

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16324

研究課題名(和文) 脂肪細胞が関与する胃癌腹膜播種の分子機構の解明と新たな診断薬の開発応用

研究課題名(英文) Molecular mechanism of peritoneal metastasis via adipocytes in gastric cancer
Peritoneal metastasis via adipocytes in gastric cancer

研究代表者

庄田 勝俊 (SHODA, Katsutoshi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：70783421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腹腔内に豊富に存在する脂肪細胞と胃癌細胞や腹膜中皮細胞との、細胞外小胞(Extracellular Vesicles; EV)を介した細胞間情報伝達に着眼した。脂肪細胞と胃癌細胞との共培養で胃癌細胞株の遊走能が有意に上昇した。共培養前後の脂肪細胞の発現変化を網羅的に検討し、IL6やCXCL1などの炎症に関与する分子群の上昇を認めた。共培養した脂肪細胞から放出されるEV内にこれらの分子が内包されていることを確認した。大網における上記分子の発現は腹膜播種や細胞診陽性症例で有意に高値であった。脂肪細胞と胃癌細胞の間には細胞間情報が存在し、胃癌腹膜播種に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹腔内に豊富に存在する脂肪細胞と胃癌細胞や腹膜中皮細胞との、EVを介した細胞間情報伝達に着眼し、その分子機序解明により脂肪細胞を標的とした新規治療の可能性を示した。腹膜播種形成予測に有用な新規バイオマーカーとなりうるばかりでなく、難治性胃癌の個別化医療推進に資する脂肪細胞を標的とした新規治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles (EV) could become the trigger for peritoneal metastasis. In the present study, we aim to elucidate the molecular mechanism of EV-mediated intercellular communication between adipocytes abundantly present in the peritoneal cavity and gastric cancer cells and peritoneal mesothelial cells. Comprehensive analysis of changes in the expression of adipocytes co-cultured with gastric cancer cells revealed increased expression of molecules involved in inflammation, including CXCL1 and IL6. In addition, it was confirmed that CXCL1 and IL6 are contained in large amounts in EV extracted from adipocyte medium co-cultured with gastric cancer cells. Furthermore, CXCL1 expression in omentum was found to be significantly correlated with tumor depth ($p = 0.001$) and peritoneal metastasis ($p = 0.009$). We demonstrated the possibility that adipocytes could be involved in acquiring the metastatic potential of cancer cells by intercellular communication with gastric cancer cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：脂肪細胞 胃癌

1. 研究開始当初の背景

胃癌は、我が国の癌死亡原因の上位を占める重要な癌腫である。また、腹膜播種性転移は、最も多い胃癌の転移形式で予後不良であるが、発症メカニズムについては未だ不明な点が多い。初発時腹水中癌細胞(術中洗浄細胞診)陰性にも関わらず腹膜播種再発をきたす症例も数多く存在する。治療に関しては、従来の経口・経静脈抗癌剤に加えて、経静脈・腹腔内併用療法による多施設共同の無作為化第 III 相臨床試験 (PHOENIX-GC 試験) など新規治療法の開発も進められ、全生存期間の約 2.5 ヶ月の延長と、ある一定の成果は認めているものの、標的分子を含めた更なる治療法開発が喫緊の課題である。細胞外小胞 (Extracellular Vesicles; EV) は血液や尿、腹水など様々な体液に存在し、mRNA や microRNA などの種々の核酸を内包して体内を循環している。核酸は選択的に EV に取り込まれ、細胞間情報伝達を担っている。我々は以前から EV、主に exosome を介した腹膜播種形成の分子機構に着眼し、報告してきた (Arita et al. *Oncotarget*. 2016)。

また近年、脂肪組織は中性脂肪の貯蔵だけでなく、乳癌や前立腺癌、口腔癌などでは、特定の受容体を介しての癌の浸潤能獲得や転移エネルギー源として癌の悪性化に関与する役割が明らかにされ (Gloria et al. *Nature*. 2016)、治療標的としての可能性も期待されている。前立腺癌や大腸癌などにおける肥満と癌の相互作用に関する報告や (Park et al. *Nat Rev Endocrinol*. 2014)、脂肪細胞が癌進展に影響を与える可能性についても、メラノーマ (Lazar et al. *Cancer Res*. 2016)、卵巣癌 (Miranda et al. *Cancer Cell*. 2016)、乳癌 (Bochet et al. *Cancer Res*. 2016) などを中心に、報告されている。一方、胃癌に関しては、脂肪細胞が癌に悪影響を及ぼしているかどうかは明らかになっていない。栄養面で低下することで免疫能が低下する為、術前体重が低下し、いわゆる栄養不良による“るい瘦”を来した患者では明らかに予後不良であるという結果が数多く報告されている (Wang et al. *Ann Surg Oncol*. 2016)。しかし、ある局面においては胃癌においても脂質が癌に悪影響を及ぼしているのではないかと考え、胃癌細胞との相互作用による脂肪細胞の発現変化と検討するとともに、EV による細胞間コミュニケーションに着目し、癌の進展に関与する脂肪細胞の意義について検討した。

2. 研究の目的

このような学術的背景を基に、我々は間葉系幹細胞から脂肪細胞へ分化誘導を行い、オイルレッド染色で分化が確認された脂肪細胞と胃癌細胞の共培養で胃癌細胞の遊走能上昇が劇的に変化することを確認した。

これらの成果を踏まえ、本研究課題では『腹腔内に豊富に存在する脂肪細胞が胃癌細胞との細胞間情報伝達により癌細胞の転移能の獲得(癌細胞からの Education 及び癌細胞への Feedback 機構)や中皮細胞の発現変化(腹膜播種の Conditioning)に関与している』という仮説を立てた。

脂肪細胞と胃癌細胞や中皮細胞との細胞間伝達分子の同定を行い、その調節に関わる分子機構の解明と抑制効果の検証により、新規腹膜播種治療戦略の構築を目指す。本研究は、胃癌患者の予後を規定する腹膜播種転移の新たなメカニズムの解明に繋がる可能性を有し、脂肪細胞内及び腹水中 EV に内包された分子プロファイルは腹膜播種予測に有用なバイオマーカーとなり得る。また、腹膜播種ハイリスク群を同定することで、胃癌診療における新たな、そして最適な治療選択を提供し得る。一方で、脂肪細胞を標的とした新たな Drug Delivery System の開発にも繋がる可能性をも有し、「がん研究 10 年戦略」で推進されているトランスレーショナルリサーチのモデルとなり、「健康・医療戦略」及び「医療分野研究開発推進計画」において推進が求められている、個別化医療の実現に寄与する画期的な難治性胃癌の新規診断・治療法を提供できる蓋然性が高い。

3. 研究の方法

a) 間葉系幹細胞を培養し、脂肪細胞専用培地で培養することで脂肪細胞へ分化させる。種々の胃癌細胞と分化させた脂肪細胞との共培養を行い、胃癌細胞の遊走能変化を確認するとともに、共培養前後の脂肪細胞の発現変化を検討する (microarray)。

b) 胃癌細胞との共培養前後の脂肪細胞から分泌される EV を超遠心法 (100,000g, 70 分間×2) により分離し、表面マーカーである CD9, CD63 を用いて Western blotting assay で確認を行う。脂肪細胞で発現変化のあった分子に関して、上記 EV 中に内包されているかどうかを確認する。

c) 胃癌細胞との共培養後の脂肪細胞 EV を中皮細胞へ添加し、蛍光染色を用いて EV が取り込まれているかどうかを確認する。

d) 手術時に腹膜播種転移を認めた (P1) 胃癌患者 10 例と播種を認めなかった (P0) 10 例 (術後 3 年無再発であった症例を対象) を比較検討し、上記候補分子の発現を比較検討する。

4. 研究成果

a) 間葉系幹細胞 hMSC-AT-c (human mesenchymal stem cells, from PromoCell (Heidelberg,

Germany)) から脂肪細胞に分化させ、oil red 染色を用いてその分化を確認した。また、胃癌細胞株と脂肪細胞との共培養で胃癌細胞株の遊走能が有意に上昇した ($p < 0.01$) (右図)。更に Western blotting assay で EMT 関連分子 (SNAIL) の有意に上昇していることを確認した。

胃癌細胞の影響による脂肪細胞の発現変化を検討するために、Microarray を用いて、胃癌細胞との共培養前後の脂肪細胞の発現変化を検討した。

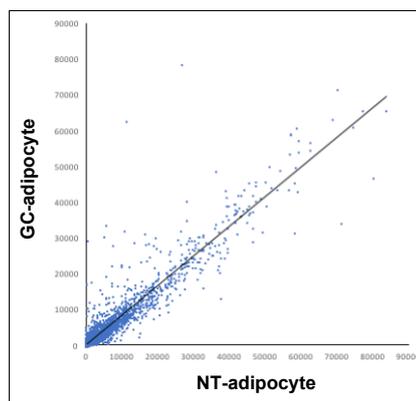
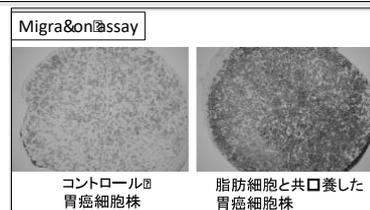
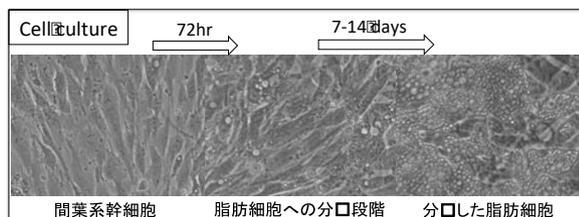
結果、C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1) や Interleukin 6 (IL6) など炎症に関与する分子群の有意な上昇を認めた。Real-time PCR でもこれら分子群の発現上昇の validation を行った ($p < 0.01$)。

b) 胃癌細胞との共培養前後の脂肪細胞から分泌される EV を抽出し、CD9, CD63 の発現を Western blotting assay で確認した。脂肪細胞から分泌される EV における CXCL1 や IL6 などの発現を Real-time PCR で確認し、上記候補分子が EV に内包されていることを確認した。

c) 胃癌細胞との共培養前後の脂肪細胞から分泌される EV に対し、PKH による蛍光ラベリングを行った後、中皮細胞 (human normal mesothelial cell line, MeT-5A (CRL-9444)) に添加し、細胞内への EV の取りこみを確認した。

d) 胃切除時に大網のサンプリングを行い、上記候補分子の大網での発現と臨床病理因子との相関を検討した。手術時 P1 症例において大網での CXCL1 の有意な発現上昇を認め ($p = 0.009$)、P0 症例においても胃癌の深達度と CXCL1 の発現の有意な相関を認めた。

本研究結果から、胃癌と脂肪細胞との間で EV を用いた細胞間情報伝達が行われ、脂肪細胞が胃癌腹膜播種進展に関与しうる可能性が示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 庄田勝俊
2. 発表標題 Molecular mechanism of peritoneal metastasis via adipocytes in gastric cancer
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 庄田勝俊
2. 発表標題 Molecular mechanism of peritoneal metastasis via adipocytes in gastric cancer
3. 学会等名 国際胃癌学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------