

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14389

研究課題名(和文) 胃癌腹膜転移におけるエプスタイン・バーウィルス関連Bリンパ腫の役割に関する研究

研究課題名(英文) Roles of Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma for peritoneal metastasis of gastric cancer

研究代表者

小松 将之 (Komatsu, Masayuki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・リサーチレジデント

研究者番号：10749500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がんの転移は治療を困難にする最も大きな要因の一つであることから、転移に関する分子機構の解明は革新的な治療法の開発に貢献できると考えられる。本研究では、未分化型胃癌および食道扁平上皮がん患者の転移巣(腹腔・リンパ節)において、エプスタイン・バーウィルス感染Bリンパ腫細胞が高頻度で存在していることを発見した。さらに、未分化型胃癌においては当該リンパ腫が腹膜上の中皮細胞を活性化させることで、腹膜における腫瘍の生存及び進展に寄与していることを明らかにした。これらの知見は、当該リンパ腫細胞が間質成分への作用を介してがんの転移を促進する微小環境を形成しており、新たな治療標的となる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Since metastasis is one of the most common phenotypes and cause of death in various cancers, elucidation of molecular mechanism of metastasis and tumor progression at metastasis foci may lead to development of innovative therapeutic modalities. In this study, we discovered Epstein-Barr virus (EBV)-associated B-cell lymphoma cells (BCL) are highly present at the metastatic foci (e.g. peritoneum and lymph node) of diffuse-type gastric cancer (DGC) and esophageal squamous cell carcinoma patients. By the molecular biological approach, we revealed that the BCL cells contribute tumor survival at peritoneum via activation of the mesothelium in peritoneal metastasis of DGC. Moreover, the BCL cells also promote distal metastasis of DGC cells in vivo. Taken together, these findings indicate that EBV-associated BCL can establish favorable niche for metastasis. Therefore, these BCL cells may be an attractive metastasis control target.

研究分野：腫瘍学

キーワード：未分化型胃癌 食道扁平上皮がん エプスタイン・バーウィルス Bリンパ腫 転移

1. 研究開始当初の背景

(1)世界的に胃がんはがん種別で第3位の死因を占めており、特に主要な組織型の一つである未分化型胃がんは、進行期には高頻度で腹膜播種を来し、治療困難な癌性腹膜炎へと発展することから、予後不良であることが知られている。従って、腹腔に転移したがんの本態解明は、当該疾患の治療成績改善に貢献すると考えられる。

(2)我々は先行研究から、未分化型胃がん患者の貯留腹水中には、転移した胃がん細胞とともにエプスタイン・バーウイルス(EBV)感染 B リンパ腫細胞が存在することを発見した。さらに、上記リンパ腫細胞は *in vivo* において、腹膜を構成する中皮細胞を活性化させることを見出した。しかし、未分化型胃がんの転移における上記リンパ腫細胞の役割は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、未分化型胃がん患者の腹腔内に存在する EBV 感染 B リンパ腫細胞および当該リンパ腫細胞により活性化される中皮細胞の特性評価を行うとともに、「胃がん細胞・活性化中皮細胞・リンパ腫細胞」の相互関係によって形成される微小環境の解析を通じ、未分化型胃がんの転移における当該リンパ腫の臨床的意義を明らかにする。また、当該リンパ腫細胞の出現が未分化型胃がんに限らず、他の固形腫瘍も含めた普遍的な現象であるかも追求する。一連の研究により、転移を制御するという観点から固形腫瘍における当該リンパ腫を標的とした治療戦略の妥当性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 固形腫瘍からの EBV 感染 B リンパ腫の検出

未分化型胃がん患者の貯留腹水から EBV 感染 B リンパ腫細胞株の樹立を行った。また、臨床検体として患者の貯留腹水だけでなく、手術検体から EBV 感染 B リンパ腫細胞の検出を行った。さらに、食道扁平上皮がんについても、原発・転移巣双方から当該リンパ腫細胞の検出を試みた。

(2) 樹立細胞株の特性評価

樹立した活性化中皮細胞および EBV 感染 B リンパ腫細胞株の遺伝子発現解析ならびにマウス移植による造腫瘍性試験・病理組織学的染色を行い、生物学的特性を評価した。

(3) 胃がん細胞と活性化中皮細胞との相互作用の解析

未分化型胃がん患者腹水沈渣の初代培養および樹立細胞株の共培養等の手法により、活性化中皮細胞が胃がん細胞の増殖・生存へ与える影響を評価した。さらに、上記検体および細胞株のマウスへの混合移植により、転移

巣における腫瘍の進展および遠隔転移の有無等を評価した。

4. 研究成果

(1) 未分化型胃がん・食道扁平上皮がんにおける EBV 感染リンパ腫細胞の検出
未分化型胃がんの臨床検体を用いたゲノム PCR の結果、原発巣では 65 例中 6 例 (9.2%) であったのに対して、貯留腹水中では 33 例中 6 例 (18.2%) で EBV 陽性を確認した (図 1)。すなわち、未分化型胃がんにおいて EBV 感染 B リンパ腫様細胞は原発巣よりも転移巣に高頻度で存在しており、転移との関連が示唆された。一方で、扁平上皮食道がん患者の手術検体においても、高頻度 (24 症例中 15 例) で EBV 陽性を認めたことから (図 1)、上記 B リンパ腫様細胞は未分化型胃がんのみならず、他の固形腫瘍とも共存していることが明らかになった。

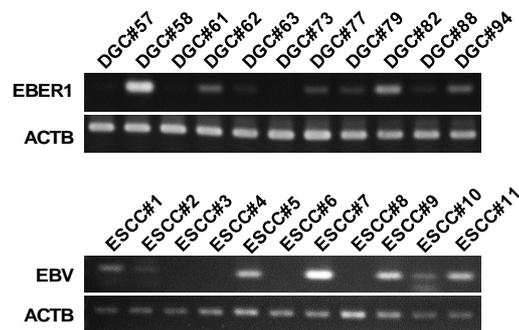


図 1. 未分化型胃がん患者貯留腹水 (上) および食道扁平上皮がん患者手術検体 (下) からの EBV 陽性細胞の検出

(2) EBV 感染 B リンパ腫細胞株の樹立とその生物学的特性評価

未分化型胃がん患者の貯留腹水から細胞株の樹立を行った結果、胃がんの 43 症例に対して当該リンパ腫様細胞は 9 症例 12 株 (9/43, 21%) の樹立に成功した。リンパ腫様細胞株を樹立できた確率と臨床検体の EBV 陽性頻度が同程度であったことから、腹水中に存在する B リンパ腫様細胞の多くは自律増殖可能であることが示唆された。また、細胞の株化過程では、培養初期には当該リンパ腫様細胞と胃がん双方が存在していたが、最終的には胃がん細胞が淘汰される現象が観察された。従って、リンパ腫様細胞と胃がん細胞は直接的に相利共生の関係にはないことに加えて、リンパ腫が存在している症例の胃がん細胞は自律増殖できず、上記リンパ腫以外の要素が生存・増殖に必要であることが示唆された。

食道扁平上皮がんに関しても、転移巣からの細胞株の樹立を行い、胸管内リンパ液から EBV 感染 B リンパ腫様細胞を 2 株樹立することに成功した。従って、当該疾患で共存している B リンパ腫も未分化型胃がんと同様に自律増殖可能であり、転移巣における食道がん細胞の生存・増殖に直接影響を与えていない

ことが示唆された。

DNA マイクロアレイおよび SNP アレイ解析により、上記細胞株は未分化型胃癌とは異なる B リンパ腫固有の mRNA 発現プロファイル ($CD19^{high}$, $CD20^{high}$, $CD22^{high}$, $CD79^{high}$, $EPCAM^{low}$) を有し、ゲノム安定性が高いことが確認された (図 2)。また、細胞免疫染色とゲノム PCR により、上記細胞株はいずれも B 細胞マーカーである CD20 と EBV の感染を示す EBER1 を高発現していることも確認した。さらに、当該リンパ腫をマウス腹腔内に移植した結果、リンパ腫を形成することを病理組織染色等により確認した。以上の結果から、未分化型胃癌患者の貯留腹水中には EBV 感染 B リンパ腫が共存していることを明らかにした。

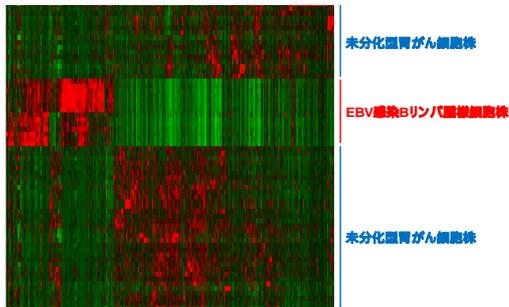


図 2. 未分化型胃癌および EBV 感染 B リンパ腫様細胞株の遺伝子発現プロファイル

(3) 活性化中皮細胞の特性評価

上記で樹立した EBV リンパ腫細胞株 2 株をマウスの腹腔内に移植した結果、腹膜上にマウス由来細胞から構成される結節が形成された。さらにこの結節を *in vitro* で培養することで、マウス由来の細胞株を樹立した。遺伝子解析および中皮細胞のマーカーである Mesothelin の細胞染色等によって、上記がマウス中皮細胞であることを見出した。さらに当該細胞株をマウス皮下に移植した結果、微小ながらも腫瘍を形成したことから、上記 EBV リンパ腫細胞株にはマウス中皮細胞を活性化し、さらに不死化・がん化させる働きがあることが示唆された。

(4) 転移巣における胃癌細胞と活性化中皮細胞との相互作用の解析

ここまでの結果から、EBV 感染 B リンパ腫は中皮細胞の活性化を介して胃癌細胞の生存・増殖に影響を与えることが示唆されたため、胃癌細胞と活性化中皮細胞との相互作用を評価した。

腹水中における胃癌細胞と中皮細胞との相互作用を評価するため、未分化型胃癌患者 75 症例の腹水沈渣を *ex vivo* で培養した結果、患者自身の中皮細胞に依存している症例は 26% (20 例) と高頻度で存在した。従って、中皮細胞が腹腔内における胃癌細胞の生存・増殖に必要であることが明らかになった。しかし、腹水から樹立できた胃癌細胞

株の多くは、元來中皮細胞に依存しておらず、上記で樹立したマウス活性化中皮細胞との共培養においても細胞の増殖・生存に影響を与えなかった。また、初代培養において、中皮細胞依存性の胃癌細胞のフィーダーをマウス活性化中皮細胞に置換することはできなかった。以上から、患者自身もしくは同一種種の活性化中皮細胞との相互作用が増殖・生存に必要であることが示唆された。ただし、マウス活性化中皮細胞をフィーダーとして継代可能な胃癌細胞を 1 株樹立することには成功し、上記細胞は活性化中皮細胞が存在しない環境下では細胞死が誘導された。

上記で樹立した中皮細胞依存性の胃癌細胞と活性化中皮細胞とを混合移植したマウス腹膜播種モデルでは、腹膜上に両方の細胞から構成される結節を形成したことから、活性化中皮細胞から成る微小環境が腫瘍の進展に必要であることが示唆された (図 3)。重要なことに、EBV 感染 B 細胞株を樹立した患者腹水沈渣をマウスの腹腔内に移植したところ、リンパ節への遠隔転移を来したことから、当該細胞が腹膜転移だけではなく遠隔転移にも寄与することが示唆された。

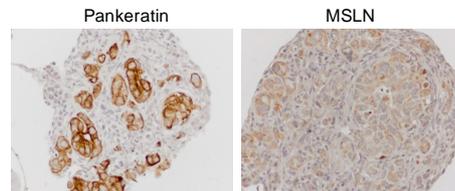


図 3. 中皮細胞依存性胃癌細胞株と活性化中皮細胞との混合移植により形成された微小結節の免疫組織学的解析

以上、本研究を通して未分化型胃癌および食道扁平上皮がん患者の転移巣では、EBV 感染 B リンパ腫細胞が高頻度で存在しており、特に未分化型胃癌においては当該リンパ腫が腹膜上の中皮細胞を活性化させることで、腹膜における腫瘍の生存及び進展に寄与していることを明らかにした (図 4)。これらの知見は、当該リンパ腫細胞が間質成分への作用を介してがんの転移を促進する微小環境を形成しており、新たな治療標的となる可能性を示唆している。今後、同一症例からの B リンパ腫、中皮、株化がん細胞の再構築モデル等による更なる本態解明が期待される。

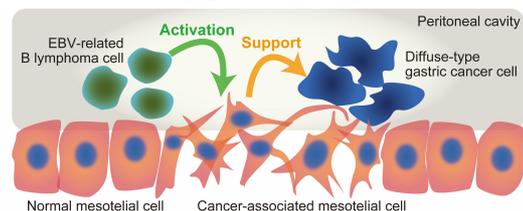


図 4. 腹腔内における EBV 感染 B リンパ腫の未分化型胃癌細胞に対する生物学的役割の想定モデル

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5件)

Nishimura T, Tamaoki M, Komatsuzaki R, Que N, Taniguchi H, Komatsu M, Aoyagi K, Minashi K, Chiwaki F, Shinohara H, Tachimori Y, Yasui W, Muto M, Yoshida T, Sakai Y, Sasaki H.

SIX1 maintains tumor basal cells via transforming growth factor- pathway and associates with poor prognosis in esophageal cancer.

Cancer Science

査読有り, Vol.108, 2017, 216-225.

doi: 10.1111/cas.13135.

Fukuoka S, Kojima T, Koga Y, Yamauchi M, Komatsu M, Komatsuzaki R, Sasaki H, Yasunaga M, Matsumura Y, Doi T, Ohtsu A. Preclinical efficacy of Sym004, novel anti-EGFR antibody mixture, in esophageal squamous cell carcinoma cell lines.

Oncotarget

査読有り, Vol.8, 2017, 11020-11029.

doi:10.18632/oncotarget.14209.

Tanabe S, Komatsu M, Aoyagi K, Yokozaki H, Sasaki H.

Implications of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer

Translational Gastrointestinal Cancer

査読有り, Vol.4, 2015, 258-264

doi: 10.3978/j.issn.2224-4778.2015.07.04

Tanaka Y, Aoyagi K, Minashi K, Komatsuzaki R, Komatsu M, Chiwaki F, Tamaoki M, Nishimura T, Takahashi N, Oda I, Tachimori Y, Arao T, Nishio K, Kitano S, Narumi K, Aoki K, Fujii S, Ochiai A, Yoshida T, Muto M, Yamada Y, Sasaki H.

Discovery of a Good Responder Subtype of Esophageal Squamous Cell Carcinoma with Cytotoxic T-Lymphocyte Signatures Activated by Chemoradiotherapy.

PLoS One

査読有り, Vol.10, 2015, 1-13

doi: 10.1371/journal.pone.0143804.

Fujita T, Chiwaki F, Takahashi R, Aoyagi K, Yanagihara K, Nishimura T, Tamaoki M, Komatsu M, Komatsuzaki R, Matsusaki K, Ichikawa H, Sakamoto H, Yamada Y, Fukagawa T, Katai H, Konno H, Ochiya T, Yoshida T, Sasaki H.

Identification and Characterization of CXCR4-Positive Gastric Cancer Stem Cells.

PLoS One

査読有り, Vol.10, 2015, 1-19

doi: 10.1371/journal.pone.0130808.

[学会発表](計8件)

小松将之、坂本裕美、千脇史子、市川仁、小松崎理絵、濱口哲弥、朴成和、河野隆志、松崎圭祐、落合淳志、吉田輝彦、佐々木博己、未分化型胃癌患者の腹膜転移細胞を対象にしたオミックス解析、第89回日本胃癌学会総会、広島国際会議場(広島県・広島市) 2017年3月9日

千脇史子、坂本裕美、小松将之、市川仁、小松崎理絵、濱口哲弥、朴成和、河野隆志、松崎圭祐、落合淳志、吉田輝彦、佐々木博己、革新的研究開発推進のためのアジアがん100細胞株プロジェクト(未分化型胃癌パネル) 広島国際会議場(広島県・広島市) 第89回日本胃癌学会総会、2017年3月9日

小松崎理絵、小松将之、千脇史子、渡辺寛、佐々木博己、基盤的研究開発推進のためのアジアがん100細胞株プロジェクト(食道扁平上皮がんパネル) 第75回日本癌学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2016年10月7日

千脇史子、坂本裕美、小松将之、市川仁、小松崎理絵、濱口哲弥、朴成和、河野隆志、松崎圭祐、落合淳志、吉田輝彦、佐々木博己、基盤的研究開発推進のためのアジアがん100細胞株プロジェクト(未分化型胃癌パネル) 第75回日本癌学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2016年10月7日

小松将之、坂本裕美、千脇史子、市川仁、小松崎理絵、濱口哲弥、朴成和、河野隆志、松崎圭祐、落合淳志、吉田輝彦、佐々木博己、未分化型胃癌の腹水中がん細胞を対象とした多層オミックス解析、第75回日本癌学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2016年10月6日

小松将之、田中庸介、青柳一彦、三梨桂子、小松崎理絵、高橋直樹、武藤学、山田康秀、佐々木博己、食道扁平上皮がんの化学放射線療法に対して感受性を示す腫瘍免疫活性化型サブタイプの同定、第74回日本癌学会総会、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市) 2015年10月9日

千脇史子、坂本裕美、小松将之、市川仁、小松崎理絵、濱口哲弥、朴成和、河野隆志、松崎圭祐、落合淳志、吉田輝彦、佐々木博己、革新的研究開発推進のためのアジアがん100細胞株プロジェクト(未分化型胃癌パネル) 第74回日本癌学会

総会、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）、2015年10月9日

福岡聖大、小島隆嗣、古賀宣勝、小松将之、小松崎理絵、佐々木博己、安永正浩、松村保広、土井俊彦、大津敦、食道扁平上皮癌細胞株における Sym004 の抗腫瘍効果、第74回日本癌学会総会、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）、2015年10月9日

〔図書〕(計1件)

佐々木博己、中村加奈子、小松将之、マイク
ロアレイによる癌診断薬開発の現状、遺伝子
医学 MOOK 29、57-62、メディカルドゥ、2015
年11月25日

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 将之 (KOMATSU Masayuki)
国立がん研究センター研究所・
創薬標的・シーズ探索部門・特任研究員
研究者番号：10749500

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし

(4) 研究協力者

該当者なし