大介, 田中千恵, 丹羽由紀子, 高見秀樹, 末永雅也, 服部憲史, 林 真路, 岩田直樹, 山田 豪, 中山吾郎, 杉本博行 1, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘. 胃癌転移経路別 Transcriptome 解析を用いた, 肝転移ドライバー遺伝子としての G protein subunit gamma 4 の同定. 第 118 回日本外科学会定期学術集会 (東京) 2018.4.5

Haruyoshi Tanaka, Mitsuro Kanda, Hiroyuki Sugimoto, Masamichi Hayashi, Hideki Takami, Masaya Suenaga, Naoki Iwata, Yukiko Niwa, Norifumi Hattori, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Suguru Yamada, Goro Nakayama, Masahiko Koike, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Koderu. An integrated multigene expression panel to predict long-term survival after curative hepatectomy in patients with HCC. 第 28 回日本消化器癌発生学会総会・第 9 回国際消化器癌発生会議 (熊本) 2017.11.17

田中晴祥, 神田光郎, 田中千恵, 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. Asialoglycoprotein Receptor 2 の stageII-III 胃癌における役割の検討. 第 72 回日本消化器外科学会総会 (金沢) 2017.7.22

田中晴祥, 神田光郎, 清水 大, 林 真路, 岩田直樹, 小林大介, 田中千恵, 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. Asialoglycoprotein Receptor 2 の胃癌における役割に関する検討. 第 117 回日本外科学会定期学術集会 (横浜) 2017.4.29

Haruyoshi Tanaka. Roles of asialoglycoprotein receptor 2 in gastric cancer progression. AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2017 (Washington, DC) 2017.4.4

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕 なし

6 . 研究組織

なし

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。