

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16718

研究課題名（和文）in silico解析で同定した胃癌新規癌遺伝子の生物学的意義と臨床的意義

研究課題名（英文）The biological and clinical significance of the novel GC oncogenes that were identified by in silico analysis

研究代表者

胡 慶江 (HU, Qingjiang)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80792902

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）：胃癌腹膜播種の責任遺伝子候補としてLOXL1を同定し、論文報告しました。胃癌局所免疫環境を反映するCYT scoreの臨床的意義を明らかにし、論文報告しました。胃癌免疫療法であるニボルマブの稀な有害事象を経験し症例報告しました。さらに胃癌新規責任遺伝子OSBPL3を同定し、その生物学的意義及び臨床的意義を明らかにして論文作成しました。現在投稿中です。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌進行の責任遺伝子を同定することで、その根底にあるメカニズムを明らかにし、新たな胃癌の治療法と検査法の開発につながります。胃癌の予後改善に寄与することが予想されます。また、胃癌における免疫療法が盛んに研究されていますが、その治療効果予測因子が少ない現状です。我々はCYT scoreが胃癌局所免疫を反映することを証明し、免疫療法の治療効果予測因子になりうることを提示しました。これも胃癌の予後改善に寄与することが予想されます。

研究成果の概要（英文）：We identified LOXL1 as a candidate gene responsible for peritoneal dissemination of gastric cancer and reported it in a paper. We clarified the clinical significance of the CYT score, which reflects the local immune environment of gastric cancer, and reported it in a paper. We experienced a rare adverse event of nivolumab therapy in gastric cancer, and reported it in a paper. Furthermore, we identified OSBPL3 as a novel oncogene, and clarified its biological and clinical significance in gastric cancer.

研究分野：胃癌

キーワード：胃癌 腫瘍学 CYT LOXL1 OSBPL3 免疫チェックポイント 癌遺伝子 腫瘍局所環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は世界で最も罹患率の高い悪性腫瘍の一つであり、日本では2番目に多い罹患数、3番目に多い死亡数を有する癌腫である。Cancer Statistics in JAPAN-2015によると、胃癌の5年生存率は stage I: 97.2%、stage II: 66.0%、stage III: 47.2%、stage IV: 7.2%である。進行胃癌は依然予後不良であり、手術のみでは治癒が困難で化学療法、放射線療法、免疫療法を含めた集学治療が必要である。分子標的治療薬は多くの癌患者の予後を改善している¹⁾。しかし、ここ10年間胃癌で承認された新規キードラッグはラムシルマブのみであり、新規治療標的の同定が待たれている状況である。

2. 研究の目的

①胃癌の公共データベースを用いた *in silico* 解析で新規癌遺伝子 OSBPL3 を同定した。本研究は OSBPL3 の胃癌における生物学的意義と臨床学的意義を明らかにし、その根底にあるメカニズムを探索することを目的とした。

②また、*in silico* 解析の段階で OSBPL3 以外のドライバー遺伝子候補 LOXL1 等を同定しており、その意義の解明も目的とした。

③胃癌免疫治療が注目されており、治療効果予測バイオマーカーの同定も目的とした。

3. 研究の方法

①胃癌細胞株 (MKN1、MKN28、MKN45、MKN74、AGS、NUGC3、NUGC4、SH10TC) を選定する。RT-qPCR を行い、発現量の高い細胞株を2種類ずつ選ぶ。ノックアウト細胞株をそれぞれ樹立する。サンガーシーケンス、RT-qPCR、ウェスタンブロットで確認しておく。増殖能を評価するために、MTT 試験とコロニー形成アッセイを行う。播く細胞数はそれぞれの細胞増殖速度に従って予め決めておく。さらに6~8週 BALB/c nu/nu マウスの背部皮下に胃癌細胞を接種し、Xenograft マウスを作製して、生理的な状況下での増殖能を評価する。細胞周期の評価はPIによるDNA染色とフローサイトメトリを用いて行う。胃癌組織のパラフィン包埋切片を用いて、OSBPL3 の免疫組織化学染色を行う。OSBPL3 ノックアウト胃癌細胞株からRNAを抽出し、RNAシーケンスを行う。そのデータに基づいて pathway 解析 (Gene Set Enrichment Analysis と DAVID) を行って、OSBPL3 と強く相関する経路をピックアップする。Pathway 解析の結果に従って、実験を追加する。また文献報告から、OSBPL3 は胃癌細胞において R-Ras/Akt 経路を活性化する可能性が示唆されている。Active Ras Pull-down とウェスタンブロットを行い、OSBPL3 の R-Ras/Akt 経路に対する影響を調べる。

②LOXL1 発現量低い細胞株を同定し、過剰発現細胞株を樹立する。増殖能、遊走能、浸潤能について調べる。EMT との関連を調べるため、EMT マーカーの発現量変化をPCRとWBで評価する。当院胃癌症例を用いて LOXL1 発現量の臨床病理学的因子及び予後との関連を調べる。

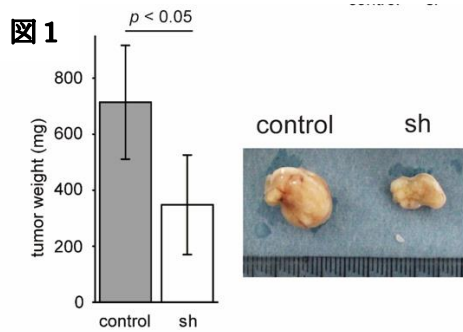
③TCGA 胃癌データセットを用いて、GZMA と PRF1 両遺伝子の発現量を測定し、CYT score (GZMA と PRF1 発現量の幾何平均) を計算する。CYT score と予後、胃癌分子サブタイプ、免疫チェックポイント阻害薬治療効果との関連を調べる。

4. 研究成果

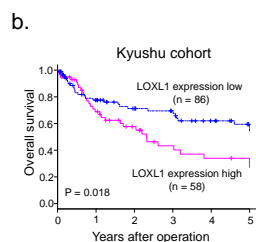
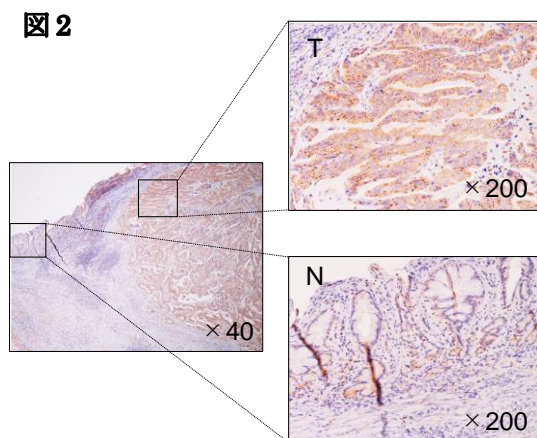
①OSBPL3 発現の高い胃癌細胞株を二つ選択し、後続の実験を行なった。OSBPL3 を siRNA と shRNA でそれぞれノックダウンし、増殖能、遊走能、浸潤能、細胞周期進行の変化を評価し、OSBPL3 の胃癌細胞表現型に対する影響を検討した。OSBPL3 ノックダウン胃癌細胞株においては、増殖能が抑制され、細胞周期の進行も阻害されたことを確認した。また、Xenograft mouse を作製し、生理的な状況下で OSBPL3 ノックダウンによる胃癌細胞増殖能の低下を確認した (図1)。一方、OSBPL3 のノックダウンにより、浸潤能と遊走能に有意な変化が見られなかった。OSBPL3 は胃癌細胞の細胞周期進行と増殖能に関与すると考えられた。

また当院の胃癌組織にて OSBPL3 の免疫染色を行った。OSBPL3 は腫瘍周囲の間質細胞や非癌組織細胞よりも癌細胞に高発現していることを確認した。また、二つの胃癌データセット (公共データベース) を用いて、OSBPL3 mRNA 高発現が予後不良規定因子であることを確認した。臨床病理学因子の検討においては OSBPL3 mRNA 高発現が高分化、深達度 (T3 以上)、リンパ節転移、Stage III 以上と有意に関連していた。

OSBPL3 が胃癌細胞の増殖能と細胞周期進行、予後不良に関与するメカニズムを調べるため、OSBPL3 ノックダウン胃癌細胞株から RNA を抽出し、RNA-seq に提出した。RNA-seq を用いた pathway 解析の結果は OSBPL3 が RRAS/Akt pathway と関連することを示唆した。pull down assay にて OSBPL3 が RRAS/Akt pathway と関連することを認めた。OSBPL3 は RRAS/Akt を介して胃癌増殖能を促進し、予後不良に寄与すると結論づけた。

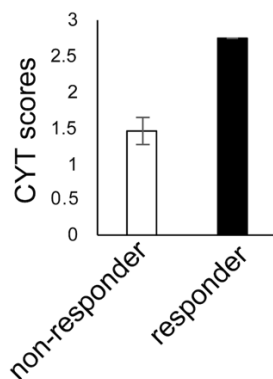


②LOXL1 は胃癌組織に高発現しており、その高発現が腹膜播種及び予後不良と関連していた (図 2)。LOXL1 を高発現させると、CDH1 発現量低下し、VIM、SNAI2 発現上昇したことを認めた。また、LOXL1 高発現細胞株は野生型と比べ、運動能が上昇したことを認めた。LOXL1 は EMT を介して、胃癌腹膜播種と予後不良に寄与すると考えられた。



③CYT score は高い群が低い群と比べ、抗腫瘍免疫が高く、予後良好であった。また、CYT 高値は MSI、EBV タイプの胃癌と有意に関連していた。さらに免疫チェックポイント阻害薬奏効症例における CYT score は非奏効症例に比べ、高値であった (図 3)。CYT score は胃癌の局所免疫と関連しており、予後予測因子だけではなく、免疫チェックポイント阻害薬の効果予測因子になりうると考えられた。

図 3 Kyushu cohort B



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Qingjiang Hu, Takaaki Masuda, Shotaro Kuramitsu, Taro Tobo, Kuniaki Sato, Shinya Kidogami, Sho Nambara, Masami Ueda, Yusuke Tsuruda, Yosuke Kuroda, Shuhei Ito, Eiji Oki, Masaki Mori, Koshi Mimori	4. 巻 -
2. 論文標題 Potential association of LOXL1 with peritoneal dissemination in gastric cancer possibly via promotion of EMT	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0241140. eCollection 2020.	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 -

1. 著者名 Qingjiang Hu, Hirofumi Hasuda, Kenji Ueki, Akihiro Tsuchimoto, Yoko Zaitzu, Yasuo Tsuda, Yuichi Hisamatsu, Yuichiro Nakashima, Koji Ando, Yasue Kimura, Eiji Oki, Masaki Mori	4. 巻 9
2. 論文標題 Reintroduction of nivolumab in a patient with gastric cancer after improvement of nivolumab-induced acute interstitial nephritis: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Cancer Conf J .	6. 最初と最後の頁 127-132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13691-020-00418-2.eCollection 2020 Jul.	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 -

1. 著者名 Qingjiang Hu, Kentaro Nonaka, Hiroaki Wakiyama, Yu Miyashita, Yoshiaki Fujimoto, Tomoko Jogo, Kentaro Hokonohara, Ryota Nakanishi, Yuichi Hisamatsu, Koji Ando, Yasue Kimura, Takaaki Masuda, Eiji Oki, Koshi Mimori, Yoshinao Oda, Masaki Mori	4. 巻 -
2. 論文標題 Cytolytic activity score as a biomarker for antitumor immunity and clinical outcome in patients with gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Med.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.3828. Online ahead of print.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 蓮田 博文、胡 慶江
2. 発表標題 当科での使用経験から見た胃癌に対するニボルマブの臨床意義
3. 学会等名 第76回消化器外科学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Qingjiang Hu
2. 発表標題 LOXL1 is a novel responsible gene for peritoneal dissemination potentially via promoting EMT and motility in gastric cancer
3. 学会等名 AACR (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Qingjiang Hu
2. 発表標題 LOXL1 is a novel responsible gene for peritoneal dissemination potentially via promoting EMT and motility in gastric cancer
3. 学会等名 7th international Conference of Federation of Asian Clinical Oncology (FACO) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 胡 慶江
2. 発表標題 Potential association of LOXL1 with peritoneal dissemination in gastric cancer via promotion of EMT
3. 学会等名 第120回日本外科学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------