

令和元年6月18日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10494

研究課題名(和文)胃癌腹膜播種における組織内IL-17産生細胞の機能解析と造腫瘍性についての検討

研究課題名(英文)Functional analysis of IL-17 producing cells in peritoneal metastasis of gastric cancer and examination of its tumorigenicity

研究代表者

伏田 幸夫 (Fushida, Sachio)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：10301194

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)：胃癌腹膜播種は臓器の線維化が特徴であり、抗がん剤や免疫担当細胞の腫瘍へのデリバリーが阻害され、治療抵抗性である。一方、IL-17Aは皮膚筋炎において線維化を誘導することが知られているため、胃癌腹膜播種における線維化にIL-17Aが関与しているかどうかを検討した。70例の腹膜播種巣において、ほとんどのIL-17A産生細胞は肥満細胞であり、その浸潤細胞数と線維化の程度は相関していた。正常腹膜中皮細胞にIL-17Aを添加すると、E-cadherinの発現は減弱、 α -SMAの発現は増強し、浸潤能は亢進した。この現象はIL-17AがSTAT3のリン酸化を促進したためであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌腹膜播種の1年生存率は10-40%と極めて不良である。その原因として、腫瘍内には多くの線維成分を含み、癌細胞以外の腫瘍関連線維芽細胞(CAF)や腫瘍関連マクロファージの存在によって様々なサイトカインが産生され、腫瘍の増殖や進展に関与している。線維化はサイトカインの1つであるTGF-betaがCAFを刺激してコラーゲンファイバーを産生させることが原因と考えられてきたが、今回、腫瘍内に浸潤した肥満細胞から産生されるIL-17AがTGF-betaシグナルとは別のSTAT3シグナルを介して線維化を生じることを明らかにした。腹膜播種の治療標的分子を新たに発見したことで、治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal metastasis of gastric cancer induce organ fibrosis, which is reason for poor delivery of chemotherapeutic drug and immunocompetent cells. On the other hand, IL-17A is thought to be involved fibrosis in scleroderma. This study identified which cells produce IL-17A and clarified how IL-17A works in cancer microenvironment. Seventy gastric cancer tissues were immuno-stained using anti-IL-17A Ab and anti-mast cell tryptase (MCT) Ab. The degree of tissue fibrosis was also assessed using Azan staining. As in vitro analysis, the effect of IL-17A on human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) was examined. Most of IL-17A positive cells also expressed MCT. There was a significant correlation between double positive cell counts and degree of fibrosis. IL-17A decreased E-cadherin expression, increased α -SMA expression and invasion ability in HPMCs through enhancement of STAT3 phosphorylation. IL-17A contributes EMT in gastric cancer progression and tumor fibrosis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：IL-17A 肥満細胞 胃癌腹膜播種 STAT3シグナル 上皮間葉転換

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

胃癌腹膜播種の治療成績は1年生存率40%と極めて不良であるため、抗癌剤に対する治療抵抗性を克服するとともに腹膜播種の確立や増生にかかわる分子機構を解明し、それらを標的とした新たな治療法の確立が急務である。腹膜播種の重要な病態として腫瘍内の癌細胞は周囲に線維芽細胞やコラーゲンファイバーを誘導し、胆管や腸管および尿管の壁肥厚と内腔狭窄による閉塞性黄疸や腸閉塞、水腎症による随伴症状が原因で死亡することが多いが、線維化にいたるメカニズムは十分解明されずにいた。そこで我々は、胃癌腹膜播種における線維化には局所の腹膜中皮細胞や遊走してきた骨髄由来細胞 (fibrocytes)が微小環境下で癌細胞とのクロストークによって癌関連線維芽細胞 (CAF)に形質転換し、癌間質の線維化に関与することをマウス皮下播種モデルにおける線維化を伴う腫瘍作成によって証明した (Int J Oncol 2012, Gastric Cancer 2015)。また、腫瘍 (播種巣) 内で産生されるアンギオテンシンIIがアンギオテンシンI型受容体を介して増殖・進展に関与していることを証明し、高血圧治療薬の1種であるARB (アンギオテンシンI型受容体ブロッカー) による腹膜播種治療の可能性について報告し (Int J Oncol 2009)、癌細胞内で産生される TGF- β はアンギオテンシンIIによって制御され、腫瘍の線維化を誘導していることも証明した (Cancer Letters 2014)。さらに、マウスにおけるヒト胃癌線維化モデルをもちいて、免疫賦活剤である protein-bound polysaccharide K (PSK)や抗癌剤であるパクリタキセルが低濃度で TGF- β シグナルを抑制することで腫瘍の線維化を制御することを証明した (Int J Oncol 2012, Oncology Rep 2014)。

癌の微小環境において上記以外にも免疫系の細胞、とくに腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage : TAM) の関与も重要と考えられるが、腫瘍の発生・進展に促進的なのか、抑制的なのかは、報告が相反し一定の見解は得られていなかった。マクロファージは通常型 (M1)と免疫抑制型 (M2)に分類されるが、腹膜播種症例の腹腔内には大量のマクロファージが存在し、そのマクロファージのほとんどが M2 型であり、共存する癌細胞の EGFR, AKT, ERK1/2, STAT3 のリン酸化を誘導し腫瘍の増殖進展に関与することを明らかにした (Gastric Cancer 2017)。

一方、IL-17はナイーブ CD4⁺T リンパ球から分化した Th17 細胞から産生され、マクロファージや線維芽細胞に作用して局所で炎症や細胞外マトリックスのリモデリングを誘導することが知られているが、癌微小環境下における IL-17 の機能は明らかではない。さらに、IL-17 産生細胞も Th17 細胞だけでなく、NK 細胞や顆粒球、肥満細胞などが考えられており、明確ではない。

2. 研究の目的

今回、胃癌原発巣や腹膜播種巣に浸潤する肥満細胞の浸潤程度や組織内における IL-17 産生細胞と臨床病理学的悪性度が相関し、癌微小環境下において胃癌細胞株との相互作用により腫瘍の増殖や細胞外マトリックスのリモデリングによって腫瘍の線維化が誘導されるという仮説を証明することを本研究の目的とする。また、IL-17 産生細胞による癌微小環境の変化について、in vitro でヒト正常腹膜中皮細胞 (Human peritoneal mesothelial cells: HPMCs)に IL-17 を反応させ検討する。さらに、我々が作成してきたマウス皮下移植による線維化腫瘍をもちいて、IL-17 投与群と非投与群における違いを検討する。

3. 研究の方法

① 臨床検体を用いた検討

胃癌腹膜播種 70 症例を腹膜播種による腸管狭窄症状を伴う A 群 (29 例) と狭窄症状を伴わない B 群 (41 例) の 2 群に分けて検討した。胃癌原発巣および播種巣の IL-17A 産生細胞と肥満細胞を抗 IL-17 抗体および抗 Mast Cell Tryptase (MCT) 抗体およびで二重染色することで IL-17 産生細胞の中の肥満細胞の占める割合を検討する。さらに、Azan 染色により腫瘍部分の線維化の面積を計算し、IL-17A 産生細胞数との関係を検討した。

② IL-17A が HPMCs に及ぼす影響について

早期胃癌症例の胃切除の際に採取した大網から HPMCs を分離培養し、IL-17A を in vitro で添加して FAP, α -SMA, E-cadherin の発現変化を蛍光免疫染色で検討する。また、Vimentin, N-cadherin といった EMT マーカーの変化についても Western blot にて検討した。さらに、IL-17A 添加による HPMC の増殖、遊走、浸潤能の変化についても検討した。

③ マウス皮下線維化腫瘍に対する tranilast の及ぼす影響について

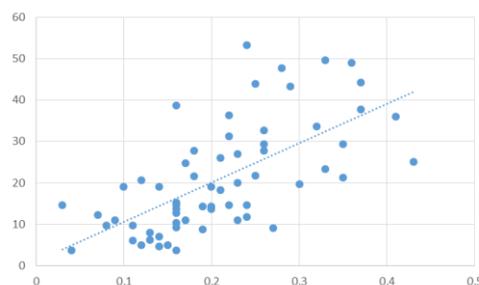
ヒト胃癌細胞 MKN45 を HPMCs と共培養した後、ヌードマウス皮下に 5×10^6 個移植し、tranilast 投与群には移植後 1 週間から 4 週目まで毎日 200mg/kg を経口投与した。移植 4 週間後に犠牲死させ腫瘍を採取して検討した。

④ マウス線維化腹膜播種の作成

皮下線維化腫瘍の作成は容易であるが、腹腔内に MKN45 および HPMCs を共培養したものを単純に投与しても線維化腹膜播種は作成できない。実臨床においても腹腔内操作により腹膜中皮が容易にはく離し、基底膜が露出した部位に癌細胞が生着すると考えられている。したがって、ヌードマウスにおいても、腹部を切開し腸管、腸間膜、腹壁を綿棒で擦過した後閉腹し、MKN45 および HPMCs を腹腔内投与した。

4. 研究成果

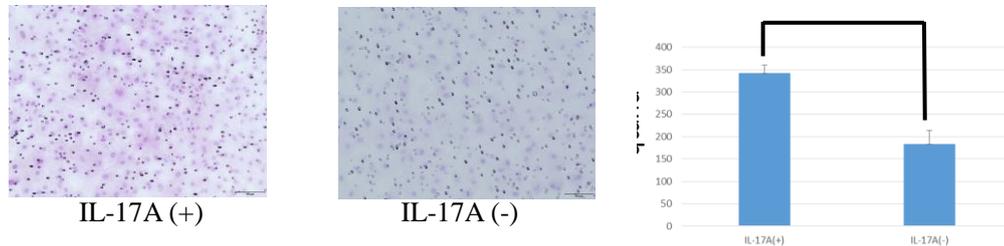
- ① 胃癌における IL-17A 陽性細胞の約 70% は MCT 陽性細胞 (肥満細胞) であった。Azan 染色による線維化面積を検討したところ、腸管狭窄群 (A 群) において有為に線維化の程度が強かった ($p < 0.001$)。さらに、IL-17A と MCT がともに陽性であった細胞数と腫瘍に占める線維化の割合は正の相関 ($r = 0.42, p < 0.01$) を示した。



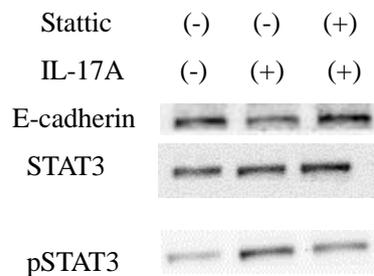
腫瘍内線維化面積割合

- ② HPMCs に IL-17A を添加し 48 時間後に蛍光免疫染色にて検討したところ、FAP

および α -SMA の発現を認め、E-cadherin の発現は認めなかった。Western blot においても、Vimentin の発現上昇も加え、同様の結果となった。形態学的にも、敷石状の HPMCs は IL-17A 投与によって 48 時間後には線維芽細胞様の紡錘型を呈した。Migration assay では IL-17A 投与後 12 時間より遊走能に有為差を認め ($p < 0.01$)、invasion assay においても IL-17A 投与群において非投与群に比べ有為に浸潤能が更新した ($p < 0.05$)。



以上の HPMCs の EMT 様変化を誘導したメカニズムを明らかにするため、HPMCs に IL-17A 添加した際の Smad2/3 および STAT3 のリン酸化誘導の有無を Western blot にて検討すると、STAT3 のリン酸化のみが認められた。また、この変化は STAT3 阻害薬 Stattic によって抑制された。



- ③ マウス皮下線維化腫瘍モデルにおいて、tranilast 投与群は非投与群に比較して、有為に腫瘍体積が小さかった ($p < 0.05$)。腫瘍の線維化の程度を azan 染色をもちいて検討すると、tranilast 投与群で有為に線維化面積が小さかった ($p < 0.05$) (論文 2 参照)。
- ④ 腹膜を擦過したモデルでは、azan 染色で明確な線維化を認め、腫瘍の一部は腸管壁に浸潤しており、実臨床における胃癌腹膜播種の組織像と酷似していた (論文 1 参照)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- Saito H, **Fushida S**, Harada S, Miyashita T, Oyama K, Yamaguchi T, Tsukada T, Kinoshita J, Tajima H, Ninomiya I, Ohta T: Importance of human peritoneal mesothelial cells in the progression, fibrosis, and control of gastric cancer: inhibition of growth and fibrosis by tranilast. *Gastric Cancer*, 21 (1): 55-67, 2018 **査読あり**
- Okazaki M, **Fushida S**, Harada S, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, Miyashita T, Ninomiya I, Ohta T: Establishing a xenograft mouse model of peritoneal dissemination of gastric cancer with organ invasion and fibrosis. *BMC Cancer*, 17 (1): 1186, 2017 **査読あり**

[学会発表] (計 2 件)

1. 第91回日本胃癌学会総会(2019.2)

Gunjigake K, **Fushida S**, et al. The role of IL-17A in gastric cancer with peritoneal dissemination.

2. 第74回日本消化器外科学会総会(2018.7)

郡司掛勝也、**伏田幸夫**、他。胃癌腹膜播種における線維化は肥満細胞由来の IL-17A が関与している

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：原田 真市

ローマ字氏名：Harada Shinichi

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：准教授

研究者番号(8桁)：90272955

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：郡司掛 勝也

ローマ字氏名：Gunjigake Katsuya

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。