

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591930

研究課題名(和文) 網羅的チロシンキナーゼ解析による胃癌新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文) The exploration of novel therapeutic target in gastric cancer by comprehensive tyrosine-kinase analysis

研究代表者

山崎 誠 (Yamasaki, Makoto)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50444518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌における網羅的遺伝子発現解析の結果から胃癌の発育進展特に腹膜播種に関連する新規チロシンキナーゼおよびその関連分子の同定を行った。結果KSR1, MEK, Her2, FGFR1というチロシンキナーゼの同定を行いKSR1発現が腹膜播種に関連することが明確。またMEK発現との相同性の極めて高い発現パターンを示すFOXM1やHer2, FGFR1の下流で制御するDOK2, REGIVの3つの分子を同定しそれぞれ予後因子かつタキサン系抗がん剤の感受性との関連予後因子腹膜播種の予測因子としての有用性を示すことができた。胃癌の発育進展に関わるシグナル伝達の解明および新規分子標的治療の開発に向けて今後期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the comprehensive gene expression in gastric cancer to explore the novel tyrosine-kinase related to the development of cancer, especially peritoneal dissemination. Then the novel and well-known tyrosine-kinases; KSR1 and MEK, Her2 and FGFR1 were identified. KSR1 is a tyrosine-kinase that functions as positive regulator of Ras pathway, and associated with the cell motility, invasion and peritoneal dissemination. FOXM1, DOK2 and REGIV are identified as the downstream molecules of the tyrosine-kinases, MEK, Her2 and FGFR1, respectively in consequence of the analysis of the correlativity between the pathways of these tyrosine-kinases and gene expression analysis. It was shown that these molecules related with the prognosis, peritoneal dissemination and the sensitivity of anticancer drug. This result may enable us to elucidate the signaling related to the biological character of gastric cancer and develop the novel molecular-targeted agent.

研究分野：消化器外科、上部消化管外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃癌 チロシンキナーゼ 腹膜播種

1. 研究開始当初の背景

近年、分子標的治療としてEGFR, BCR-ABL, VEGFR などのチロシンキナーゼ阻害剤が臨床応用されている。最近、胃癌においてもHER2 阻害剤の有効性が示されたが、投与対象となる免疫染色陽性の HER2 陽性例は僅か 22%に過ぎない。

2. 研究の目的

癌化には血管新生などほぼ全ての癌で普遍的にもつ特性と、転移・抗癌剤感受性など個別の特異性に分けられ、それぞれに異なるチロシンキナーゼが関与していると想定される。今回、胃癌の予後に最も強く関連する腹膜播種に注目し、特異的に発現増強するチロシンキナーゼの同定を試みる。

3. 研究の方法

1) 胃癌における網羅的チロシンキナーゼ発現解析

ヒト全遺伝子型 DNA チップを用いて進行胃癌に対して切除術を施行した胃癌原発巣における Tyk 133 遺伝子の発現量を取得する。全てのチロシンキナーゼの発現量を正常胃粘膜と癌部で比較する。それぞれのチロシンキナーゼについて、癌部で亢進している症例と正常と同様もしくは正常より低下している症例の 2 群に分け、ほぼ全症例において発現の亢進しているチロシンキナーゼと特定の症例において発現の亢進しているチロシンキナーゼについてそれぞれ解析を行う。一部の症例でのみ発現亢進するチロシンキナーゼは胃癌の生物学的特徴に起因していると考えられるため、臨床病理学的因子との関連を解析する。特に腹膜播種に関連するチロシンキナーゼについて解析を行う。

2) 蛋白発現解析

遺伝子発現解析から同定したチロシンキナーゼについて、タンパクレベルでの発現を解析する。免疫染色における癌部での発現の局在や強度を解析し、遺伝子発現との相動性を解析するとともに臨床病理学的因子との関連性も再度検討する。

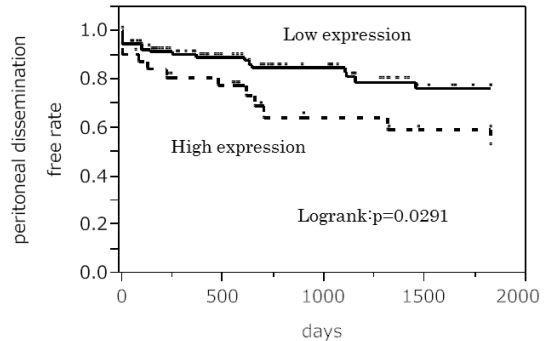
3) 前向きコホートによるデータの検証

多施設共同で進行癌における切除後腹膜播種診断の前向きコホート研究が進行中であり、これらの症例を対象とした検証を行う

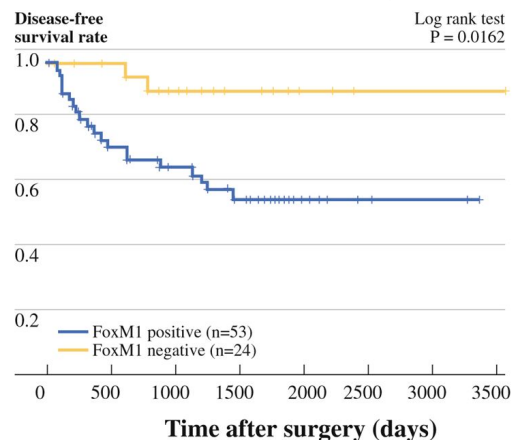
4. 研究成果

1) 進行胃癌におけるチロシンキナーゼの網羅的遺伝子発現解析の結果から、新たに KSR1 という分子の発現レベルが予後に関連することを見出した。この分子は Ras 経路の positive regulator として働き、raf や MEK, ERK とともに働いて、細胞増殖や transformation に関係すると報告されている。これまで、子宮体がんや膀胱癌で発現異常があるといわれていたが胃癌においては報告がない。そこで、臨床検体における KSR1 の発現と臨床病理学的因子との関連を解析した。KSR1 発現の亢進は約 25%の症例で認め

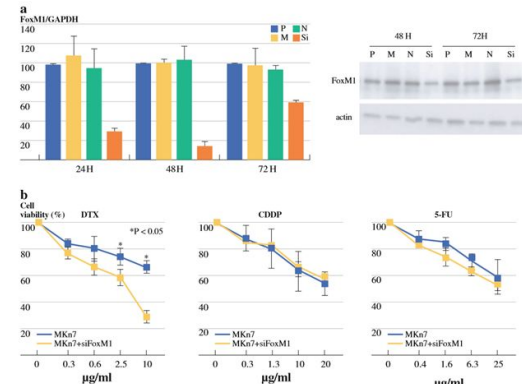
ており、高発現する症例においては有意に予後が不良であった。また、予後が不良となる原因を解析したところ、特に腹膜播種との関連が示唆された。in vitro における KSR1 の発現制御(強制発現、発現抑制)実験から、KSR1 は細胞増殖のみならず細胞浸潤に関与することが明らかになった。



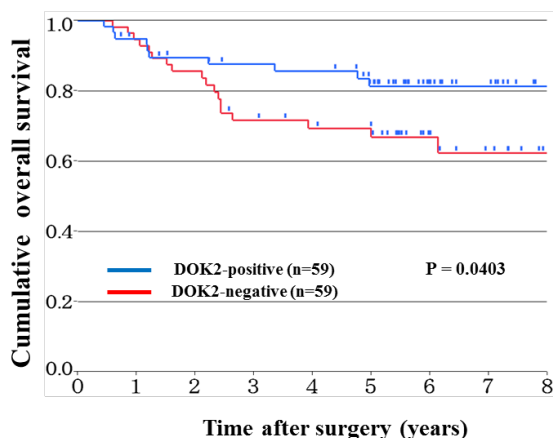
2) 網羅的遺伝子発現解析の結果から MEK の発現と予後に関連があることが示された。さらに MEK と遺伝子発現パターンの似ている遺伝子をクラスター解析したところ、FOXM1 という分子が同定された。臨床検体における FOXM1 発現と臨床病理学的因子との関連を解析したところ、FOXM1 発現は独立した予後因子であることが明らかになった。



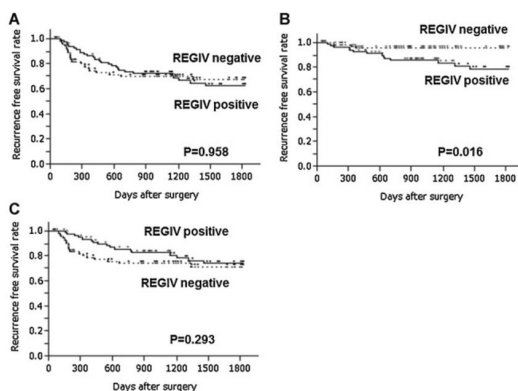
また、タキソテルによる化学療法の感受性と有意に関連することが明らかになった。タキソテルの感受性について、in vitro においても同様の結果が得られ、FOXM1 は化学療法感受性因子であることが示唆された。この結果については、論文(Annals of Surgical Oncology)に報告した。



3) Her2/Neu というこれまでも胃癌での過剰発現および予後関連因子として報告のある分子が同定された。この分子はすでに発現を抑制する抗体(トラスツズマブ)が保険適応にもなっており、新規に同定された予後因子ではない。しかしながら、Her2の発現と下流のシグナルの活性の関連を解析したところ、Her2の発現と活性化が必ずしも一致しないことが判明した。したがって、Her2の下流での制御存在すると考え、網羅的遺伝子発現解析結果を用いてHer2の下流分子の発現解析を行ったところ、Her2のネガティブレギュレーターであるDOK2の発現が予後に関連することが明らかになった。DOK2の高発現する症例では、低発現の症例に比べて有意に予後が良好であり、独立した予後因子であった。また、このDOK2の発現はゲノム数と強い関連をしめしており、haploinsufficientな胃癌抑制遺伝子である可能性が示唆された。この結果は論文(Annals of Surgical Oncology)に報告した。



4) 胃癌術後の再発に関連するチロシンキナーゼとしてFGFR1を同定した。FGFR1高発現症例のうち、腹膜播種に関連する分子をさらに解析したところ、FGFの下流にあるREGIV遺伝子の発現が腹膜播種再発に関連することが明らかになった。さらに、手術時に採取した腹腔内洗浄液を用いて、REGIV遺伝子発現と腹膜播種再発との関連を解析したところ、REGIV高発現症例では有意に腹膜播種再発が高頻度であるこ



とが明らかになった。この結果は論文(Journal of Surgical Oncology)に報告した。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)  
Miyagaki H1, Yamasaki M, Takahashi T, Kurokawa Y, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Fujiwara Y, Mori M, Doki Y. DOK2 as a marker of poor prognosis of patients with gastric adenocarcinoma after curative resection. Ann Surg Oncol. 2012 May;19(5):1560-7.

Okada K1, Fujiwara Y, Takahashi T, Nakamura Y, Takiguchi S, Nakajima K, Miyata H, Yamasaki M, Kurokawa Y, Mori M, Doki Y. Overexpression of forkhead box M1 transcription factor (FOXM1) is a potential prognostic marker and enhances chemoresistance for docetaxel in gastric cancer. Ann Surg Oncol. 2013 Mar;20(3):1035-43

Moon JH1, Fujiwara Y, Nakamura Y, Okada K, Hanada H, Sakakura C, Takiguchi S, Nakajima K, Miyata H, Yamasaki M, Kurokawa Y, Mori M, Doki Y. REGIV as a potential biomarker for peritoneal dissemination in gastric adenocarcinoma. J Surg Oncol. 2012 Feb;105(2):189-94.

〔学会発表〕(計1件)  
岡田かある、胃癌におけるFoxM1の発現と薬剤耐性についての検討、第112回日本外科学会定期学術集会2012年4月12日、千葉

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 誠 (Yamasaki Makoto)  
大阪大学医学部附属病院消化器外科・助教  
研究者番号：50444518

(2) 研究分担者

瀧口 修司 (Takiguchi Shuuji)  
大阪大学医学部附属病院消化器外科・講師  
研究者番号：00301268

宮田 博志 (Miyata Hiroshi)  
大阪大学医学部附属病院消化器外科・講師  
研究者番号：80362713

黒川 幸典 (Kurokawa Yukinori)  
大阪大学医学部附属病院消化器外科・助教  
研究者番号：10470197

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：