

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04281

研究課題名(和文) 胃癌腹膜播種特異的関連分子を標的とした新規腹腔内治療法の開発

研究課題名(英文) Molecule target for treatment and companion diagnostic tool of peritoneal dissemination in gastric cancer

研究代表者

小寺 泰弘 (KODERA, Yasuhiro)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10345879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜播種は胃癌で高頻度かつ難治な転移再発様式である。Transcriptome解析により腹膜転移再発症例で特異的に高発現している分子として膜貫通型蛋白であるsynaptotagmin 13 (SYT13) を厳選した。SYT13の組織中、腹水中発現は胃癌腹膜播種の予測、存在診断、治療効果モニタリングのいずれの場面においても有用であることが示された。SYT13は胃癌細胞の増殖、浸潤、遊走能に関与することが明らかになった。siRNA、中和抗体のいずれのアプローチにおいてもSYT13を標的とした腹腔内治療はマウス腹膜播種モデルで治療効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌において腹膜播種は高頻度な転移再発形式であるにもかかわらず、これを制御する分子標的治療薬も精度の高い診断マーカーも発展途上にある。本研究の成果をSYT13阻害薬の創薬と診断キットの開発へとつなげるにより「SYT13発現を評価し、高発現症例に対してはSYT13阻害薬による治療を行う」、というPrecision medicineが実現できる。将来的に、SYT13阻害薬は、胃癌のみならず腹膜播種を高頻度に起こす膵癌、卵巣癌などの他癌種に応用できる可能性も有する。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal metastasis is a frequent cause of death in patients with gastric cancer. The pathophysiology and thus targets for treatment are unknown. Synaptotagmin XIII (SYT13) was expressed in patients with peritoneal recurrence of gastric cancer. Inhibition of SYT13 expression in gastric cancer cell lines was associated with decreased invasion and migration ability of the cells. In vivo experiments using a mouse xenograft model of gastric cancer showed that intraperitoneal administration of SYT13-specific small interfering RNA or antibodies significantly inhibited the growth of peritoneal nodules and prolonged survival. SYT13 expression in primary gastric cancer tissues or ascites fluids had diagnostic potential both in the detection and prediction of peritoneal metastasis of gastric cancer. SYT13 may also be a promising target for the treatment of peritoneal metastasis of gastric cancer.

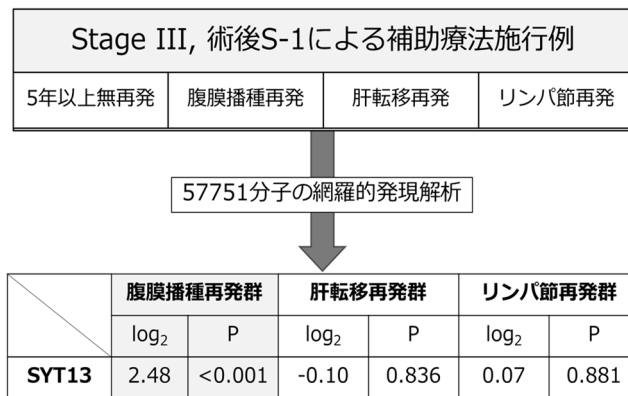
研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 腹膜播種 分子標的治療

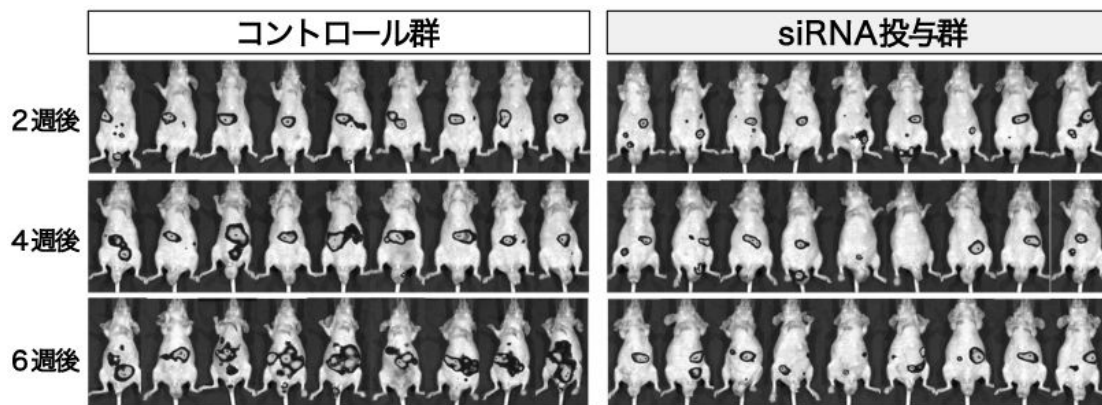
1. 研究開始当初の背景

胃癌は本邦では依然として頻度が高く、切除不能な症例の予後は不良である。胃癌に対し保険適応となっている分子標的治療薬は、ramucirumabとHER2陽性胃癌に対するtrastuzumab、免疫チェックポイント阻害薬のnivolumabとMSI-high胃癌に対するpembrolizumabのみである。胃癌の予後に大きく関わる再発転移形式として腹膜転移、リンパ節転移、血行性転移という全く性質が異なるがどれも重要な3つの転移経路が存在することで知られる。遠隔転移を有する胃癌はStage IV胃癌として一括して扱われており、転移経路に特異的な診断マーカーや分子標的治療薬はほとんど存在しない。腹膜播種は、胃癌で特に多く見られ、難治な転移再発形式であり、申請者らはその治療のために先進医療を含む多くの臨床研究を展開してきた。本研究では、各種転移形式ないしは転移経路に特異的な分子生物学的機序の解明を通じ、腹膜転移に特化した分子標的とその治療薬を見出すことを目標とした。

転移巣は多くの分子が関与する多段階の過程を経て形成されることが知られているが、その中には転移経路に特異的な分子が存在するとの考え方がある。また、阻害することで治療効果が期待できる治療標的分子を開発すると同時に、感受性のある患者の選別に資するコンパニオン診断法が開発できれば意義深い。そこで、申請者らはまず胃癌腹膜播種の治療・診断の両面でキーとなりうる候補分子を探索するために、Stage IIIで同一の術後補助化学療法を受けていながら再発形式の異なる4群の胃癌原発巣組織を対象としたtranscriptome解析を行った(右図)。その結果、腹膜播種再発例のみで有意な発現亢進を示した分子として拾い上げたsynaptotagmin 13 (SYT13)は小胞輸送調節膜貫通型蛋白であり、さまざまな増殖因子を介した腫瘍細胞の増殖や抗癌剤の代謝に関連している可能性があることが判明したため、魅力的な候補分子と判断し、次のステップである発現・機能解析に進んだ。



SYT13は胃癌細胞株の70%で高発現していた。SYT13が高発現する胃癌細胞株MKN45を対象にsiRNA法によるノックダウンを行ったところ、増殖能、浸潤能および遊走能が有意に抑制された。次に、マウス腹膜播種モデルを用いてSYT13に対するsiRNA腹腔内投与(週2回、6週間)の腹膜播種形成阻害効果を検討した。肉眼的な腹膜播種形成は、siRNA投与群で著明に抑制されていた。In vivo imaging system (IVIS)で腹膜播種形成の経時的変化を評価すると、siRNA投与群では腹膜播種の進行が著明に阻害されており、その結果マウスの生存期間は有意に延長した(下図)。



一方、200例の胃癌手術症例での解析では、胃癌原発巣組織中のSYT13 mRNA発現は臨床病期そのものには依存せず、治癒切除後に腹膜播種再発を来したStage II/III胃癌症例、および手術時にすでに腹膜播種を有したStage IV症例において有意に上昇していた。以上の予備データから、申請者らはSYT13を有望な腹膜播種特異的分子標的と評価し、技術移転に向けて基礎特許出願(特願2015-159756)および国際出願(PCT/JP2016/56788)を完了した。本研究は、これら成果をさらに実用化に向けて発展させるために立案された。

2. 研究の目的

腹膜播種は胃癌で高頻度かつ難治な転移再発様式であり、その克服は重要な課題である。胃癌は様々な転移再発形式をとるが、申請者らは「切除不能・再発胃癌」というひとくくりで一括し

て薬物療法を開発してきた従来の研究方略には限界があると考え、転移経路ごとに特異的な関連分子を同定してこれを阻害する戦略に転じた。その柱として行った転移経路特異的な Transcriptome 解析により腹膜転移再発症例で特異的に高発現している分子がいくつか特定されたが、この中から治療標的に適する膜貫通型蛋白である synaptotagmin 13 (SYT13) を厳選し、治療の奏効度を予測するコンパニオン診断法の確立と並行して研究を進めることとした。本研究計画の目的は SYT13 の機能を明らかにし、これを標的とした創薬ならびに診断法の開発に繋げることである。

3. 研究の方法

SYT13 の胃癌細胞における機能解析

- (1) SYT13 ノックダウン実験：予備実験で得られている知見を拡大し、SYT13 がどのような分子生物学的機序によって腹膜播種形成に関与しているのかを調べた。ヒト胃癌細胞株 MKN1、MKN45 を対象にして、siRNA 法によるノックダウン前後での細胞接着能、増殖能、浸潤能、遊走能を比較評価した。また、Flow cytometry を用いて、Apoptosis 細胞比率の変化および細胞周期 G0/1 期比率の変化も調べた。
- (2) SYT13 強制発現による機能解析：SYT13 発現ベクターを HaloTag® Technology を用いてヒト胃癌細胞株 MKN1、MKN45 に導入した。SYT13 強制発現による細胞の機能の変化（接着能、増殖能、浸潤能、遊走能）を解析した。
- (3) SYT13 の抗腫瘍薬感受性への影響：5-FU 系（S-1 を含む）、パクリタキセル（PTX）、シスプラチン（CDDP）は現在の胃癌治療の Key drug であり、腹膜播種の制御に一定の効果は示されているが、獲得耐性が臨床で大きな問題となっている。胃癌細胞株 MKN1、MKN45 において SYT13 ノックダウンの有無での 5-FU/PTX/CDDP の感受性を WST-1 試験により評価した。
- (4) SYT13 の癌関連主要 pathway への干渉：SYT13 がどのような分子に干渉することで胃癌腹膜播種形成に寄与しているかを明らかにするため、pathway 解析を行った。SYT13 のノックダウン前後での発現およびリン酸化を Western blotting 法で評価する。さらに、SYT13 を刺激する上流シグナルを検索すべく、予備データで SYT13 と協調的発現を示した NOTCH1 の上流である DLL 及び JAG ファミリーに加えて、既知の胃癌腹膜播種形成促進因子として報告されているリガンド CXCL12, amphiregulin, HB-EGF の SYT13 発現への影響を調べた。

SYT13 阻害の腹膜播種制御効果

- (5) マウス腹膜播種モデル：予備実験では SYT13 に特異的な siRNA の腹腔内投与によりマウスの生存期間を有意に延長した。しかし、siRNA 投与期間を 6 週間に限定したため、投与群でも投与中止後に病状が進行して死亡した。全身主要臓器の正常組織中発現量に関する公開 Web データ (GeneCards) では、SYT13 は脳組織にやや豊富で、その他臓器ではほぼ均一に低レベルに発現している。異常発現亢進状態である一部の胃癌細胞の SYT13 を抑制することが創薬の目標であるが、安全性の面からも腹腔内に直接拡散して病巣に Delivery できる腹腔内投与は全身投与と比べて有利な点が多い。そこで、コントロール群と siRNA 腹腔内投与群（週 2 回、12 週間）で、IVIS による腹膜播種形成量、生存期間を比較解析した。
- (6) SYT13 阻害薬の創製：腹腔内投与を見据えた際、腹膜透過性の観点から、腹腔内の癌細胞に長時間作用し、かつ腹膜通過を経た全身移行による有害事象を最小限にするためには分子量の大きい抗体医薬が理想的である。SYT13 は細胞膜上に存在する膜タンパクであり、核酸医薬以外のアプローチとして SYT13 特異的中和抗体を試みた。

抗 SYT13 中和抗体の胃癌腹膜播種抑制効果の評価

- (7) マウス腹膜播種モデル：スクリーニングを経た抗 SYT13 中和抗体の腹膜播種治療効果を in vivo 実験で評価した。投与経路については、腹腔内投与が効果・安全性の面で有望であると考えた。SYT13 阻害による腹膜播種治療効果の評価のため、コントロール群、抗 SYT13 抗体腹腔内投与単独群（2 週に 1 回、12 週間）間で、IVIS による腹膜播種形成量、生存期間を比較解析した。

コンパニオン診断法開発のための SYT13 発現解析

- (8) 組織中 SYT13 発現の臨床的意義の検証：200 例を解析した予備データにより、胃癌原発巣中 SYT13 mRNA 発現が腹膜播種症例で特異的に亢進していることが示されている。しかし、診断用キットの開発へと進むためには、これを training set として、至適カットオフ値の設定および再現性を大規模な validation set で検証することが不可欠である。継続的に収集中の多種類の検体を対象に、組織中 SYT13 発現量を定量的 PCR 法および免疫染色法により定量し、SYT13 発現量と腹膜再発・予後、各種臨床病理学的因子との相関を検討した。特に、治癒切除後の早期腹膜播種再発例と、長期無再発生存例の間の発現パターンの相違に着目した。これにより、SYT13 が標的分子であると同時に治療対象を選別するコンパニオン診断

法となるか否かを検証した。

- (9) 腹水中 SYT13 発現量の診断的意義：胃癌手術時の腹腔洗浄液を対象に SYT13 mRNA 量を定量し、細胞診結果、腹膜播種再発の有無との相関を解析した。腹水検体からの診断が可能となれば、腹腔内投与治療の適応判断および効果判定に有用なツールとなりうる。

4. 研究成果

SYT13 の胃癌細胞における機能解析

- in vitro 発現・機能解析：SYT13 は胃癌細胞株の 70% で高発現していた。siRNA 法によるノックダウンを行ったところ、胃癌細胞株の浸潤能および遊走能が有意に低下した。

SYT13 阻害の腹膜播種制御効果

- マウス腹膜播種モデルを作成し、コントロール群と siRNA 腹腔内投与群の群間で、体重、腹囲、in vivo imaging による腹膜播種形成量、生存期間を比較解析した。その結果、siRNA 腹腔内投与群では腹膜播種形成が阻害され、生存期間が有意に延長した。体重については投与開始初期は群間差を認めず、健康被害はないことが示唆された。一方で、経過するごとにコントロール群で癌の進行による体重減少を認めたが、siRNA 腹腔内投与群では体重は後期まで維持された。

抗 SYT13 中和抗体の胃癌腹膜播種抑制効果の評価

- 抗原性予測に基づいて特異的抗 SYT13 ポリクローナル抗体を合成し、マウス腹膜播種モデルに対する抗 SYT13 中和抗体の腹膜播種治療効果を評価した。コントロール群と比較して抗 SYT13 抗体腹腔内投与群（週 2 回、4 週間）では腹膜播種形成量は低下し、有意に生存期間が延長した。抗体医薬、そして腹腔内投与というアプローチが有望であることが示された。

コンパニオン診断法開発のための SYT13 発現解析

- 臨床検体における SYT13 発現解析：胃癌原発巣組織中の SYT13 mRNA 発現は臨床病期そのものには依存せず、腹膜播種再発もしくは同時性播種と有意に相関していた。組織中 SYT13 発現は免疫組織化学染色法でも判定しえた。
- 300 例の validation set で胃癌原発巣中 SYT13 mRNA 発現を定量的 PCR 法により測定したところ、腹膜播種症例で主要組織内 SYT13 mRNA 発現量が特異的に亢進していることが再現された。組織中 SYT13 高発現は、腹膜転移陽性、術後腹膜播種再発と相関し予後不良因子であった。腹水検体は手術時および審査腹腔鏡の際、さらには腹腔内化学療法用の腹腔ポートから簡便に採取可能である。腹水検体を対象に SYT13 mRNA 量を定量し、臨床因子との相関解析を行ったところ、肉眼的腹膜播種、細胞診結果、腹膜播種再発の有無のいずれとも有意な相関性を示した。腹水中 SYT13 mRNA は腹腔内投与治療の適応判断および効果判定に有用なツールとなると考えられた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakanishi Koki, Kanda Mitsuro, Umeda Shinichi, Tanaka Chie, Kobayashi Daisuke, Hayashi Masamichi, Yamada Suguru, Kodera Yasuhiro	4. 巻 22
2. 論文標題 The levels of SYT13 and CEA mRNAs in peritoneal lavages predict the peritoneal recurrence of gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 1143 ~ 1152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-019-00967-3	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 Mitsuro Kanda, Dai Shimizu, Haruyoshi Tanaka, Chie Tanaka, Daisuke Kobayashi, Masamichi Hayashi, Hideki Tanakami, Yukiko Niwa, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Yasuhiro Kodera	4. 巻 105
2. 論文標題 Synaptotagmin XIII expression and peritoneal metastasis in gastric cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Surgery	6. 最初と最後の頁 1349-1358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bjs.10876	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Koki Nakanishi, Mituro Kanda, Chie Tanaka, Daisuke Kobayashi, Masamichi Hayashi, Norifumi Hattori, Masaya Suenaga, Hideki Takami, Fuminori Sonohara, Suguru Yamada, Gora Nakayama, Masahiko Koike, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera
2. 発表標題 Prediction of peritoneal recurrence of gastric cancer by peritoneal lavage SYT13 and CEA mRNA levels
3. 学会等名 第91回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西香企, 神田光郎, 梅田晋一, 田中千恵, 小林大介, 林 真路, 服部憲史, 高見秀樹, 園原史訓, 山田 豪, 中山吾郎, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘
2. 発表標題 分子生物学的手法を応用した微小腹腔内遊離胃癌細胞検出法
3. 学会等名 第17回日本消化器外科学会大会（JDDW 2019 KOBE）
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
研究分担者	神田 光郎 (KANDA Mitsuro) (00644668)	名古屋大学・医学系研究科・講師 (13901)	
研究分担者	林 真路 (HAYASHI Masamichi) (70755503)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	田中 千恵 (TANAKA Chie) (50589786)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	小林 大介 (KOBAYASHI Daisuke) (30635595)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	