

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09107

研究課題名(和文) エキソソーム内包microRNA/遺伝子制御による胃癌腹膜播種の原因究明

研究課題名(英文) Investigation of the cause of gastric cancer peritoneal dissemination by exosome-encapsulated microRNA/gene regulation

研究代表者

藏重 淳二 (Kurashige, Junji)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：90594474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、腹膜播種モデルマウスを用いて、腹膜播種性転移に有意に働き、胃癌患者の予後を大きく規定する遺伝子を治療標的と考えその探索を行った。その結果、SERPINE2という遺伝子が、癌の腹膜播種に深く関与している可能性を見出した。SERPINE2は、extracellular-matrixの構成成分で、SERPINE2高発現群において、全生存期間、無再発生存期間が低い傾向にあり、SERPINE2の発現が予後に影響することが示唆された。SERPINE2に関しては、既存の抗凝固薬がその抑制薬剤として存在しており、in vivoにおいてこれらの薬剤が胃癌腹膜に対して効果があるのかを検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スキルス胃癌は若年者に発症し、高い死亡率を有するにも関わらず、これまで解明されている情報は極めて限られており、腹膜播種転移機序については未知な部分が多く、有効な予防法や治療法は依然確立していない。SERPINE2に関しては、既存の抗凝固薬がその抑制薬剤として存在しており、実臨床で用いるハードルも低く、癌の進展を抑制させる可能性があり、新しい胃癌腹膜播種の治療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse model of peritoneal dissemination, we searched for genes that are significantly involved in peritoneal dissemination of metastasis and that significantly determine the prognosis of gastric cancer patients as potential therapeutic targets. We found that the gene SERPINE2 is a component of the extracellular matrix, and that overall survival and recurrence-free survival tended to be lower in the group with high SERPINE2 expression, suggesting that SERPINE2 This suggests that SERPINE2 expression influences prognosis. In addition, the frequency of gastric cancer peritoneal dissemination was significantly higher in the group of patients with high SERPINE2 expression, and since existing anticoagulants exist as inhibitors of SERPINE2, we are investigating whether these agents are effective against gastric cancer peritoneum in vivo.

研究分野：消化器外科学、腫瘍医学

キーワード：胃癌 腹膜播種 SERPINE2 細胞外マトリックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌の転移ルートは主に血行性、リンパ行性、播種性の3つがあるが、胃癌ではその解剖学的・生物学的な特徴から腹膜播種が多く見られ、胃癌による死亡の20-40%は腹膜播種による。現在われわれは、胃癌腹膜播種モデルマウスを作成し、細胞生物学的視点、実験動物学的視点より胃癌腹膜播種について研究を行っている。胃癌の腹膜播種は、胃癌細胞が、腹腔内で生存し続け、腹腔内漿膜へ接着し播種を形成するが、このとき、癌細胞と腹水中の線維芽細胞、炎症細胞などの様々な細胞や、腹膜中皮細胞との間に何らかの情報交換があると考えられている。この細胞間コミュニケーションツールをエキソソーム内包 microRNA が担っている可能性があり、腹水中のエキソソーム内包 microRNA が腹膜播種の治療標的となりうると考えている。

2. 研究の目的

スキルス胃癌は若年者に発症し、高い死亡率を有するにも関わらず、腹膜播種転移機序については未知な部分が多く、有効な予防法や治療法は依然確立していない。今回の研究は、胃癌腹膜播種モデルマウスを用いて、原発巣の漿膜外浸潤 腹水中での生存 腹膜への付着・増殖といった腹膜播種成立の各過程でのエキソソーム、microRNA を比較することで、胃癌腹膜播種を規定する因子や抗癌剤耐性のメカニズムを解明するという、新しい視点から胃癌腹膜播種の分子メカニズムについて解析を行う。

3. 研究の方法

腹膜播種モデルマウスを用いて、腹膜播種性転移に有意に働き、胃癌患者の予後を大きく規定する遺伝子を治療標的と考えその探索を行った。

- 1) 腹膜播種モデルマウスに用いる腹膜播種性転移細胞株 4 種類およびそれぞれの親株 3 種類の gene array による遺伝子発現比較と胃癌臨床サンプル 200 例の遺伝子発現情報との統合解析を行い、腹膜播種陽性症例に高発現し、予後を規定する遺伝子群の同定を行う。
- 2) 同定された遺伝子 SERPINE2 に対する検討。胃癌切除検体を用いて SERPINE2 の real-time PCR を行い、SERPINE2 高発現群と低発現群の2群に分け、予後の比較を行った。
- 3) In vitro で胃癌腹膜播種における SERPINE2 の関与を証明するために、胃癌細胞株を用いて実験をおこなった。

4. 研究成果

- 1) 腹膜播種モデルマウスに用いる腹膜播種性転移細胞株 4 種類およびそれぞれの親株 3 種類の gene array による遺伝子発現比較と胃癌臨床サンプル 200 例の遺伝子発現情報との統合解析を行い、腹膜播種陽性症例に高発現し、予後を規定する遺伝子群の同定を行った。それぞれの腹膜播種性転移細胞株と親株との比較のなかで、HSC-58 に比較して 58As9 において高発現する遺伝子で構成した遺伝子群が、胃癌臨床検

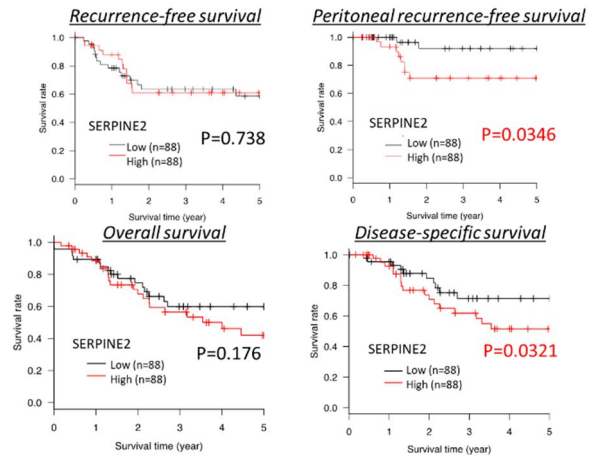
表1. Top 20 genes upregulated in 58As9 cell from extraction-of-expression modules analysis

gene symbol	gene name	fold change (log2)	OS p-value
HGDFRP3	hepatoma-derived growth factor, related protein 3	8.75	0.0168
GFPT2	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	7.54	0.0181
CXCR7	chemokine (C-X-C motif) receptor 7	7.41	0.0127
GJA1	Gap Junction Protein, Alpha 1	7.11	0.0404
GIMAP5	GTPase, IMAP family member 5	6.06	0.00299
TRPC1	Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily C, Member 1	5.97	0.0071
PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	5.88	0.0002
DDR2	discoidin domain receptor tyrosine kinase 2	4.95	0.0099
FERMT2	fermitin family member 2	4.50	0.0311
SERPINE2	Serpin Peptidase Inhibitor, Clade E2	4.74	0.0005
CALD1	caldesmon 1	4.16	0.0006
FGFR1	fibroblast Growth Factor Receptor 1	4.03	0.0194
GLI1	GLI Family Zinc Finger 1	3.76	0.0480
MAP1A	microtubule-Associated Protein 1A	3.30	0.0360
DZIP1	DAZ Interacting Zinc Finger Protein 1	3.24	0.0089
RG54	regulator of G-protein signaling 4	3.09	0.0003
SPON2	Spondin 2	3.09	0.0191
PALLD	Palladin, Cytoskeletal Associated Protein	2.84	0.00485
VCAN	versican	2.71	0.0054
CNTNAP1	contactin Associated Protein 1	2.70	0.0478
LTBP1	latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 1	2.64	0.0027
MYL9	myosin9	2.47	0.0019

体において腹膜播種陽性症例に高発現しており、予後不良因子であることが分かった（表 1）。

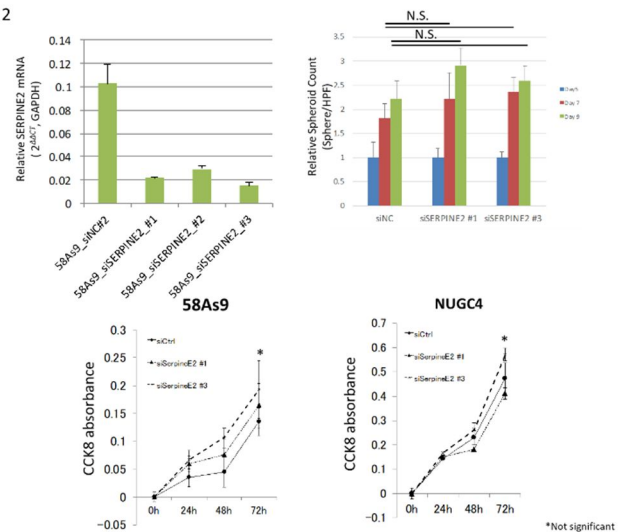
2) その中でも、SERPINE2 という遺伝子が、癌の腹膜播種に深く関与している可能性を見出した。SERPINE2 は、主に細胞外マトリックス（ECM）に存在し、内皮細胞、線維芽細胞、マクロファージ、血小板、平滑筋細胞、軟骨細胞、アストロサイト、腫瘍細胞など多くの種類の細胞から分泌される。SERPINE2 は、乳癌、膵臓癌、大腸癌など多くの癌で過剰に発現し、腫瘍の浸潤と転移に寄与していることが報告されている。SERPINE2 は、高発現症例で予後不良で腹膜播種陽性症例で高発現していた（図.1）。

図 1 In survival SERPINE2 high group has poorer prognosis in peritoneal recurrence, and disease-specific survival



3) また、In vitro で胃癌腹膜播種における SERPINE2 の関与を証明するために、胃癌細胞株を用いて実験をおこなった。実験にはスキルス胃癌より樹立された HSC58 と、これをマウスに移植し、その腹膜播種から樹立した細胞株 58As9 を用いた。siRNA を用いて Si SERPINE2 を行い、増殖能、浸潤能を確認した所、Invasion assay において si SERPINE2 細胞株では、有意に浸潤能が下がっていた（図 2）。

図 2



胃癌腹膜播種における重要な遺伝子として SERPINE2 と遺伝子について着目している。これらは、extracellular-matrix の構成成分であり、これらの癌・癌微小環境の関係性を抑制することは今後の癌治療の新しい標的となる可能性がある。腹膜播種性転移細胞の遺伝子発現は、胃癌臨床検体における遺伝子発現ならびに臨床情報を表現しており、胃癌腹膜播種のメカニズムを解く非常に有用なツールであると思われる。

現在、これらの分子かわる薬剤にて腹膜播種に対する治療を検討中である。SERPINE2 に関しては、既存の抗凝固薬がその抑制薬剤として存在しており、in vivo においてこれらの薬剤が胃癌腹膜に対して効果があるのかを検討している。

また、現在までの進捗について論文をまとめて査読、提出予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Morinaga Takeshi, Iwatsuki Masaaki, Yamashita Kohei, Yasuda-Yoshihara Noriko, Yamane Taishi, Matsumoto Chihiro, Harada Kazuto, Eto Kojiro, Kurashige Junji, Ishimoto Takatsugu, Baba Yoshifumi, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Baba Hideo	4. 巻 30
2. 論文標題 ASO Visual Abstract: Dynamic Alteration in HLA-E Expression and Soluble HLA-E via Interaction with Natural Killer Cells in Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1253 ~ 1254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-022-12555-4	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 Morinaga Takeshi, Iwatsuki Masaaki, Yamashita Kohei, Yasuda-Yoshihara Noriko, Yamane Taishi, Matsumoto Chihiro, Harada Kazuto, Eto Kojiro, Kurashige Junji, Ishimoto Takatsugu, Baba Yoshifumi, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Baba Hideo	4. 巻 30
2. 論文標題 Dynamic Alteration in HLA-E Expression and Soluble HLA-E via Interaction with Natural Killer Cells in Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1240 ~ 1252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-022-12505-0	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 Morinaga Takeshi, Iwatsuki Masaaki, Yamashita Kohei, Matsumoto Chihiro, Harada Kazuto, Kurashige Junji, Iwagami Shiro, Baba Yoshifumi, Yoshida Naoya, Komohara Yoshihiro, Baba Hideo	4. 巻 29
2. 論文標題 Evaluation of HLA-E Expression Combined with Natural Killer Cell Status as a Prognostic Factor for Advanced Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 4951 ~ 4960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-022-11665-3	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 Matsumoto Chihiro, Iwatsuki Masaaki, Iwagami Shiro, Morinaga Takeshi, Yamashita Kohei, Nakamura Kenichi, Eto Kojiro, Kurashige Junji, Baba Yoshifumi, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Komohara Yoshihiro, Baba Hideo	4. 巻 25
2. 論文標題 Prophylactic laparoscopic total gastrectomy for gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): the first report in Asia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 473 ~ 478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-021-01253-x	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 Kurashige Junji, Iwatsuki Masaaki, Mima Kosuke, Nomoto Daichi, Shigaki Hironobu, Yamashita Kohei, Morinaga Takeshi, Iwagami Shiro, Miyanari Nobutomo, Baba Hideo	4. 巻 5
2. 論文標題 Analysis of the survival and clinical characteristics of colorectal cancer patients with mental disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 314 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12421	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 Yamashita Kohei, Iwatsuki Masaaki, Yasuda-Yoshihara Noriko, Morinaga Takeshi, Nakao Yosuke, Harada Kazuto, Eto Kojiro, Kurashige Junji, Hiyoshi Yukiharu, Ishimoto Takatsugu, Nagai Yohei, Iwagami Shiro, Baba Yoshifumi, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Ajani Jaffer A., Baba Hideo	4. 巻 124
2. 論文標題 Trastuzumab upregulates programmed death ligand-1 expression through interaction with NK cells in gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 595 ~ 603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-01138-3	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 Kanemitsu Kosuke, Iwatsuki Masaaki, Yamashita Kohei, Komohara Yoshihiro, Morinaga Takeshi, Iwagami Shiro, Eto Kojiro, Nagai Yohei, Kurashige Junji, Baba Yoshifumi, Yoshida Naoya, Baba Hideo	4. 巻 14
2. 論文標題 Two Asian families with gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach successfully treated via laparoscopic total gastrectomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 92 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-020-01290-6	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 Morinaga Takeshi, Iwatsuki Masaaki, Yamashita Kohei, Harada Kazuto, Kurashige Junji, Nagai Yohei, Iwagami Shiro, Baba Yoshihumi, Yoshida Naoya, Baba Hideo	4. 巻 51
2. 論文標題 Oligometastatic recurrence as a prognostic factor after curative resection of esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 798 ~ 806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-020-02173-6	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0件

〔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	江藤 弘二郎 (Eto Kojiro) (40585717)	熊本大学・病院・特任助教 (17401)	
研究分担者	原田 和人 (Harada Kazuto) (70608869)	熊本大学・生命科学研究部(医)・特定研究員 (17401)	
研究分担者	山下 晃平 (Yamashita Kohei) (00867202)	熊本大学・生命科学研究部(医)・特定研究員 (17401)	

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