

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16352

研究課題名(和文) 術中腹腔内散布癌細胞の癌幹細胞性と腹膜再発に関する研究

研究課題名(英文) Cancer stemness and postoperative peritoneal recurrence in intraperitoneally spilled-cancer cells during surgery

研究代表者

児玉 泰一 (Kodama, Hirokazu)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：20581929

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)：胃癌手術中に腹腔内散布された癌細胞、特にCD44陽性癌幹細胞様細胞に焦点を当て、術中腹腔内散布癌細胞が腹膜転移を形成する機序の一端を解明するため、1) CD44陽性がん細胞の幹細胞性 2) CD44陽性癌幹細胞様細胞の造腫瘍能 3) 手術炎症環境下における腹腔内胃癌細胞の造腫瘍能を調べた。CD44陽性胃癌細胞は、多能性やCD44陰性胃癌細胞への分化能を有し、造腫瘍能もあるがん幹細胞性をもつ細胞であった。一方、CD44陰性細胞は、腹腔内環境においてCD44陽性細胞へと変化する可塑性を持っていた。特に腹膜への炎症は、CD44陰性細胞をCD44陽性細胞へと変化させ腹膜転移能を付与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、術中腹腔内散布されるCD44陽性胃癌細胞は癌幹細胞様細胞の性質を持ち、術後腹膜再発形成する重要な癌細胞であるため、術後腹膜再発を防ぐための治療ターゲットをCD44陽性腹腔内癌細胞だと考え、再発予防戦略が構築されていくであろう。

また、手術時炎症がCD44陰性の分化がん細胞をCD44陽性がん幹細胞様細胞へと変化させ、腹膜再発を促進させる事がわかり、手術時炎症のコントロールも腹膜再発予防の重要な戦略要素となるであろう。

研究成果の概要(英文)：To elucidate part of the mechanism by which intraperitoneal cancer cells form peritoneal metastases, especially focusing on cancer stem-like cells that were spilled intraperitoneally during gastric cancer surgery, we investigated the followings, 1) stemness of CD44-positive cancer cells, 2) tumorigenicity of CD44-positive cancer stem-like cells, and 3) tumorigenicity of intraperitoneal gastric cancer cells in a surgical inflammatory environment. The CD44-positive gastric cancer cells possessed cancer stem cell properties that showed pluripotency, differentiation ability into CD44-negative gastric cancer cells, and tumorigenicity. On the other hand, CD44-negative cells had plasticity that changed to CD44-positive cells in the peritoneal environment. In particular, surgical peritoneal inflammation was thought to change CD44-negative cells into CD44-positive cells and impart peritoneally metastatic potential.

研究分野：消化器外科

キーワード：術後がん再発 腹膜転移 癌幹細胞 手術炎症 CD44

1. 研究開始当初の背景

消化器癌において、腹膜転移は高頻度に発生し、極めて難治性で予後不良である。進行胃癌では、組織学的に癌遺残の無い治癒手術 (R0) ができて、約半数に腹膜再発をきたす。この理由は明らかではなかったが、我々は、胃癌治癒手術 (R0) 後の腹腔内洗浄液の培養により、手術前には存在しなかった分裂能や造腫瘍能を有する癌細胞を高頻度に検出し、腹膜再発の大きな原因となっていることを示した (Takebayashi K, et al. *Ann Surg Oncol*, 2014)。また、胃癌切除後で消化管再建前の残胃内腔に、viable な胃癌細胞の集塊があり、消化管再建術の際にこれらの癌細胞が腹腔内へこぼれ落ちて腹膜再発する可能性を報告した (Murata S, Kodama H, et al. *Ann Surg Oncol*, 2016)。さらに、胃癌手術直後の腹腔内洗浄液の細胞培養で、癌細胞が検出された (腹腔内散布癌細胞陽性) 症例のみが高率に術後再発し、培養されなかった陰性症例では、腹膜再発をはじめ肝再発やリンパ節再発など、全ての再発を認めなかった (Murata S, Kodama H, et al. *ASCO*, 2017)。

従って、術中の腹腔内散布癌細胞は胃癌再発に極めて重要な意味を持っていることがわかる。「この術中散布癌細胞はどのような性質を持つ癌細胞なのだろうか?」

通常の分化した癌細胞は腫瘍形成能がなく、造腫瘍能をもつ癌細胞は、癌幹細胞様の性質がある未分化な癌細胞だと考えられている。従って、腹腔内散布癌細胞中には、癌幹細胞様の癌細胞が存在すると考えられる。癌幹細胞の由来は、幹細胞の癌化の他、分化した癌細胞の脱分化による癌幹細胞様化の考えもある。一方、癌の上皮間葉転換 (EMT) は癌転移と密接に関係し、炎症性サイトカイン TGF- β は EMT 誘導に強く関与する。「手術局所という強い炎症環境において、分化した散布癌細胞は脱分化や EMT を受け癌幹細胞様に変化し腫瘍形成能を獲得するのではないだろうか?」

癌幹細胞 (Cancer stem cells (CSCs)) は腫瘍組織中に存在し、正常の幹細胞と同じように自己複製能を有した細胞群であり、癌細胞の供給源として働き、癌の転移など腫瘍の進展に深くかかわっているとされている。申請者は胃癌治癒切除後標本を用いて、胃癌の癌幹細胞様細胞マーカーとされる CD44 の 3 種類の isoform (CD44s, CD44v6, CD44v9) を免疫組織染色し、腫瘍の生物学的悪性度を反映するとされる腫瘍浸潤最深部 (ITF) での CD44 陽性癌幹細胞様細胞の存在を評価した。その結果、CD44 の 3 種類の isoform 発現胃癌細胞の存在は、それぞれ有意に予後が不良であった。また、ITF での CD44 陽性癌幹細胞様細胞の存在は腹膜播種再発と有意に関連していることが明らかとなった (Kodama H, *Br J Cancer*, 2017)。

2. 研究の目的

術中に腹腔内散布された癌細胞、特に CD44 陽性の癌幹細胞様細胞に焦点を当て、術中腹腔内散布癌細胞が腹膜転移を形成するメカニズムの一端を解明することを目的として本研究を行った。この目的を達するために、1) CD44 陽性がん細胞の幹細胞性 2) CD44 陽性癌幹細胞様細胞の造腫瘍能 3) 手術炎症環境下における腹腔内胃癌細胞の造腫瘍能 を調べた。

3. 研究の方法

1) CD44 陽性がん細胞の幹細胞性

- (ア) 胃癌細胞株は MKN-45 (低分化型腺癌) および KE-97 (腹膜播種性転移由来腺癌) を用いた。
- (イ) それぞれの胃癌細胞株を培養し、ヒト抗 CD44 抗体で染色後 FACS にて、CD44 陽性癌細胞 (CD44(+)) と陰性癌細胞 (CD44(-)) の割合を調べた。次に FACS にて CD44(+) と CD44(-) を分離した。それぞれの分離細胞を 48 時間培養後、CD44(+) と CD44(-) の割合の変化を調べた。
- (ウ) CD44(+) と CD44(-) 細胞を多能性マーカー (Sox2, Oct3/4) の抗体を用いて細胞内染色し、CD44(+) 癌細胞の幹細胞性を調べた。

2) CD44 陽性がん細胞の造腫瘍能

- (ア) MKN-45 および KE-97 胃癌細胞株を CD44(+) と CD44(-) に分離後、それぞれの細胞数を段階的に調整し、NOD/SCID マウスへ腹腔内注 (ip) した。6 週間後に犠牲死させ、臓側腹膜 (大網や腸間膜) における腹膜播種性転移の頻度を比較した。
- (イ) CD44(+) ip または CD44(-) ip 後に形成した腹膜転移組織を、抗 CD44 抗体および抗 ALDH1 抗体を用いて免疫組織染色し、CD44 陽性細胞や CD44 陰性細胞、および、別の癌幹細胞マーカーと考えられている ALDH1 陽性細胞の局在を比較した。

3) 手術炎症環境下における腹腔内胃癌細胞の造腫瘍能

- (ア) 免疫不全マウスは、自然免疫担当細胞があり炎症が惹起可能と考えられる T 細胞欠損 Nude マウスを用いた。
- (イ) Nude マウスに手術時炎症を惹起させるため、綿棒にて壁側腹膜を数回擦過した (Swab 群)。臓側腹膜への物理的損傷を防ぐため、臓側腹膜への擦過は行わなかった。
- (ウ) MKN-45 胃癌細胞株を、Swab 群マウスと Non Swab 群マウスへ、ip した。6 週間後に

犠牲死させ、臓側腹膜(大網や腸間膜)における腹膜播種性転移の頻度を比較した。
(工) KE-97 胃癌細胞株を CD44(+)と CD44(-)に分離後、Swab 群マウスと Non Swab 群マウスへ、ip した。

4. 研究成果

1) CD44 陽性がん細胞の幹細胞性

- MKN-45 胃癌細胞中、CD44 陽性は 95%、CD44 陰性は 5%だった。
- KE97 胃癌細胞中、CD44 陽性は 80%、CD44 陰性は 20%だった。
- MKN-45 を CD44(+)と CD44(-)に分離し、48 時間それぞれを培養すると、CD44(+)細胞は培養後に CD44(+)が約 95%、CD44(-)が約 5%と、分離前の比率となった。CD44(-)細胞は培養後に CD44(+)が約 95%、CD44(-)が約 5%と、培養環境により大部分が CD44(-)から CD44(+)へと変化した。
- MKN-45 の CD44(+)細胞には、CD44(-)細胞と比べ、SOX2 発現が増加していたが、OCT3/4 発現には差がなかった。

2) CD44 陽性がん細胞の造腫瘍能

- MKN-45 の CD44(+)細胞を NOD/Scid マウスへ ip すると、CD44(-)細胞 ip に比し、有意に少数で大網や腸間膜などの臓側腹膜に腹膜播種性転移を生じた。
- KE97 の CD44(+)細胞 ip も同様に、CD44(-)細胞 ip に比し、有意に少数で臓側腹膜に腹膜播種性転移を生じた。
- MKN-45 および KE97 の CD44(+)細胞 ip から生じた腹膜転移腫瘍の免疫組織染色では、腫瘍辺縁に CD44(+)細胞および同部位に ALDH1(+)細胞が局在したが、腫瘍中心部は CD44 陰性かつ ALDH1 陰性細胞で占められていた。
- MKN-45 および KE97 の CD44(-)細胞 ip から生じた腹膜転移腫瘍の免疫組織染色では、腫瘍辺縁に CD44(+)細胞と ALDH1(+)細胞が認められた。腹腔内に ip された CD44(-)細胞は、腹膜転移腫瘍形成過程で CD44(+)細胞に変化していた。即ち、腹腔内環境により CD44(-)がん細胞は CD44(+)がん細胞へと変化する可塑性を示すことがわかった。

3) 手術炎症環境下における腹腔内胃癌細胞の造腫瘍能

- MKN45 がん細胞の ip を行うと、Nude マウスへの壁側腹膜擦過(手術操作)施行群(Swab 群)では非施行群(Non Swab 群)に比し、有意に少数の癌細胞散布により腹膜播種性転移が生じた。
- KE97 がん細胞中の CD44(+)細胞を ip すると、Swab 群、Non Swab 群ともに同程度に高率に臓側腹膜転移を生じた。一方、CD44(-)細胞を ip すると、Swab 群では Non Swab 群に比し、約 2 倍に高率に臓側腹膜転移を発症した。

以上の結果から、

CD44 陽性胃癌細胞は、多能性や CD44 陰性胃癌細胞への分化能を有し、腹膜転移を生じる造腫瘍能も高い、がん幹細胞様の性質をもつがん細胞である事がわかった。

一方、CD44 陰性細胞は、腹腔内環境において腹膜転移形成する過程で、CD44 陽性細胞へと変化する可塑性を持っていることがわかった。特に腹膜への炎症が加わると、CD44 陰性細胞は CD44 陽性細胞へと変化し高い腹膜転移能を持つに至ったと考えられた。

本研究結果から、術中腹腔内散布される CD44 陽性胃癌細胞は癌幹細胞様細胞の性質を持ち、術後腹膜再発形成する重要な癌細胞であるため、術後腹膜再発を防ぐための治療ターゲットを CD44 陽性腹腔内癌細胞だと考え、再発予防戦略を構築すべきであろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takebayashi K, Murata S, Kodama H, Kaida S, Yamaguchi T, Ishikawa K, Shimoji M, Miyake T, Ueki T, Kojima M, Iida H, Maehira H, Shimizu T, Tani M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Long-term prognosis of patients with cancer-related genes detected in postoperative peritoneal washings obtained during curative gastrectomy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejso.2021.05.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Satoshi Murata, Katsushi Takebayashi, Tsuyoshi Yamaguchi, Sachiko Kaida, Ken Ishikawa, Hirokazu Kodama, Miyuki Shimoji, Andreas Michael Sihombing, Masatsugu Kojima, Toru Miyake, Hiroya Iida, Tomoyuki Ueki, Mina Kitamura, Aya Tokuda, Eiji Mekata, Masaji Tani
2. 発表標題 Therapeutic strategy based on the mechanism of peritoneal relapse after surgery for gastric cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Andreas Michael Sihombing, Satoshi Murata, Miyuki Shimoji, Katsushi Takebayashi, Hirokazu Kodama, Masatsugu Kojima, Tomoyuki Ueki, Naomi Kitamura, Mina Kitamura, Aya Tokuda, Toru Miyake, Eiji Mekata, Masaji Tani
2. 発表標題 CD44-enriched cancer stem-like cells as a source of peritoneal metastasis from gastric cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyuki Shimoji, Satoshi Murata, Andreas Michael Sihombing, Katsushi Takebayashi, Hirokazu Kodama, Masatsugu Kojima, Tomoyuki Ueki, Naomi Kitamura, Mina Kitamura, Aya Tokuda, Toru Miyake, Eiji Mekata, Masaji Tani.
2. 発表標題 Effect of hyperthermia on the cancer stem-like cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masatsugu Kojima, Satoshi Murata, Miyuki Shimoji, Andreas Michael Sihombing, Naomi Kitamura, Tomoyuki Ueki, Mina Kitamura, Katsushi Takebayashi, Hirokazu Kodama, Aya Tokuda, Toru Miyake, Eiji Mekata, Masaji Tani
2. 発表標題 Tumor Ag-specific CTL generation from tumor-associated lymphocytes in malignant ascites of peritoneal metastases
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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