

令和元年5月19日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10518

研究課題名(和文)胃癌における変異RHOAの機能解明と治療への応用

研究課題名(英文)Functional significance of the RHOA mutation in gastric cancer

研究代表者

芹澤 朗子 (Serizawa, Akiko)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：70408491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、11種類の消化管腫瘍の細胞株のRHOAの遺伝子型を確認した。RHOAノックダウンによる増殖抑制はRHOA野生株・変異株ともにみられ、逆もまた然りであった。しかし、トランスクリプトーム解析により、RHOA変異株のRHOAノックダウンでは、Inc-DEA-1が共通して発現低下することを発見した。さらにRHOAノックダウンで増殖抑制を示した細胞株では、小分子代謝と酸化還元に関与する遺伝子群が共通して発現低下することを発見した。本研究によって、RHOAノックダウンは、代謝の必須分子の発現低下からの代謝性ストレスを引き起こし、細胞増殖の抑制を誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、RHOA・変異RHOAの機能が消化管腫瘍のtumorigenicityに与える影響が明らかとなり、治療標的の候補となり得る経路・下流遺伝子の情報を網羅的な解析の中より得ることができた。このことは、今後消化管腫瘍のRHOA機能に関連する分子標的治療のstrategyを決定する上で不可欠と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We determined genotypes of RHOA in 11 gastrointestinal cancer cell lines. Attenuated proliferation was observed both in RHOA knockdown cells with RHOA mutation and in those without RHOA mutation, and vice versa. However, through transcriptome analyses, we revealed that downregulation of Inc-DEA-1 was common after the RHOA knockdown in the RHOA-mutated cell lines. We also found that the genes associated with metabolism of small molecules and oxidation-reduction process were commonly downregulated in cells whose proliferation was attenuated by the knockdown of RHOA. These results suggest that knockdown of RHOA may induce metabolic stress by downregulating the essential cellular metabolic molecules and attenuation of cellular proliferation.

研究分野：消化器外科学

キーワード：RHOA 消化管腫瘍 増殖抑制 3次元スフェロイド培養 RNA干渉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は本邦における臓器別癌罹患数で第1位、死亡数で第2位(最新がん統計、国立がん研究センター)であり、依然として個々の患者の予後及び国民保健上大きな問題となっていた。特に、diffuse type の胃癌は浸潤傾向が強く、また、腹膜播種を形成する事が多く、予後不良であった。2010年には切除不能のHER2陽性胃癌に対する化学療法においてTrastuzumabの上乗せ効果が示されたものの、diffuse type の胃癌でのHER2陽性率は低く、Trastuzumab投与の適応となることは稀であった。近年の癌に対する分子標的治療法の開発には目覚ましいものがあるが、胃癌についてはわずかに前述したHER2の例があるものの、他には無く、有効な分子標的の同定と治療薬開発が切望されていた。

2014年に胃癌の全ゲノム解析より、diffuse type の胃癌に特異的な遺伝子変異としてRHOA変異が同定された。RHOAはRasスーパーファミリーに属する191個のアミノ酸からなるsmall GTPase 蛋白RHOAをコードする遺伝子である。RHOAはGTPと結合して活性化し、actin organization cell migration cytokinesis cell cycle に関与する事が報告されていた。胃癌で見出された変異RHOAの機能についてはloss-of-functionとする報告、gain-of-functionとする報告の何れもあり、不明であった。RHOA変異はN末側に多く、特に、codon 5、17、42のミスセンス変異が多くhotspotsとされていた。

これらhotspot mutationはgain-of-functionであることが示唆されているもののその詳細は明らかになっていなかった。17、42番目のcodonの変異を持つ細胞では変異RHOAをノックダウンすることにより細胞増殖の抑制が起こる事が示されているが、その機構は不明であった。RHOAが細胞骨格のリモデリング、運動に関与する分子である事からこれら変異RHOAが浸潤、転移において重要な働きを担っていると仮定されていたが、それについてもgain-of-functionかloss-of-functionか明らかにはされていない。さらには、変異RHOAを標的とする事が実際に癌の生存、増殖、浸潤、転移に対し有効な治療法となるか否かについても具体的には示されていない。

よって、変異RHOAによる表現型の変化とその分子機構を明確にし、RHOAが治療標的として有効か否かを解析することは、今後具体的にRHOA変異の胃癌に関連する分子標的治療のstrategyを決定する上で不可欠と考えられた。

2. 研究の目的

変異RHOAが胃癌細胞生存、増殖、浸潤、転移に果たす役割とその分子機構を解明し、RHOAが胃癌において分子標的として有効か否かを検証する事を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

- (1) 胃癌を含む消化管腫瘍由来の細胞株(GCIY, HGC-27, KATO III, MKN1, MKN45, AGS, SNU16, SNU719, OE19, CCK-81, and SW948)のDNAを回収し、RHOAの変異をSanger法で確認した。
- (2) 上記細胞株の内在性RHOAの発現をWestern blotting法で調べた。
- (3) RHOA変異株とRHOA野生株を3次元スフェロイド培養し、siRNAにて、RHOA mRNAをノックダウンし、Western blottingでRHOA発現の変化を確認した。
- (4) 変異RHOAノックダウン細胞について96 well low attachment plateを用いて3次元スフェロイド培養を行い、増殖抑制をATP測定により定量化した。
- (5) RHOA変異細胞株(OE19, SW948, AGS)、RHOA野生細胞株(HGC-27)のRHOAノックダウン細胞と非ノックダウン細胞のRNAを抽出し、マイクロアレイによる網羅的蛋白発現解析を行った。
- (6) RHOA変異をcompound mutationsとして持つ細胞株(CCK-81)に対しては、その機能的意義についての考察のために、trans-compound heterozygousであるかcis-compound heterozygousであるかを確認する必要があったため、mutant specific primersを作成し、Sanger法にて確認した。
- (7) RHOA・変異RHOAの機能が消化管腫瘍のtumorigenicityに与える影響を知るために、各種細胞株のRHOAのGenotype、3次元スフェロイド培養における表現型の変化、RHOAノックダウン細胞のマイクロアレイによる網羅的蛋白発現解析の結果を照らし合わせ、RHOA変異株に対する

RHOA ノックダウンで共通して発現変化した遺伝子群・その ontology の解析、さらに RHOA ノックダウンで増殖抑制を示した細胞株で共通して発現変化した遺伝子群・その ontology の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 胃癌を含む消化管腫瘍由来の細胞株 (GCIY, HGC-27, KATO III, MKN1, MKN45, AGS, SNU16, SNU719, OE19, CCK-81, SW948) の RHOA を Sanger 法で調べ、CCK-81 に p.R5Q と p.Y42C, SNU16 に p.R5W と p.F39L, SW948 に p.G17E, OE19 に p.Y42S, SNU719 に p.A61V, AGS に p.E64del を確認した。これらの変異は Catalogue of Somatic Mutations in Cancer database、過去文献の報告に合致するものであった。また、CCK-81 の p.R5Q と p.Y42C はトランス型であることを明らかにした。

(2) 細胞株の内在性 RHOA の発現を Western blotting 法で調べたところ、発現の程度と変異の有無との明らかな関係を認めなかったが、いずれの細胞株も RHOA を発現しており、その機能がこれら癌細胞株の恒常性に影響・関与している可能性が示唆された。

(3) RHOA 変異株と RHOA 野生株のうち計 9 種類の接着細胞 (AGS, CCK-81, GCIY, HGC-27, MKN1, MKN45, OE19, SNU719, SW948) を 3 次元スフェロイド培養し、2 種の siRNA にて、RHOA mRNA をノックダウンし、Western blotting で RHOA 発現の変化を確認したところ、有効なノックダウンが得られた。

(4) そこで、RHOA ノックダウン細胞について 96 well low attachment plate を用いて 3 次元スフェロイド培養を行ったところ、増殖抑制を呈する細胞 (GCIY, MKN1, OE19, SW948) と、呈さない細胞 (HGC-27, SNU719, CCK-81) があることを明らかにした。また、AGS では 2 種の siRNA のうち一方で増殖抑制が起こるという結果を得た。

(5) 上記の表現型変化をふまえ、RHOA ノックダウンに伴う細胞の変化を網羅的に把握するために、マイクロアレイを行い、RHOA 変異細胞株 (OE19, SW948, AGS)、RHOA 野生細胞株 (HGC-27) の RHOA ノックダウンに伴う網羅的な蛋白発現変化の解析を行ったところ、増殖抑制を呈した細胞に共通して、metabolism of small molecules、oxidation-reduction process に関連する遺伝子の発現低下が起きていることを発見した。また、RHOA 変異株に共通して、RHOA ノックダウン後 Inc-DERA-1 が発現低下することを発見した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Ikari N, [Serizawa A](#), Mitani S, Yamamoto M, [Furukawa T](#). Near-comprehensive resequencing of cancer-associated genes in surgically resected metastatic liver tumors of gastric cancer. *Am J Pathol.* 2019; 189:784-796. 査読あり
- (2) Ikari N, Aoyama S, Seshimo A, Suehiro Y, Motohashi T, Mitani S, Yoshina S, Tanji E, [Serizawa A](#), Yamada T, Taniguchi K, Yamamoto M, [Furukawa T](#). Somatic mutations and increased lymphangiogenesis observed in a rare case of intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis. *Oncotarget.* 2018;9:10808-10817. 査読あり
- (3) Ikari N, Taniguchi K, [Serizawa A](#), Yamada T, Yamamoto M, [Furukawa T](#). A primary tumor of mixed histological type is a novel poor prognostic factor for patients undergoing resection of liver metastasis from gastric cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2017;24:281-288. 査読あり

〔学会発表〕(計 19 件)

- (1) [芹澤 朗子](#), 谷口 清章, 伊藤 俊一, 鈴木 和臣, 板橋 道朗, 山本 雅一. 腹腔鏡下幽門側胃切除術における幽門下リンパ節郭清の工夫 日本内視鏡外科学会 2018 年
- (2) [碓 直樹](#), [芹澤 朗子](#), 三谷 昌平, 山本 雅一, [古川 徹](#). 胃癌肝転移の分子異常と病理学的特徴 日本消化器外科学会 2018 年
- (3) 谷口 清章, 山田 卓司, 天野 久仁彦, [芹澤 朗子](#), 小竹 将, 伊藤 俊一, 瀬下 明良, 山本 雅一. 管内発育型 GIST に対する腹腔鏡下粘膜剥離術(LSD)を付加した LECS の経験 日本消化器外科学会 2018 年
- (4) 谷口 清章, [芹澤 朗子](#), 伊藤 俊一, 鈴木 和臣, 山本 雅一. 腸閉塞に対する腹腔鏡下手術の適応 日本内視鏡外科学会 2018 年
- (5) 伊藤 俊一, 谷口 清章, [芹澤 朗子](#), 鈴木 和臣, 板橋 道朗, 山本 雅一. delle を伴う管内発育型胃 GIST に対する closed LECS 変法の 1 例 日本内視鏡外科学会 2018 年
- (6) 鈴木 和臣, 谷口 清章, [芹澤 朗子](#), 伊藤 俊一, 岡野 まり子, 山本 智子, 山本 雅一. 粘膜下腫瘍様の形態を呈した CA19-9 産生胃癌の 1 例 日本内視鏡外科学会 2018 年
- (7) [芹澤 朗子](#), 谷口 清章, 小竹 将, 天野 久仁彦, 山田 卓司, 瀬下 明良, 山本 雅一. 当院における進行胃癌に対する審査腹腔鏡・審査腹腔鏡+胃空腸バイパス術の検討 日本消化器外

科学会 2017 年

(8) 碓 直樹, 青山 翔太, 瀬下 明良, 末廣 勇司, 本橋 智子, 三谷 昌平, 吉名 佐和子, 丹治 悦子, 芹澤 朗子, 山田 卓司, 谷口 清章, 山本 雅一, 古川 徹. Somatic mutations and increased lymphangiogenesis observed in a rare case of intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis 日本消化管学会 2018 年

(9) 小川 杏平, 谷口 清章, 天野 久仁彦, 山田 卓司, 芹澤 朗子, 伊藤 俊一, 豊島 幸憲, 山本 雅一. 止血困難な腫瘍出血を伴う隆起型早期胃癌に対し胃部分切除術を施行した 1 例 日本腹部救急医学会 2018 年

(10) 平石 卓也, 森田 賢, 山崎 宙士, 大森 鉄平, 徳重 克年, 竜崎 理子, 篠原 明仁, 風間 啓至, 田中 淳司, 宇都 健太, 山本 智子, 長嶋 洋治, 芹澤 朗子, 山田 卓司, 谷口 清章, 山本 雅一, 坂井 修二. メトトレキサート(MTX)休薬にて消失した小腸の MTX 関連リンパ増殖性疾患の一例 日本腹部救急医学会 2018 年

(11) 芹澤 朗子, 谷口 清章, 伊藤 俊一, 小竹 将, 天野 久仁彦, 山田 卓司, 瀬下 明良, 板橋 道明, 山本 雅一. 幽門狭窄を有する高度進行胃癌における腹腔鏡胃空腸バイパス術の工夫 日本内視鏡外科学会 2017 年

(12) Ikari N, Taniguchi K, Serizawa A, Yamada T, Yamamoto M, Furukawa T. A primary tumor of mixed histological type is a novel poor prognostic factor for patients undergoing resection of liver metastasis from gastric cancer. The 6th Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association 2017 年

(13) 山田 卓司, 小竹 将, 芹澤 朗子, 天野 久仁彦, 谷口 清章, 瀬下 明良, 山本 雅一. 術前筋肉量は胃癌術後補助療法開始までの期間に影響する 日本消化器外科学会 2017 年

(14) 谷口 清章, 山田 卓司, 天野 久仁彦, 芹澤 朗子, 小竹 将, 太田 正穂, 瀬下 明良, 山本 雅一. 残胃癌に対する治療方針 日本消化器外科学会 2017 年

(15) 小川 杏平, 谷口 清章, 瀬下 明良, 天野 久仁彦, 山田 卓司, 芹澤 朗子, 伊藤 俊一, 山本 雅一. 十二指腸水平部に発生した gastrointestinal stromal tumor の 1 例 日本臨床外科学会 2017 年

(16) 山田 卓司, 伊藤 俊一, 天野 久仁彦, 芹澤 朗子, 谷口 清章, 瀬下 明良, 山本 雅一. パート手術がもたらす効果 若手の効率的な技術習得とモチベーション向上を目指して 日本内視鏡外科学会 2017 年

(17) 谷口 清章, 山田 卓司, 天野 久仁彦, 芹澤 朗子, 小竹 将, 伊藤 俊一, 板橋 道朗, 瀬下 明良, 山本 雅一. 管内発育型 GIST に対する腹腔鏡下粘膜剥離術(LSD)を付加した LECS の工夫 日本内視鏡外科学会 2017 年

(18) 伊藤 俊一, 谷口 清章, 山田 卓司, 天野 久仁彦, 芹澤 朗子, 瀬下 明良, 板橋 道朗, 山本 雅一. 幽門狭窄を伴う進行胃癌に対し、審査腹腔鏡時消化管バイパス術が有効であった 1 例 日本内視鏡外科学会 2017 年

(19) 小竹 将, 谷口 清章, 伊藤 俊一, 芹澤 朗子, 天野 久仁彦, 山田 卓司, 大木 岳志, 瀬下 明良, 板橋 道朗, 山本 雅一. 術中 MRI を併用し、腹腔鏡下に完全切除し得た腸間膜リンパ管腫の一例 日本内視鏡外科学会 2017 年

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：古川 徹

ローマ字氏名：Furukawa Toru

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科病態病理学分野

職名：教授

研究者番号（8桁）：30282122

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山本 雅一

ローマ字氏名：Yamamoto Masakazu

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。