

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06868

研究課題名(和文) 幹細胞を利用した内照射療法の基礎的検討

研究課題名(英文) Basic Analysis for internal radiation therapy using stem cell

研究代表者

野村 幸世 (Nomura, Sachiyo)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70301819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌腹膜播種の癌細胞周囲に癌間質細胞を伴っており、多くが骨髄由来細胞であることを見出した。また、C57BL/6マウス可移植性胃癌細胞株を樹立した。これを用いて、マウス胃癌腹膜播種モデルを作成した。骨髄由来間葉系幹細胞にヨードトランスポーターをトランスフェクションし、NIS発現骨髄由来間葉系幹細胞の作成が完了した。

樹立したマウス可移植胃癌細胞株においてCRISPR/CAS9を用い、遺伝子をノックダウンできることを確認し、骨髄由来間葉系幹細胞を癌周囲により集積させられる可能性を検討した。また、GFP発現骨髄由来間葉系幹細胞を作成し、効率的に癌周囲に骨髄由来間葉系幹細胞が集積する方法を見出した。

研究成果の概要(英文)：We established mouse gastric cancer cell lines that can be transplanted into C57BL/6 mice, and found that cancer associated fibroblast is of bone marrow origin. Gastric cancer peritoneal dissemination model was established with these cell lines. NIS was transfected into bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMDC) that were already transfected with SV40T large antigen, and NIS expressing BMDC was established.

CRISPR/CAS9 system was confirmed to use for gene knock-down for the gastric cancer cell lines, and the methods for gathering BMDC around the peritoneal disseminated cancer cells were analyzed. And GFP expressing BMDC was used and the way to gather BMDC efficiently around peritoneal disseminated gastric cancer cells were established.

研究分野：消化器癌治療

キーワード：胃癌 腹膜播種 内照射 間葉系幹細胞 放射性ヨード

1. 研究開始当初の背景

胃癌腹膜播種は患者の QOL を著しく低下させるとともに、治癒困難、手術も不能は胃癌の転移形式である。これに対する有効な治療法はいまだ開発は不十分である。昨今、腹腔内に直接抗がん剤を注入する治療法が行われているが、全身化学療法と比し、生命予後を大きく改善するということはない。このため、胃癌腹膜播種に対する、新たな治療法を開発することは、胃癌の多い我が国にとって喫緊の課題である。

胃癌腹膜播種治療法が開発困難な理由の一つとして、免疫力を有するマウスの胃癌腹膜播種モデルが存在しないことが挙げられる。現存する胃癌腹膜播種モデルマウスは免疫不全状態にあるヌードマウスにヒト胃癌細胞株を腹腔内注射するというものである。このモデルでは、昨今の免疫治療などの研究には応用できない。また、今回の研究で目している、放射線治療においても、放射線によって腫瘍が崩壊した際には、その免疫原性から腫瘍免疫が惹起され、免疫不全マウスによる実験とは異なる結果が得られるはずであるが、そのモデルは存在しなかった。

一方、放射性ヨードによる腫瘍内照射療法という治療法が、甲状腺癌においてはすでに臨床応用されていることが知られている。これは、甲状腺癌のヨードを細胞内に取り込む、という元来の性質を利用した治療法である。胃癌においては、元来、ヨードを細胞内に取り込む性質はないが、癌細胞周囲に **Cancer Associated Fibroblast (CAF)** という間質を伴うことが知られている。悪性度の高い胃癌として知られているスキルス胃癌においては、この CAF の顕著な集簇が観察される。

2. 研究の目的

最初の目的は、胃癌腹膜播種治療実験が可能なマウス胃癌による免疫を有するマウス腹膜播種モデルを作成することであった。

さらに、この周囲に形成される CAF の起源を同定し、その元となる細胞にヨードトランスポーターを発現させることである。

さらに、外から投与したヨードトランスポーター発現 **Fibroblast** が腹膜播種周囲に CAF として存在するようにすることを検討した。

3. 研究の方法

p53 ヘテロノックアウトマウス (C57BL/6 バックグラウンド) と C57BL/6 マウスに Methyl Nitroso Urea (MNU) 30 ppm を飲用水に混入し、9週間、隔週投与した。1年後にマウスを安楽死し、胃癌を取り出し、培養を行った。

培養可能であった胃癌細胞を C57BL/6 マウスの皮下に移植し、腫瘍が形成されるかを観察した。形成された腫瘍を摘出し、さらに、培養、サブクロニングを行った。

サブクローンされた細胞株を C57BL/6 マウスの皮下、または腹腔内に投与し、腫瘍が形

成される率、皮下に腫瘍ができた場合の転移率をクローンごとに比較検討した。

腹膜播種を形成した YTN16



さらに、クローンごとの発現遺伝子をマイクロアレイにて観察し、悪性度の高いクローンで発現が更新している遺伝子である FGFR4 に着目し、これを CRISPR/Cas9 にてフレームシフトを起こさせ、機能的な FGFR4 が発現しないようにした場合の腫瘍の生着、生育を観察した。

さらに、FGFR4 のインヒビター BLU9931 を用い、同様のことが観察されるかを検討した。

GFP マウスの骨髄を移植した C57BL/6 マウスに腹膜播種モデルを作成し、骨髄由来細胞が CAF となっているかを観察した。

C57BL/6 マウス骨髄間葉系幹細胞に SV40-T antigen を導入し、不死化したものに、ヨードトランスポーター (NIS) をトランスフェクションし、強制発現させた。これを上記にて作成したマウス胃癌腹膜播種モデルに経静脈的、または、腹腔内に投与して、CAF となりうるかを観察した。

4. 研究成果

C57BL/6 マウス可移植マウス胃癌細胞株 YTN2, YTN3, YTN5, YTN16 を樹立することができた。これらは、C57BL/6 マウスへの腫瘍形成能、皮下腫瘍の転移能に下記の表のごとく差があった。

Table 1 Tumorigenicity and Metastasis

Cell Line	Tumorigenicity in mouse (%)	Metastasis ^a		
		Lung	Lymph-node	Peritoneum
(YTN 2)	7/7 (100)	5/7 (87.8 ± 65.1)	2/7	2/5
(YTN 3)	3/8 (37.5)	2/3 (20.0 ± 25.5)	0/3	1/5

(YTN 5)	11/11 (100)	9/11 (27.8 ± 29.2)	3/11	5/5
(YTN 16)	8/8 (100)	7/8 (41.9 ± 48.6)	3/8	5/5

a : Tumorigenicity and spontaneous metastasis of the s.c. injection of 5×10^6 cells

これら細胞株の中では、YTN5 と YTN16 の悪性度が高いものと思われた。マイクロアレイの結果以下のように、FGFR4 の発現が YTN5, YTN16 で YTN2, YTN3 よりも高いことがわかった。

GeneSymbol	YTN16 /YTN2	YTN5 /YTN2	YTN16 /YTN3	YTN5 /YTN3
Fgfr4	121.11 25541	184.7 38816 7	9.8800 47087	15.07 05120 7

このため、YTN16 の FGFR4 をノックダウンした結果、YTN2, YTN3 と同様に悪性度が低下することがわかった。

また、FGFR4 のインヒビターである BLU9931 をマウスに投与したところ、やはり、皮下に移植した YTN16 も腹腔内投与した YTN16 もその成長が抑制されることがわかった。

次に、GFP マウス由来骨髄細胞を C57BL/6 マウスに移植し、このマウスに YTN16 を腹腔内投与し、腹膜播種を作成したところ、CAF には大量に GFP 陽性細胞が認められ、CAF の多くは骨髄由来細胞であることがわかった。GFP マウス由来骨髄間葉系幹細胞を腹膜播種モデルに投与したところ、静脈投与よりも腹腔内投与にて CAF の多くに取り込まれることがわかった。

SV40T にて不死化した C57BL/6 マウス由来骨髄間葉系幹細胞にヒトヨードトランスポーターNIS をトランスフェクションし、強制発現する細胞を形成することができた。これを腹膜播種モデルの腹腔内に投与し、放射性ヨードを投与することにより、内照射療法が可能になるものと思っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yamamoto M, Nomura S, Hosoi A, et al.
Established gastric cancer cell lines
transplantable into C57BL/6 mice show
fibroblast growth
factor receptor 4 promotion of tumor growth.
Cancer Science, 2018, DOI: 10.1111/cas.13569

[学会発表] (計 4 件)

野村幸世、山本昌美、松下博和 et al. C57BL/6
マウス可移植マウス胃癌細胞株の樹立とその腫瘍形成能、腹膜播種形成能に関わる遺伝子の検討
第72回日本消化器外科学会総会 2017 年

野村 幸世、山本 昌美、細井 晃弘 et al.
C57BL/6 マウス可移植マウス胃癌細胞株の樹立と FGFR4 の腫瘍形成能、腹膜播種形成能に関わる検討
第76回日本癌学会学術総会 2017 年

野村 幸世、山本 昌美、細井 晃弘 et al.
C57BL/6 マウス可移植胃癌細胞株の樹立と FGFR4 高発現株に対する FGFR4 inhibitor 投与による腹膜播種制御 第104回日本消化器病学会総会 2018 年

Sachiyo Nomura, Masami Yamamoto, Yasuyuki Seto, et al. TFF expression in most virulent mouse gastric cancer cell line transplantable to C57BL/6 mouse. 第89回日本胃癌学会総会 2017 年

[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：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 幸世 (NOMURA Sachiyo)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：70301819

(2) 研究分担者

細谷 紀子 (HOSOYA Noriko)
東京大学・疾患工学生命センター・講師
研究者番号：00396748

(3) 連携研究者

百瀬 敏光 (MOMOSE Toshimitsu)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：20219992

(4) 研究協力者

()