

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16397

研究課題名（和文）KLRG2を介した胃癌肝転移の分子病態解明とバイオマーカー開発

研究課題名（英文）Molecular pathogenesis of KLRG2-mediated liver metastasis of gastric cancer cells

研究代表者

中西 香企（NAKANISHI, Koki）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：10836183

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）：胃癌肝転移はきわめて予後不良である。網羅的解析を肝転移に的を絞って応用し、肝転移特異的関連分子としてkiller cell lectin like receptor G2 (KLRG2)を同定した。安定的にKLRG2を喪失させた胃癌細胞株では、細胞増殖能、細胞遊走能、細胞接着能が低下した。KLRG2強制発現により癌細胞の増殖能が増加した。KLRG2は細胞周期関連分子のリン酸化に干渉していた。マウス皮下腫瘍では、KLRG2抑制により有意な造腫瘍能低下を示した。300例の胃癌手術検体を対象とした発現解析では、癌部KLRG2発現度が進行度のみならず累積血行性転移発生頻度に有意に相関していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌腹膜播種においては、タキサン系薬剤の腹腔内投与を含めた新たな治療ストラテジーの開発が進んでいるものの、予後不良な肝転移においては新たな薬物療法の開発は進んでおらず、肝転移克服は重要な課題である。本研究では、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を肝転移に的を絞って応用することで独自性の高い標的分子KLRG2を同定し、その胃癌悪性形質形成における役割を明らかにした。この成果は、肝転移に特化した分子標的治療薬開発の糸口となる。

研究成果の概要（英文）：Liver metastases of gastric cancer have an extremely poor prognosis. We performed a comprehensive analysis and identified killer cell lectin like receptor G2 (KLRG2) as a liver metastasis-specific molecule. Stable knockout of KLRG2 in gastric cancer cell lines reduced cell proliferation, migration, and cell adhesion. Forced expression of KLRG2 increased cancer cell proliferative capacity. We found that KLRG2 interfered with phosphorylation of cell cycle-related molecules. KLRG2 suppression significantly decreased tumorigenicity in mouse subcutaneous tumors. Expression analysis using 300 gastric cancer surgical specimens showed that KLRG2 expression levels in cancerous tissues were significantly correlated not only with the disease stages but also with the frequency of cumulative incidence of postoperative hematogenous metastases.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 肝転移 KLRG2 Transcriptome解析 コンパニオン診断

1. 研究開始当初の背景

胃癌診療は、検診の普及や内視鏡の早期胃癌診断技術向上、およびヘリコバクターピロリ除菌療法による発癌予防によって大きく発展した。しかし、進行再発胃癌は依然として予後不良であり、克服すべき重要な課題である。進行再発胃癌に対する分子標的治療薬のラインナップも徐々に増えているものの、それらに対するコンパニオン診断法は限られており、未だ個別化治療時代の到来とは言い難い状況にある。特に胃癌肝転移はきわめて予後不良な転移形式であるが、有効な治療戦略の構築が進んでいない。

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。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、各転移経路、あるいは転移先臓器に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。我々は次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析を肝転移に的を絞って応用することで、肝転移に特化した鋭敏な診断マーカーおよび分子標的治療薬を開発する糸口をつかんでおり、この知見をさらに深めることを本研究の目的とした。

同時肝転移を有する胃癌症例から得られた組織を対象とした transcriptome 解析 (HiSeq, Illumina 社) により胃原発巣癌部、胃正常部、肝転移巣組織の3群間で網羅的発現解析を行った。その結果、KLRG2 が胃癌原発巣において胃非癌部に対し約 42 倍の発現度で有意に発現亢進していることを見出した。

これを検証するための pilot data として行った 78 例の胃切除検体を対象とした KLRG2 mRNA 発現解析では、胃原発巣での KLRG2 mRNA 発現は、同時性肝転移例もしくは胃切除術後 2 年以内に肝転移再発をきたした症例において有意に高値であった。以上より KLRG2 を胃癌肝転移関連分子としてさらに研究を進めるべき有望な候補として着目し、診断・治療の両面における有用性を探る目的で、本研究を着想した。

	胃原発巣 vs 胃非癌部		肝転移巣 vs 胃原発巣	
	log ₂	P	log ₂	P
KLRG2	5.418	<0.001	-0.944	NS

2. 研究の目的

本研究の目的は、独自の transcriptome 解析から胃癌肝転移関連分子候補として同定した killer cell lectin like receptor G2 (KLRG2) の胃癌細胞における機能、肝転移形成能への関与、発現度の臨床的意義を調べることにより、個別化治療実現に向けた胃癌肝転移分子標的治療薬およびそのコンパニオン診断法開発の基盤となるデータを得ることである。

遠隔転移を有する胃癌は Stage IV 胃癌としてひとくりに扱われており、腹膜播種、血行性転移、リンパ行性転移の転移巣成立機序が異なるであろう事実が反映されていないことが治療開発における大きな問題である。本研究では、未だ治療法開発の目途が立っていない肝転移に特化して治療標的候補 KLRG2 の機能解析を行った。KLRG2 の発現や in vitro での機能解析のみでなく、in vivo 実験でその発現調節により腫瘍形成を抑制できるとの仮説を検証した。これは、新たな分子標的治療の提案という観点において重要である。さらに、手術検体を用いた mRNA 発現解析、免疫組織学的染色法により個別化医療において重要なコンパニオン診断法開発の基盤データ取得を目指した。

3. 研究の方法

胃癌肝転移関連分子候補である KLRG2 についての詳細な発現・機能解析を行うべく、以下のように実験を実施した。

【in vitro 実験】

機能解析

KLRG2 の高発現胃癌細胞株 MKN1 に対して CRISPR/Cas9 protein 法によるゲノム編集を行い、シングルセルクローニングを経て安定的 KLRG2 ノックアウト (KO) 株を

樹立した。これと親株を用いて、細胞増殖能、浸潤能、細胞遊走能を評価した。さらに、再現性を確認しつつ KLRG2 の癌細胞機能調節に関するデータを拡大すべく、siRNA を用いた一過性 KLRG2 ノックダウンによる細胞増殖能、浸潤能、遊走能、接着能、アポトーシス細胞比率、カスパーゼ活性、細胞周期について調査した。さらに、レスキュー実験として KLRG2 強制発現によって細胞増殖能が増加するかについても確認した。

シグナル解析

KLRG2 の悪性腫瘍における役割には未知の部分が多く、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。PCR array を用いて、網羅的に癌進展に関与する分子の発現状態と KLRG2 の関連性を調べた。さらに、Western blotting 法で細胞内主要シグナルのリン酸化状態について調査した。

【in vivo 実験】

マウスの皮下腫瘍モデル、腹膜播種モデルを用いて、KLRG2 抑制による腫瘍形成能・増殖能を評価した。

【発現解析】

手術検体を対象とし、癌部および非癌部組織中の KLRG2 mRNA 発現度を定量的 PCR 法で測定した。KLRG2 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解析する。特に、治癒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する。さらに、免疫染色法を実施し、同様の解析を行った。

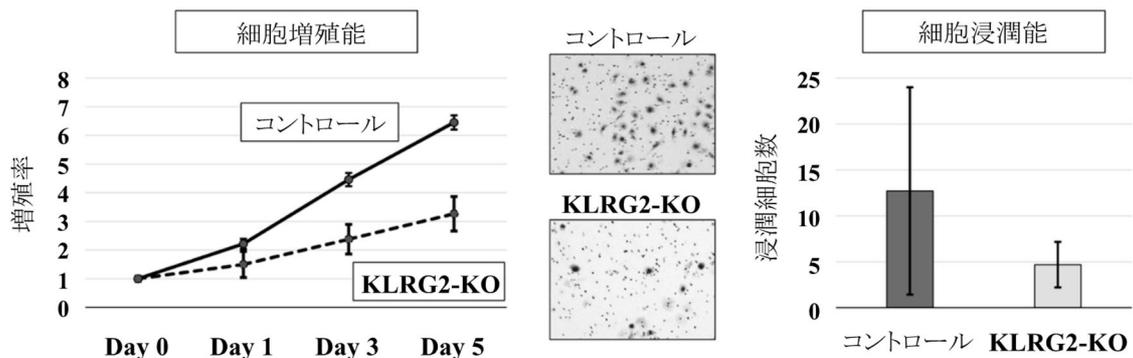
4. 研究成果

本研究の主な成果を以下に示す。

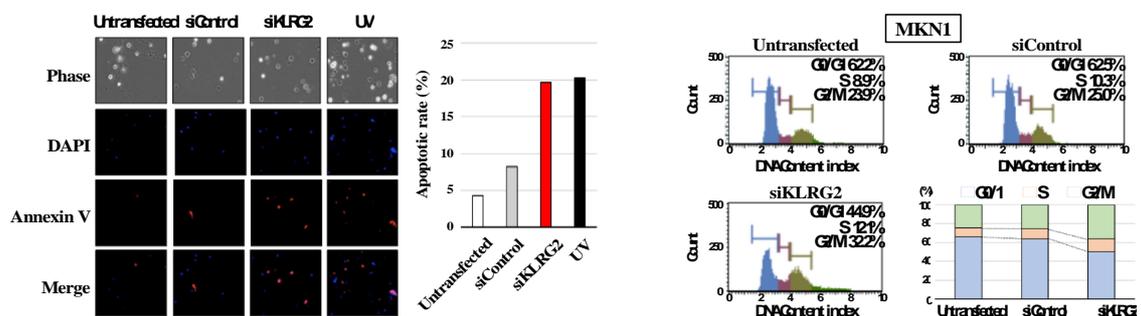
【in vitro 実験】

機能解析：

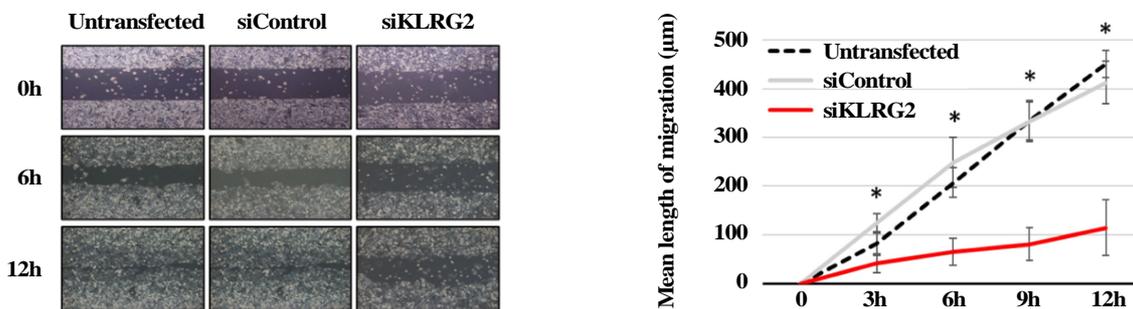
安定的に KLRG2 を喪失させた胃癌細胞株では、親株と比較して細胞増殖能、細胞浸潤能、細胞遊走能が低下した。



siRNA を用いた一過性 KLRG2 ノックダウンにより、以下の所見を認めた。細胞増殖能が低下した。その主因として KLRG2 抑制によるアポトーシス細胞 (Annexin V 陽性細胞) 比率上昇、カスパーゼ活性増加、細胞周期 G2M 期の増加が示唆されるデータを得た。



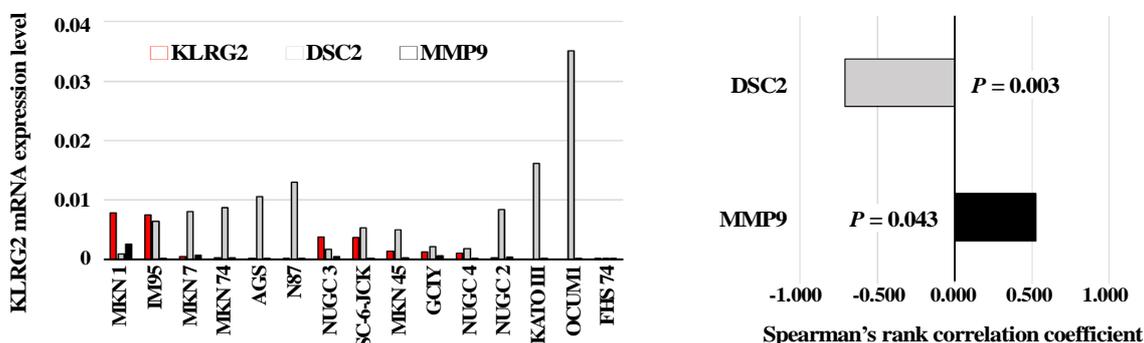
また、癌細胞転移に必要な細胞浸潤能、遊走能も、KO 株での結果と一致して有意に低下した。



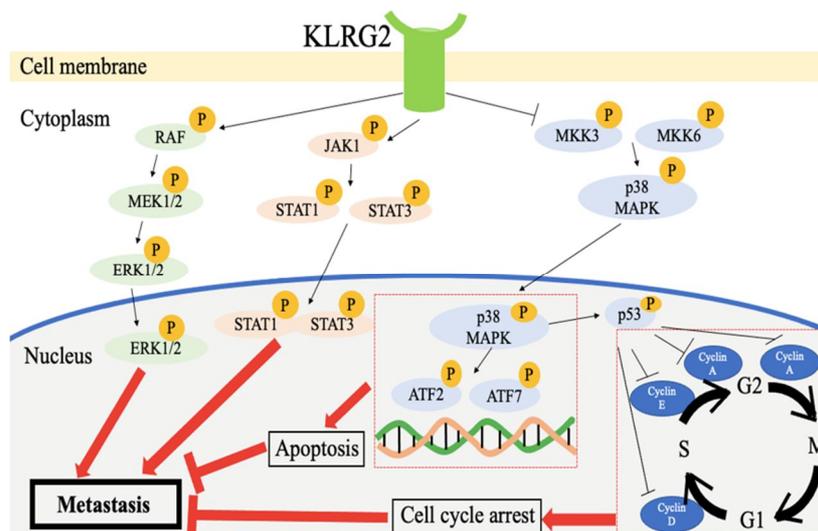
反対に、KLRG2 をベクターにて強制発現させることにより、細胞増殖能は亢進した。

シグナル解析

PCR array で網羅的に癌進展に関与する分子の発現状態と KLRG2 発現レベル関連性を調べたところ、KLRG2 発現に強く相関する癌関連遺伝子として DSC2 および MMP9 が同定された。



さらに、Western blotting 法で細胞内主要シグナルのリン酸化状態について調査した結果、KLRG2 は MAPK シグナルと JAK/STAT シグナルの双方を調節し、細胞周期関連因子にも作用することにより、癌細胞機能に関与しているものと考えられた。



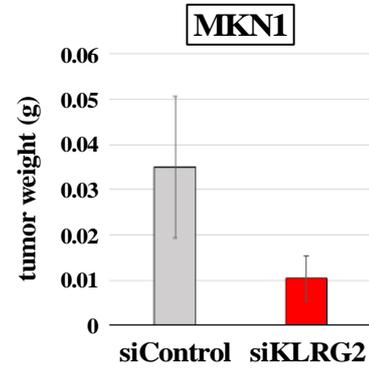
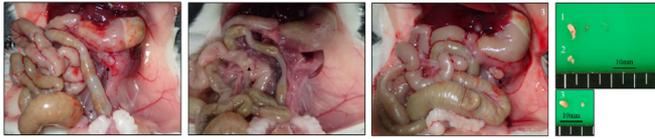
【in vivo 実験】

マウス皮下腫瘍モデルでは、KLRG2 喪失により造腫瘍能の低下を認めた。また、腹膜播種モデルでの解析では、KLRG2 発現が阻害された癌細胞を腹腔内に移植した群では、有意に播種巣形成が抑制されていた。

siControl



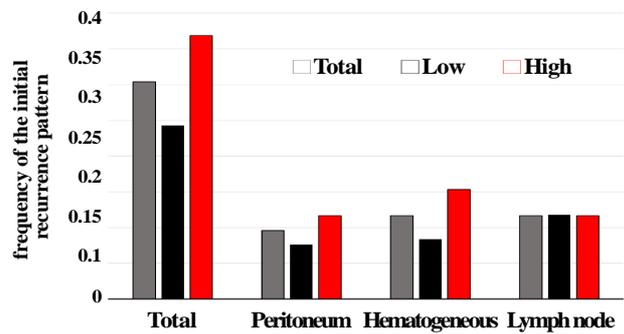
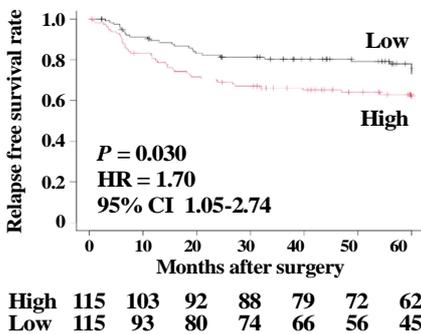
siKLRG2



これらの結果から、KLRG2 は胃癌の転移巣形成に寄与していることが in vivo でも示された。

【発現解析】

癌部 KLRG2 mRNA 発現度を定量的 PCR 法で測定し、臨床病理学的因子との相関解析を実施した。癌部 KLRG2 高発現症例群では、進行度が高く、生存期間は短縮していた(左図)。さらに累積血行性転移発生頻度が上昇していた(右図)。



免疫染色法による FFPE 組織中 KLRG2 蛋白発現解析も同様の結果であり、KLRG2 強発現症例群では治癒切除後の累積肝転移再発率が有意に高かった。

これまで、予後不良な胃癌肝転移においては新たな薬物療法の開発は進んでいないのが実情である。本研究では次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を肝転移に絞って応用することで独自性の高い標的分子 KLRG2 を同定し、その胃癌悪性形質形成における役割を明らかにした。この成果は、肝転移に特化した分子標的治療薬開発の糸口となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------