

FRAS1 を標的とした胃癌肝転移特異的な治療・診断法の開発

名古屋大学医学部附属病院

消化器外科 2 医員 田中晴祥

名古屋大学大学院医学系研究科

消化器外科学 教授 小寺泰弘

助教 神田 光郎

社会人大学院生 三輪 高嗣

1. 研究の背景・目的

胃癌診療は、ヘリコバクターピロリ除菌療法による発癌予防、検診の普及や内視鏡の早期胃癌診断能向上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は、HER2 陽性胃癌に対する trastuzumab (ToGA 試験、Bang YJ, et al. Lancet 2010)、最近では ramucirumab (Rainbow 試験、Wilke H, et al. Lancet Oncol. 2014) のみが国内承認を得ている状況である。今後これに PD-1 阻害薬が加わることが期待されているが (KEY-NOTE 試験) 個別化治療時代の到来とは言い難い。また腫瘍マーカーについては、CEA・CA19-9 といった古典的マーカーの普及から 20 年以上が経つ現在でも感度・特異度ともに不十分なまま汎用されており、それら以上に有用な新規マーカーの実用化には至っていない。

一方、2007 年に本邦における大規模第Ⅲ相臨床試験 (ACTS-GC 試験) において胃癌の術後補助化学療法としての S-1 単独療法が有意に生存期間を延長したが (Sakuramoto S, et al. 2007)、補助化学療法により腹膜転移再発率は大きく低下しているものの (Sasako M. et al. 2011)、肝転移をはじめとする血行性転移再発については十分に制御されているとは言い難い。胃癌治療ガイドラインにおいても第 4 版ではじめて胃癌肝転移に対する外科的切除に関する方向性が示されており、臨床の現場では胃癌診療における肝転移の重要性が増している。

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とされており、そのメカニズムの実際についてはこれまで様々な議論がなされてきた。

(Brosnan JA, et al. 2012)。近年では次世代シーケンサーやマイクロアレイといった網羅的な解析手法により、転移のメカニズムの分子生物学的な背景が明らかにされつつある。網羅的解析法を肝転移に的を絞った発現解析に応用することで、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開発の糸口をつかむことを本研究の目的とした。

申請者は、胃癌肝転移の成立に関わり、肝転移を制御するにあたり新たな治療標的となりうる分子を同定すべく、肝転移を有する胃癌症例 4 例から得られた原発巣、肝転移巣、および非癌部を対象として次世代シーケンサー HiSeq (Illumina 社) を用いて Transcriptome 解析を行った。その結果、胃非癌部に比して肝転移巣のみならず胃原発巣でも発現亢進している、すなわち原発巣で既に強発現し、転移を成立させる機能的側面を持っている可能性がある遺伝子として、Fraser extracellular matrix complex subunit 1 (FRAS1) を検出した (下表)。FRAS1 は発生の段階において、表皮-基底膜接着および器官形成を調節する細胞外基質蛋白をコードするとされ、その変異が Fraser Syndrome に関与する遺伝子として同定されたが、消化器癌だけでなく、消化器癌における報告は皆無である。本研究では FRAS1 を胃癌肝転移に対する診断マーカーおよび治療標的分子候補として、その発現および機能を詳細に検討することとした。

| | 肝転移再発群 vs 無再発群 | | 腹膜播種再発群 vs 無再発群 | | リンパ節再発群 vs 無再発群 | |
|-------|----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|
| | log ₂ | p値 | log ₂ | p値 | log ₂ | p値 |
| FRAS1 | 2.32 | 0.0001 | 0.59 | 0.4391 | 1.58 | 0.3087 |

2. 研究の対象ならびに方法

- ・ノックアウト (以下 KO) 細胞株の樹立

FRAS1 の高発現胃癌細胞株に対して、CRISPR/Cas9 protein 法を用いたゲノム編集による KO 株を作成し、シングルセルクローニングを行い、nucleotides sequence 法にてゲノム編集の成否を確認し、KO 株を樹立する。

- ・FRAS1 の機能解析

上記で得られた KO 細胞株と親株の間で増殖能、浸潤能、遊走能、接着能を比較する。細胞株の増殖および浸潤能は Cell Proliferation Assay および Matrigel Invasion Assay、遊走能を Wound healing Assay、接着能を ECM Cell Adhesion Assay により評価する。

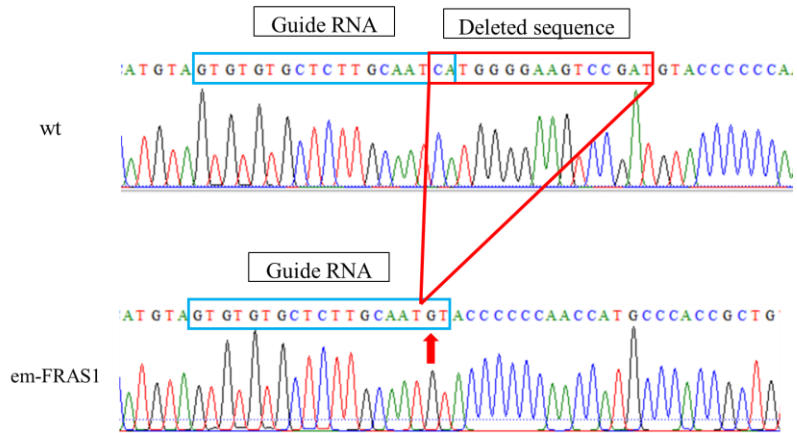
- ・FRAS1 発現の臨床的意義の検証

当教室が継続して胃癌患者から収集した検体を対象とする。癌部および非癌部組織中の FRAS1 mRNA 発現度を定量的 PCR 法で定量する。FRAS1 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検討する。

3. 研究結果

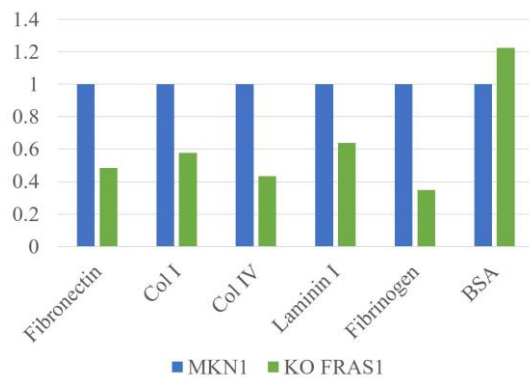
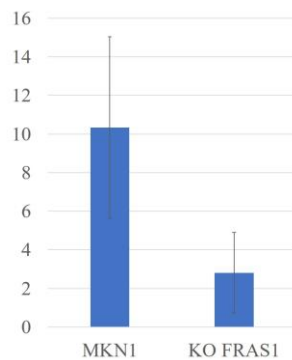
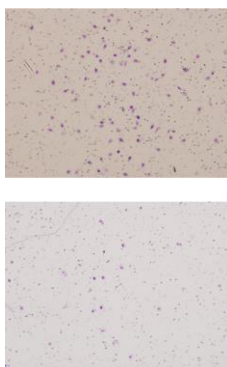
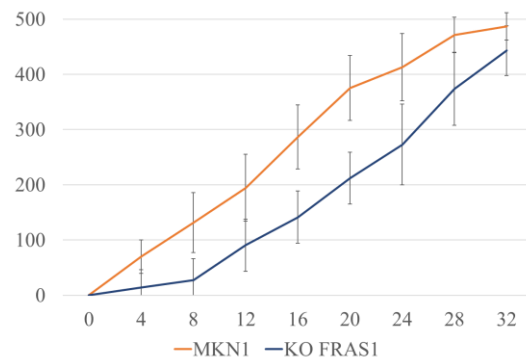
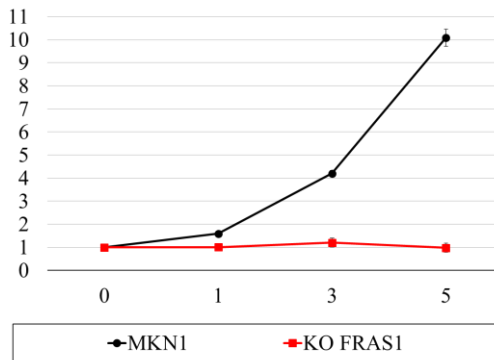
・FRAS1 のゲノム編集

CRISPR/Cas9 法をもちいてゲノム編集を行い、シングルセルクローニングを施行してKO株を樹立した。Nucleotide sequence を行うと、親株と比較して、10塩基の脱落を認め、(右図)ゲノム編集されていることを確認した。



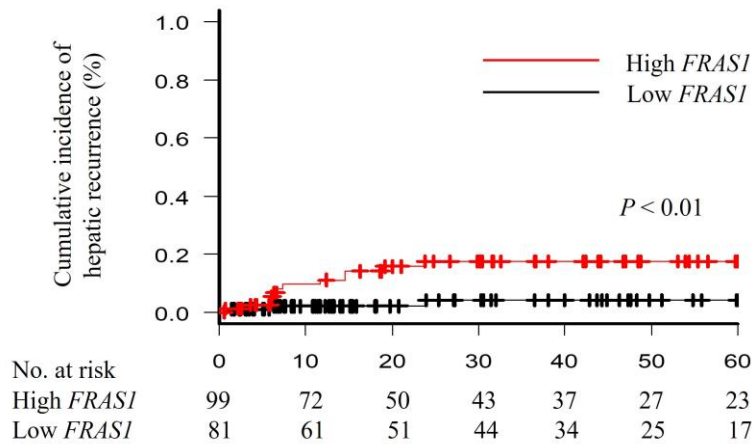
・FRAS1 の機能解析

上記で得られたKO細胞株と親株の間で増殖能(下図 左上)、浸潤能(同 左下)、遊走能(同 右上)、接着能(同 右下)を比較すると、いずれにおいても抑制されていた。



・FRAS1 発現の臨床的意義の検証

FRAS1 mRNA 高発現群において、累積肝転移再発は有意に高率であった（下図）



4. 考察

FRAS1 の発現は胃癌の悪性度に関与し、その高発現は予後、特に肝再発を予測する因子である。FRAS1 の癌における報告は皆無であり、新規癌遺伝子として、肝転移を予測するバイオマーカーとして、あるいは新規治療標的分子として期待される。

5. 文献

1. Sakuramoto S, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N Engl J Med* 2007;357:1810–20.
2. Sasako M, et al. Five-year outcomes of a randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:4387–93.
3. Bang YJ, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010;376:687–97.
4. Wilke H, et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15:1224–35.
5. Brosnan JA, Iacobuzio-Donahue CA. A new branch on the tree: next-generation

- sequencing in the study of cancer evolution. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23:237–42.
6. Kodera Y, et al. Surgical resection of hepatic metastasis from gastric cancer: a review and new recommendation in the Japanese gastric cancer treatment guidelines. *Gastric Cancer* 2014;17:206–12.
 7. McGregor L, et al. Fraser syndrome and mouse blebbed phenotype caused by mutations in FRAS1/Fras1 encoding a putative extracellular matrix protein. *Nature Genetics* 2003;34:203–8.
 8. Kanda M, Shimizu D, Tanaka H, et al. Significance of SYT8 for the detection, prediction, and treatment of peritoneal metastasis from gastric cancer. *Ann Surg* 2018;267:495–503.
 9. Tanaka H, et al. FAM46C Serves as a predictor of hepatic recurrence in patients with resectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2017 Oct;24:3438–45.
 10. Tanaka H, et al. Pattern-specific transcriptomics identifies ASGR2 as a predictor of hematogenous recurrence of gastric cancer. *Mol Cancer Res* (accepted)

6. 論文発表

FRAS1 遺伝子発現と胃癌悪性度に関する検討 2018. 04. 07 第 118 回外科学会定期学術総会