

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16321

研究課題名(和文)胃癌腹腔内洗浄水中のExosomeによる腹膜再発予測

研究課題名(英文) Peritoneal metastasis Prediction by exosome in washing ascites for gastric cancer

研究代表者

原田 和人 (Harada, Kazuto)

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：70608869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌の腹膜転移の症例から腹水を採取し、腹水中に含まれるExosomeと細胞のゲノムを網羅的に解析した。腹水細胞診陽性と陰性の腹水中のExosomeたんぱく発現には明らかな違いが認められた。ゲノム解析では胃癌腹水細胞のCDH1、RPL5、TAF1の変異率は腹水細胞で有意に高率であった。腹水には腫瘍細胞が多く存在する症例と間葉系の細胞が多く存在する症例があることが分かった。更に、T細胞が多いグループとT細胞がほとんど認められないグループに分かれることが明らかになった。PD1/L1の発現は両グループで低く、PD-L1とは異なる経路で免疫逃避を行っている可能性が示唆された

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌の腹膜播種は最も多くみられる転移、再発形式であり、その予後は極めて不良である。腹膜播種の分子生物学的発生メカニズムを解明し、早期診断のバイオマーカーや新規治療戦略を同定することで胃癌の予後を向上させると思われる。我々は胃癌腹膜播種症例の腹水細胞のゲノム解析を行い、腹膜に転移した悪性細胞に特徴的な遺伝子変異を同定した。さらに、免疫抑制に関与するTIM-3の発現が腹水腫瘍細胞の免疫逃避に関与している可能性が明らかにされた、あらたな免疫治療の創薬が期待される

研究成果の概要(英文)：We identified distinct alterations in peritoneal carcinomatosis versus primary lesion in patients with gastric adenocarcinoma (GAC). Alterations associated with aggressive peritoneal carcinomatosis phenotypes emerged with increased mutations in TP53, CDH1, TAF1 and KMT2C, higher level of 'clock-like' mutational signature, increase in whole-genome doublings, chromosomal instability (particularly, copy number losses), reprogrammed microenvironment, enriched cell cycle pathways, MYC activation and impaired immune response. Integrated analysis identified two main molecular subtypes: 'mesenchymal-like' and 'epithelial-like' with discriminating response to chemotherapy (31% vs 71%).

研究分野：腫瘍学

キーワード：胃癌 腹膜播種 ゲノム解析 次世代シーケンス Exosome 腫瘍免疫 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

胃癌の腹膜播種は最も多くみられる転移、再発形式であり、その予後は極めて不良である。腹膜播種の分子生物学的発生メカニズムを解明し、早期診断のバイオマーカーを同定することで胃癌の予後を向上させると思われる。Exosome は体液中に存在する直径 50nm ~ 150nm 程度の膜小胞であり、診断または治療標的バイオマーカーとしてリキッドバイオプシーの分野で注目を集めている。卵巣腫瘍においては悪性腹水中の Exosome が癌の進展に関与しており、予後予測因子としての有用性が示唆されている (Shender et al. *Mol Cell Proteomics*. 2014)。

胃癌は本邦において頻度が多い腫瘍である。医療の進歩によりその予後は改善されてきたが、腹膜転移を有する胃癌の予後は非常に不良であり、その診断および治療法の開発は喫緊の課題である。胃癌患者の腹水中の Exosome、腫瘍細胞が腹膜転移の予測、治療感受性のバイオマーカーとして有用である可能性があると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腹腔内洗浄腹水の Exosome、腫瘍細胞を網羅的に解析し、術後腹膜再発予測因子を同定することである。細胞診を行った胃癌患者に対する個別化医療を進める事は胃癌患者の生存期間の延長に非常に貢献すると考えられる。胃癌治療における個別化医療を推進するためには、腹膜転移を予測することが必須であり、この研究による成果は translational research として臨床に直結する意義深いものになると考えられる。

3. 研究の方法

A) 臨床検体からの腹水採取

当科および共同研究先である MD Anderson Cancer Center で胃癌の腹膜転移に対して腹水穿刺および腹腔内洗浄細胞診が行われた患者より腹水を採取し保存した。

B) 術後腹膜再発に関する Exosome たんぱくの同定

腹水から密度勾配超遠心法を用いて Exosome を抽出する。

Exosome たんぱくを Reverse phase protein array (RPPA)を用いて比較し、細胞診陽性例の Exosome に発現が強いたんぱくを同定する

C) 腹水細胞からのゲノム抽出

腹水より遠心分離により細胞分画を抽出する。細胞分画より DNA, RNA を抽出する。

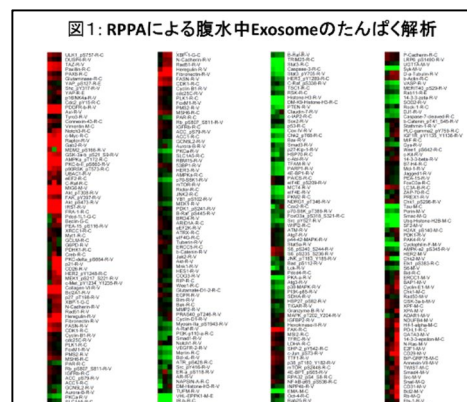
D) 腹水細胞のゲノム解析 (DNA/RNA sequencing)

Exome sequencing と RNA sequencing に提出しゲノムの網羅的解析を行う。

4. 研究成果

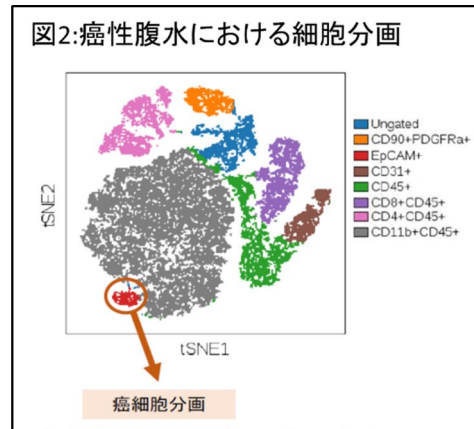
A) 癌性腹水中の Exome タンパク質の網羅的解析

洗浄細胞診陽性例と陰性例の Exosome たんぱくを Reverse phase protein array (RPPA)を用いて比較し、細胞診陽性例の Exosome に発現が強いたんぱくを同定した (図1)。細胞診陽性症例と陰性症例では Exosome のたんぱく発現に大きな相違があることが明らかにされた。



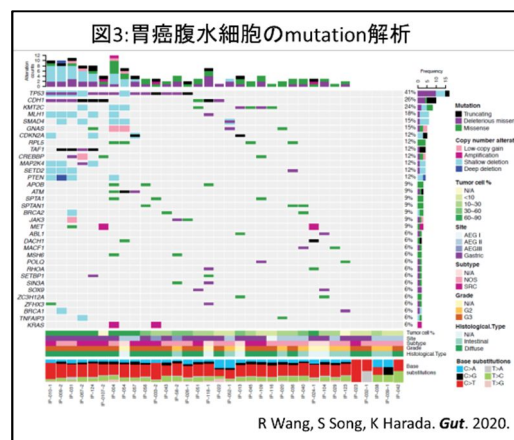
B) 癌性腹水のタンパク質・細胞分画解析

腹水中には様々な細胞分画が含まれているため、癌性腹水サンプルを用いて、マスサイトメトリー(シングルセルプロテオミクス)を当科にて行い、腹水細胞分画、細胞内シグナル解析を行った。腹水検体を用いてマスサイトメトリーを行い、各種細胞表面マーカーを用いて癌細胞、血球系細胞、内皮細胞、線維芽細胞の分離同定に成功した(図2)。今後は癌細胞のみならず腹水中の免疫細胞、中皮細胞、CAF、TAM などの腫瘍微小環境とのクロストークに与するシグナル・分子を同定する。

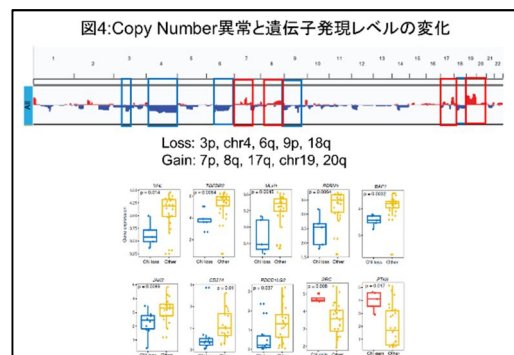


C) 次世代シーケンサーによるゲノム解析

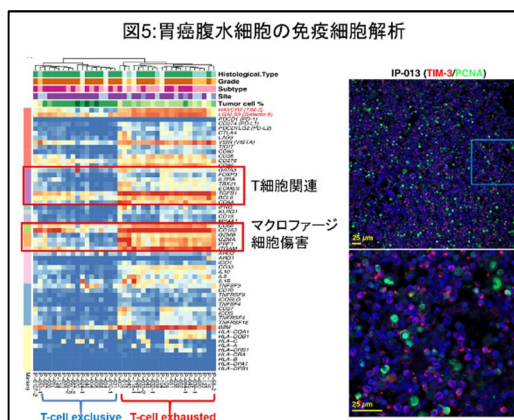
胃癌腹膜転移の腹水細胞の網羅的ゲノム解析を行った。胃癌腹水細胞の遺伝子変異率は2.42/Megabaseであり、これまでの原発巣での報告3.04/Megabaseと腹水細胞と原発巣で大きな差は認めなかった。腹水細胞にMSIは認めなかったTP53、CDH1、KMT2C、MLH1の変異率が高く、それぞれ41%、26%、24%、18%であった。以前の原発巣の報告と比較して、CDH1、RPL5、TAF1の変異率は腹水細胞で有意に高率であった(図3: Harada K. Gut. 2019)。



遺伝子のコピー数異常を調べると、原発巣と比較して腹水細胞では、3p, chr4, 6q, 9p, 18q領域でコピー数のloss、7p, 8q, 17q, chr19, 20q領域でコピー数のgainが有意に認められ、その領域の遺伝子の発現レベルに差が認められた(図4: Harada K. Gut. 2019)。



腹水細胞の遺伝子発現特徴から腫瘍細胞と間葉系細胞の特徴を分類した。腹水には腫瘍細胞が多く存在する症例と間葉系の細胞が多く存在する症例があることが分かった。特に、免疫関連細胞について解析すると、T細胞が多いグループT-cell exhaustedタイプとT細胞がほとんど認められないT-cell exclusiveタイプに分かれることが明らかになった。PD1/L1の発現は両グループで低く、腹水中の腫瘍細胞はPD-L1とは異なる経路で免疫逃避を行っている可能性が示唆された。特に、



T-cell exclusive タイプでは免疫抑制に関与する TIM-3 の発現が有意に高く、TIM-3 が腹水腫瘍細胞の免疫逃避に関与している可能性が明らかにされた(図 5: Harada K. Gut. 2019)。

D) in vitro・in vivo での機能解析

腹水細胞中の癌関連繊維芽細胞 (CAF) から抽出した extracellular vesicles (EVs) が発現する AnnexinA6 は Integrin $\alpha 1$ を細胞膜上に安定化し、細胞外マトリックスとの相互作用を介した FAK/Akt シグナル活性化により抗癌剤への抵抗性を示すことを明らかにした。腹膜播種モデルマウスを用いた検証において、CAF-EVs が促進する FAK シグナルが抗癌剤抵抗性獲得に関わることを示した。s

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 0件）

1. 著者名 Wang R, Song S, Harada K(Equally first author), et al.	4. 巻 69
2. 論文標題 Multiplex profiling of peritoneal metastases from gastric adenocarcinoma identified novel targets and molecular subtypes that predict treatment response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 18~31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/gutjnl-2018-318070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Uchihara T, Ishimoto T, Miyake K, Yonemura A, Yasuda T, Itoyama R, Iwatsuki M, Baba Y, Yoshida N, Baba H
2. 発表標題 Extracellular vesicles from cancer associated fibroblasts induce drug resistance via integrin 1/FAK signaling in gastric cancer cells.
3. 学会等名 AACR annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村文優、石本崇胤、秋山貴彦、上村紀雄、安田忠仁、米村敦子、伊東山瑠美、内原智幸、東孝暁、今井克憲、林洋光、山下洋市、馬場秀夫
2. 発表標題 Identification of aberrant proteins involved in peritoneal dissemination of pancreatic cancer.
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----