

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19889

研究課題名(和文) Transcriptome解析より同定した胃癌肝転移関連分子の発現および機能解析

研究課題名(英文) Identification of molecules driving hepatic metastasis formation of gastric cancer cells

研究代表者

田中 友理 (TANAKA, Yuri)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40772075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌の肝転移はきわめて予後不良であり、新規分子標的治療薬の開発および悪性度診断マーカーが不可欠である。肝転移を有する胃癌症例から得られた組織を対象とし発現プロファイリングを行った結果、SYT7が胃癌原発巣において胃非癌部に対し有意に発現亢進していた。SYT7ノックアウト胃癌細胞株では細胞増殖能、遊走能、浸潤能のいずれも有意に低下し、マウス皮下腫瘍モデルおよび肝転移モデルにおける造腫瘍能も低下していた。胃癌原発組織中SYT7高発現は血行性転移および再発に有意な相関性を示し、胃切除術後の予後不良因子であった。SYT7が胃癌血行性転移の診断および治療の両面から有望な標的分子であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Liver metastasis remains a serious problem in the management of gastric cancer (GC). Transcriptome data identified the overexpression of synaptotagmin VII (SYT7) in GC tissues with hepatic metastasis. SYT7 knockout inhibited the proliferation of GC cells and attenuated cell migration, invasion, and adhesion. The tumorigenicity of SYT7 knockout cells was moderately reduced in a mouse model of subcutaneous metastasis and was more strikingly attenuated in a model of hepatic metastasis. The SYT7 levels in the primary GC tissues were significantly associated with hepatic recurrence, metastasis, and adverse prognosis. SYT7 represents a tool for prediction and monitoring of hepatic metastasis from GC as well as being a promising therapeutic target.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 肝転移 分子標的 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

胃癌の肝転移は長きにわたり、その不良な予後のため手術適応外とされていた。しかし、肝転移巣切除後の長期生存例も少数ではあるが認められており、肝転移を有する胃癌の治療方略は、現在の胃癌診療におけるトピックスである。とはいえ、手術治療単独では予後の大きな改善が期待できないことは明白であり、個別化治療を可能とする新規分子標的治療薬の開発および悪性度診断マーカーが不可欠である。原発巣から生じた遊離癌細胞が生着・増殖して転移巣を形成するには多段階の過程が必要であり、接着分子、蛋白分解酵素、増殖因子、血管新生因子、ケモカインなど多くの分子が関与しているとされる。近年、マイクロアレイや次世代シーケンサーなどの網羅的な遺伝子解析法の登場により、転移先臓器特有の転移巣形成過程において鍵となる分子の同定が簡便に行えるようになったとされ、注目されている。胃癌の転移形式には、肝転移をはじめとする血行性転移、腹膜播種転移、リンパ節転移という全く異なる3つの経路が存在し、それぞれの転移経路において固有の分子機序が存在するものと考えられる。胃癌肝転移においても、この点の解明が新たな診断・治療開発の基盤となると考えた。本邦で胃癌の Key drug である S-1 は、術後補助化学療法において腹膜播種の制御には一定の効果を示しているが、肝転移を代表とする血行性転移を制御するには不十分であることが示唆されている。また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、ここに転移巣成立機序が異なるであろう腹膜播種、血行性転移、リンパ行性転移の全てが内包されていることも問題である。個別化治療に役立つ効果的な診断・治療アプローチを開発するためには、転移形式に応じた分子生物学的背景を解明するという視点も有望と考えた。

研究代表者は、新たな標的分子となりうる胃癌肝転移関連分子を同定すべく、次世代シーケンサーによる Transcriptome 解析を行った。肝転移を有する胃癌症例4例から得られた組織を対象とした。HiSeq (Illumina 社) を用いて発現プロファイリングを行い、胃原発巣癌部、胃正常部、肝転移巣組織の3群間での網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、膜貫通型蛋白の一つである synaptotagmin 7 (SYT7) が胃原発巣において胃非癌部に対し約 21 倍の発現度で有意に発現亢進していることを見出した。

| | 胃原発巣 | | 肝転移巣 | |
|------|------------------|---------|------------------|---------|
| | 胃非癌部 | | 胃原発巣 | |
| | log ₂ | p_value | log ₂ | p_value |
| SYT7 | 4.40493 | 0.00005 | -0.47455 | 0.42235 |

SYT7 の悪性腫瘍における役割について過去の報告はなかったが、SYT7 は膜貫通型蛋白であり、各種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

があるため、胃癌肝転移関連分子としてさらに研究を進めるべき第一候補として着目した。

2. 研究の目的

SYT7 の診断・治療に役立つバイオマーカーないしは分子標的としての有用性を探る目的で、本研究では以下を明らかにすることを目的とした。

- (1) SYT7 の胃癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能への関与
- (2) SYT7 のアポトーシス、細胞周期への関与の有無
- (3) SYT7 と協調的発現あるいは相互作用を有する腫瘍関連分子、pathway 検索
- (4) マウス皮下腫瘍モデルおよび肝転移モデルにおける肝転移巣形成能への SYT7 の関与
- (5) 臨床検体での SYT7 発現度解析による、肝転移再発経過や長期予後との相関性の検討

過去のゲノム解析から得られた転移巣別の遺伝子学的相違に関する知見は、主に変異や欠失の同定によるものである。本研究では網羅的遺伝子発現レベル解析によって候補分子を検出しているため、その発現調節による機能解析、さらには分子標的治療への速やかな応用が可能と考えた。SYT7 の発現、機能のみでなく、in vivo でその発現阻害が治療的意義を有するかを検証する。これにより、新たな分子標的治療の提案につながる。

3. 研究の方法

網羅的遺伝子発現解析により検出した、胃癌肝転移関連分子候補である SYT7 についての詳細な発現・機能解析を行うべく、以下の実験を行った。

(1) SYT7 の機能解析

胃癌細胞株に対して CRISPR-CAS9 を用いたゲノム編集により安定的 SYT7 ノックアウト (SYT7-KO) 株を樹立した。親株と SYT7-KO の間で細胞株の増殖・浸潤能は Cell Proliferation Assay および Matrigel Invasion Assay、遊走能を Wound healing assay により評価する。さらに、5 種の接着物質に対する接着能を Cell adhesion kit を用いて解析した。

(2) SYT7 のアポトーシスおよび細胞周期への影響

SYT7 が胃癌細胞の悪性度に関与する背景にある機序の検討を深めるべく、SYT7 のアポトーシスおよび細胞周期への関与を調べる。

(3) SYT7 の関連分子の検索

SYT7 の悪性腫瘍における役割には未知の部分が大きく、どのような腫瘍関連分子や signaling pathway との干渉を有するのかを知ることは、その特性を理解するために重要である。Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) RT2 Profiler PCR Array を用いて 84 種の癌の増殖および転移に関連する分子の発現を網羅的に解析し、SYT7 発現度との相関性を調べる。

(4) in vivo 実験

SYT7 の in vivo での機能解析を行った。NUDE マウスの皮下に細胞株を注入することで皮下腫瘍モデルを作成した。さらに、NOD SCID マウスの門脈内にヒト胃癌細胞株を注入することでマウス肝転移モデルを作成し、その転移巣形成を Luciferin を標的とした in vivo imaging 法で評価した。肝転移モデルに対して、肝転移巣形成能（数、大きさ）および生存期間について、親株と SYT7-KO の群間で比較した。これにより SYT7 抑制による肝転移抑制効果を評価した。

(5) SYT7 発現の臨床的意義の検証

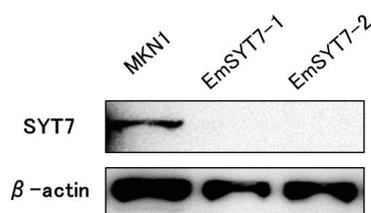
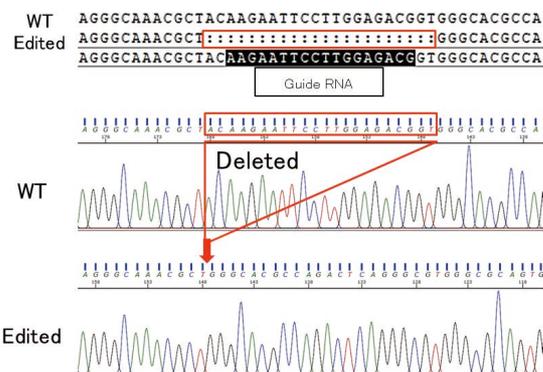
癌部および非癌部組織中の SYT7 mRNA 発現度を定量的 PCR 法で測定し、SYT7 発現度と、再発形式や予後を含めた各種臨床病理学的因子との相関を調べた。特に、治療切除後の早期肝転移再発例と、長期無再発生存例の間の発現パターンの相違に着目した。

4. 研究成果

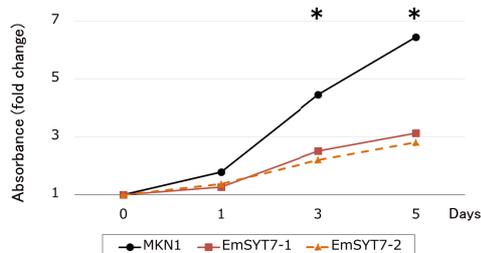
(1) SYT7 の機能解析

胃癌細胞株 MKN1 に対して CRISPR-CAS9 を用いたゲノム編集を行い、安定的 SYT7 ノックアウト (EmSYT7) 株を樹立した。

Sequencing 法により 21 塩基の欠損が確認され、Western blotting にて SYT7 蛋白の発現低下を認めた。

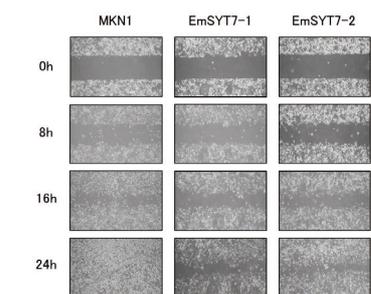


細胞増殖能



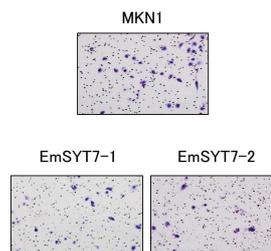
EmSYT7 では細胞増殖能が有意に低下していた。

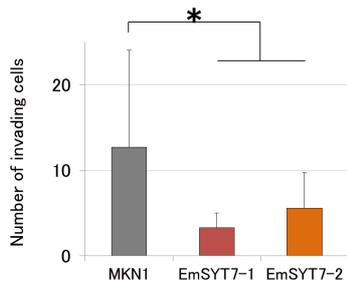
細胞遊走能



EmSYT7 では細胞遊走能が有意に低下していた。

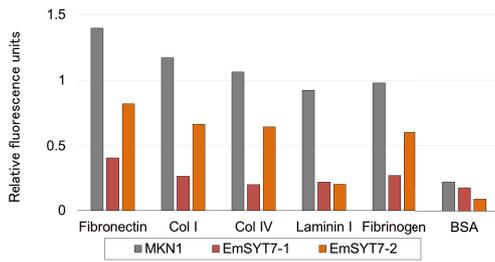
細胞浸潤能





EmSYT7 では細胞浸潤能も有意に低下していた。

細胞接着能

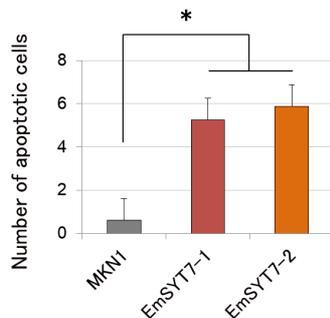
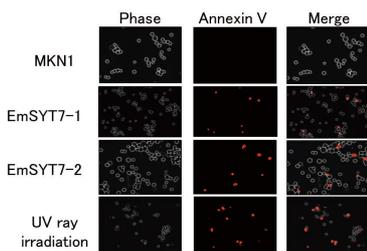


EmSYT7 では5種類の接着物質に対する細胞接着能も低下していた。これらの結果から、SYT7は胃癌細胞の増大、転移に重要な悪性形質に関与していることが示された。

(2) SYT7のアポトーシスおよび細胞周期への影響

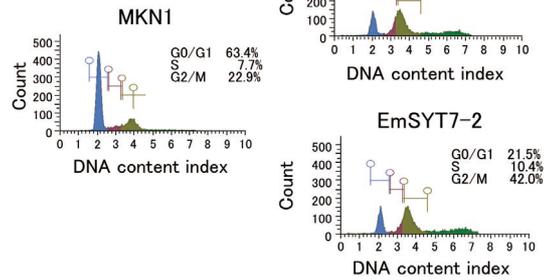
SYT7がどのような機序で胃癌細胞の増殖能に関与しているかを調べるためアポトーシスおよび細胞周期について検討した。

アポトーシス細胞数



EmSYT7ではアポトーシス細胞比率が有意に増加していた。

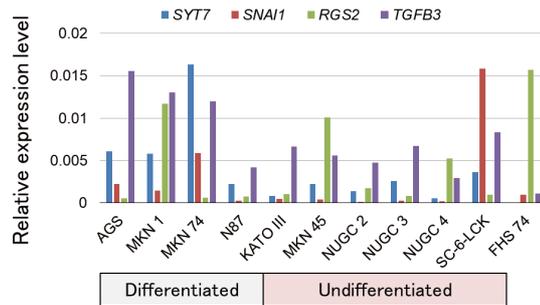
細胞周期



EmSYT7ではG2/M期の細胞比率が増加していた。これらの結果から、SYT7を阻害することでアポトーシスが惹起されるとともに細胞周期G2/M arrestを起こして細胞増殖が低下することが示唆された。

(3) SYT7の関連分子の検索

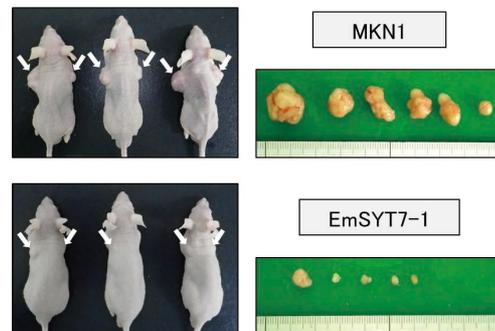
84の癌関連分子発現を網羅的に解析したところ、上皮間葉移行促進因子のSNAI1、TGFB3と正の相関を、上皮間葉移行抑制因子のRGS2と負の相関性を認めた。



(4) in vivo 実験

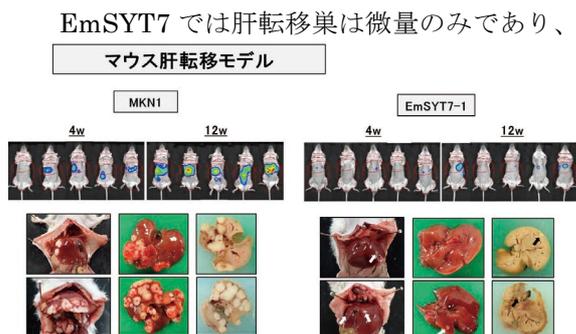
SYT7のin vivoでの機能解析を行った。皮下腫瘍モデルでは、EmSYT7の造腫瘍能が低下していることが明らかとなった。

マウス皮下腫瘍モデル



単純に造腫瘍能がSYT7阻害によって低下しているのか、あるいは血行性転移の過程においてよりSYT7が関与しているのかを調べるため、経門脈的胃癌細胞株注入法によって、マウス肝転移モデルを作成し、

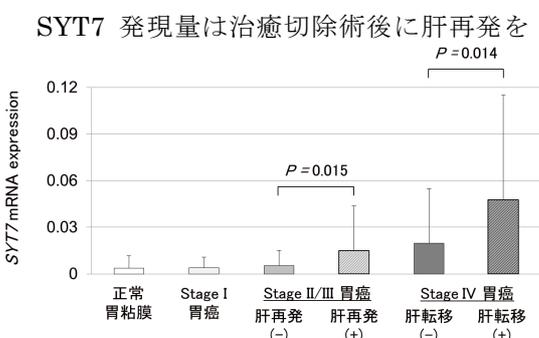
肝腫瘍形成能を比較した。



皮下腫瘍での造腫瘍能の差以上に肝転移巣形成能に SYT7 ノックアウトの効果が現れていた。

(5) SYT7 発現の臨床的意義の検証

癌部および非癌部組織中の SYT7 mRNA 発現度を定量的 PCR 法で測定した。



きたした症例および同時性肝転移を有する症例で有意に高値であった。また、300 症例で検討すると、癌部 SYT7 高値群は有意に予後不良であるとともに累積肝再発率が高かった。

以上の研究成果により、以下のことが明らかとなった。

- ① 膜貫通型蛋白 SYT7 が同時性肝転移を有する胃癌原発巣組織において正常胃粘膜組織に対し約 21 倍に発現亢進していた。
- ② SYT7 発現量は上皮間葉移行関連分子である SNAI1、TGFB3 と正の相関関係を、上皮間葉移行抑制因子 RGS2 とは逆相関関係を示した。
- ③ SYT7 ノックアウトにより細胞増殖能、遊走能、浸潤能、接着能のいずれも有意に低下し、アポトーシス比率が増加した。
- ④ SYT7 ノックアウト株では細胞周期 G2/M arrest を起こしていた。
- ⑤ SYT7 ノックアウト株は皮下造腫瘍能が低下していたが、肝転移形成能はさらに顕著に低下した。
- ⑥ 胃癌原発組織中 SYT7 高発現は同時性・異時性肝転移に有意な相関性を示した。

これらの結果から、SYT7 は胃癌肝転移の診断および治療の両面において有望な新規

標的分子であることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 神田光郎, 小寺泰弘.
新規胃癌血行性転移関連分子の同定と、その機能解析.
第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会
2017.7.27

- (2) 神田光郎, 田中晴祥, 三輪高嗣, 梅田晋一, 清水 大, 田中千恵, 小林大介, 岩田直樹, 末永雅也, 服部憲史, 山田 豪, 中山吾郎, 藤原道隆, 小寺泰弘.
Young researcher presentation YR-2 胃癌肝転移形成に寄与する分子の同定と、その機能解析.
第 28 回消化器癌発生学会総会 2017.11.17

[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:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 友理 (TANAKA, Yuri)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 4 0 7 7 2 0 7 5

(4) 研究協力者

神田 光郎 (KANDA, Mitsuro)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 0 0 6 4 4 6 6 8