

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16362

研究課題名(和文) 胃癌腹膜播種における癌微小環境の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel treatment strategy for peritoneal metastasis of gastric cancer targeting tumor microenvironment

研究代表者

菊地 覚次(Kikuchi, Satoru)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40736584

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)：癌細胞周囲のがん微小環境においては、癌関連線維芽細胞(CAF)は腹膜播種形成や腫瘍の増大に大きく関わっており、またCAFにおいては、癌抑制遺伝子であるp53が機能異常を起していることがその一因となっている可能性が考えられた。さらに、p53を搭載した腫瘍溶解ウイルスであるOBP-702は、癌細胞のみならず、CAFにも影響を与えて、強い抗腫瘍効果を発揮することがわかった。そのため、腹膜播種に対するOBP-702を用いた腹腔内治療は、治療困難な腹膜播種に対して有効な新規治療になる可能性があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、治療困難な胃癌腹膜播種の病態を解明し、癌細胞周囲の癌関連線維芽細胞が腫瘍の生着や増大に大きく関わっていることがわかった。さらに癌関連線維芽細胞においては、癌抑制遺伝子であるp53が機能異常を起していることにより、癌細胞を助ける働きをしている可能性が考えられた。

p53を搭載した腫瘍溶解ウイルスであるOBP-702は、癌細胞のみならず癌関連線維芽細胞にも作用して、効果を発揮し、強力な腹膜播種抑制効果があることがわかった。このことにより、OBP-702を用いた腹腔内治療は、胃癌腹膜播種に対する新しい有用な治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the tumor microenvironment of peritoneal metastasis, cancer-associated fibroblasts (CAFs) contribute to establish the peritoneal metastasis and tumor progression. Transcriptional alteration of p53 in CAFs contributes to the tumor-supportive features. Furthermore, intraperitoneal administration of OBP-702, replicative oncolytic adenovirus-mediated p53 showed significant anti-tumor effect for peritoneal metastasis by modulating CAFs in addition to tumor lysis via exogenous p53 overexpression.

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 腹膜播種 p53 腫瘍溶解ウイルス 癌関連線維芽細胞 がん微小環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、胃癌に対する新規化学療法や分子標的薬の登場により、切除不能な進行胃癌の治療成績は向上している。しかし、スキルス胃癌で代表される腹膜播種転移は依然予後不良であり、いまだ胃癌の腹膜播種に対する有効な治療法は確立されていない。癌微小環境において、癌の浸潤・転移・治療抵抗性に腫瘍周囲間質中の癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast: CAF)が大きく関わっていることがわかっており、腹膜播種や治療抵抗性においても癌とCAFの相互作用が影響していると考えられ、その役割の解明と制御が新たな治療ターゲットになると考えられる(図1)。

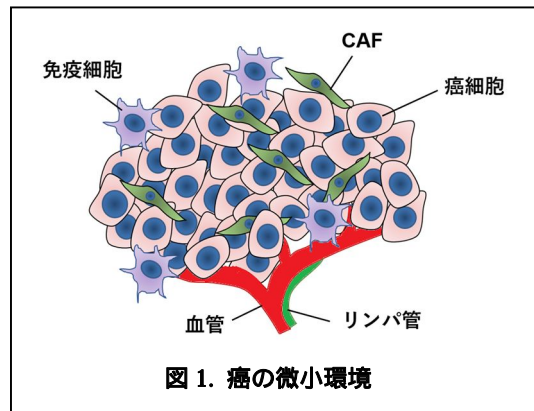


図1. 癌の微小環境

申請者らの研究グループは、hTERT プロモーターによって増殖が制御された腫瘍選択的増殖型アデノウイルス(OBP-301, Telomelysin)を開発し、腫瘍特異的に様々な癌腫に対する抗腫瘍効果を示すことを報告してきた。

また、p53 は、細胞周期の停止やアポトーシスを誘導する癌抑制遺伝子として知られており、胃癌を含めた多くの癌腫でp53の変異を起こすことがわかっており、治療のターゲットと考えられている。申請者らの研究グループは、近年 OBP-301 に p53 発現カセットを搭載した改良型腫瘍溶解ウイルス(OBP-702)を開発し(図2)、OBP-301 より優れた抗腫瘍効果を示すことを報告しており、胃癌に対してもその効果が期待できる。

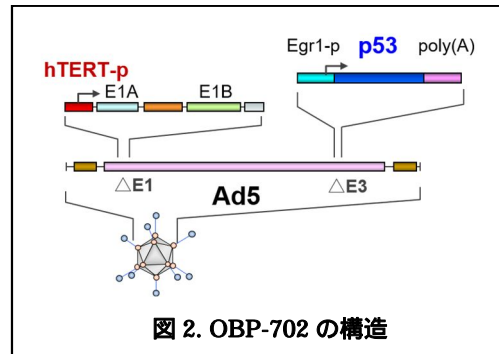


図2. OBP-702の構造

2. 研究の目的

胃癌の腹膜播種形成や治療抵抗性における癌微小環境中のCAFの役割を解明し、難治性である胃癌の腹膜播種に対して、改良型腫瘍溶解ウイルス(OBP-702)と化学療法(Paclitaxel: PTX)を併用した腹腔内治療をすることにより、新たな治療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胃癌切除標本におけるCAFマーカー発現の免疫組織学的検討

当科において外科的切除された胃癌の切除組織標本を用いて、CAFマーカーとして知られている-smooth muscle actin (-SMA)やFibroblast activation protein (FAP)の発現を免疫組織化学染色にて解析し、予後やリンパ節転移、腹膜播種との相関について検討を行う。

(2) 胃癌細胞CAF細胞の細胞相互間作用の検討

線維芽細胞株(NHLF、FEF3)にTGF- β や癌細胞培養液の上清刺激を行うことによりCAF細胞を作製する。このCAF細胞と胃癌細胞株(KATO-III、NUGC-4)とを共培養または培養上清刺激により、CAFの癌細胞への影響を検討する。

(3) 胃癌切除標本から初代培養によりCAFの樹立およびCAFの機能解析

外科的切除された胃癌切除標本の腫瘍部からCAF、非癌部から正常線維芽細胞(NGF)を初代培養にて樹立し、p53のリン酸化や化学療法抵抗性、OBP-702感受性などについて機能解析を行い、CAFとNGFでの特性の違いを検討する。

(4) 腹膜播種モデルにおけるCAFの播種形成促進作用の検討 (in vivo)

ヌードマウスに胃癌細胞株単独または、胃癌細胞とCAF細胞を同時に移植し、腹膜播種モデルを作成し、腫瘍の生着率や増殖速度、さらには化学療法に対する治療抵抗性についても検討し、CAFの腹膜播種形成促進作用を検討する。

(5) 胃癌細胞株に対するOBP-702の抗腫瘍効果および抗癌剤との相乗効果の検討

胃癌細胞株(MKN45、KATO-III、NUGC-4)に対して、抗腫瘍ウイルス(OBP-702)および抗癌剤の単独および併用投与時の抗腫瘍効果について、XTTアッセイを行い、相対的細胞生存率を検討する。同時に、OBP-702および抗癌剤の至適濃度や投与時期について検討し、最も治療効果の高い条件を設定する。OBP-702および抗癌剤の単独や併用投与時に誘導される細胞死の形態について、Apoptosis関連マーカー(PARP、Caspase-3)やAutophagy関連マーカー(p62、Atg5、LC3-I、LC3-II)のタンパク発現を解析する。

(6) OBP-702とPTX併用腹腔内投与による腹膜播種の治療効果の検討 (in vivo)

ヌードマウスを用いた同所性胃癌腹膜播種モデルにて、OBP-702 および PTX を単独、併用で腹腔内投与した際の抗腫瘍効果について、腫瘍径、重量、生存期間について検討を行い、評価する。また、腹水量変化について CT を用いて評価、検討を行う。副作用についても体重減少や腸管穿孔、肝障害、腹腔内癒着等についての肉眼的および組織学的評価を行う。治療後の組織を回収して、OBP-702 が腫瘍細胞および CAF に与える影響についても解析する。

4. 研究成果

(1) 胃癌腹膜播種における癌微小環境の解析

16 例の外科的切除された臨床検体を用いて、胃癌腹膜播種の免疫組織学的染色で評価した結果、全例において CAF マーカー (SMA, FAP) および IL-6 の上昇を認めており、腹膜播種形成や腫瘍増殖に CAF や IL-6 が関連していることが示唆された。

(2) CAF の機能解析

外科的切除された臨床検体から CAF および NGF を樹立することに成功し、その機能解析を行った。まず、phos-tag を用いた western blot にて、CAF は NGF に比べて癌抑制遺伝子である p53 のリン酸化が低下しており、その結果、p53 のタンパク構造変化や機能変化を起こしている可能性が考えられた (図 3)

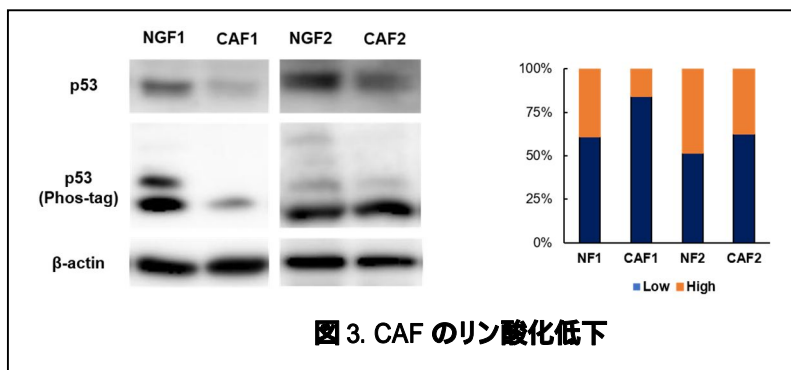


図 3. CAF のリン酸化低下

また、CAF は NGF に比べて、腫瘍増殖や腫瘍免疫の抑制に関わるサイトカインの IL-6 分泌が亢進しており、化学療法 (Paclitaxel) に対しても、CAF は抵抗性を示すことが明らかとなった。

(3) OBP-702 の CAF に対する効果

P53 を搭載した腫瘍溶解ウイルス (OBP-702) を用いて、CAF に対する作用を検証した結果、OBP-702 は NGF にはほとんど影響を与えないにも関わらず、CAF に対しては細胞障害性を認めた (図 4)。正常 p53 を CAF 内で増幅することにより、apoptosis を起こし、腫瘍増殖に関わるサイトカイン分泌も減少させることを確認した (図 5)。

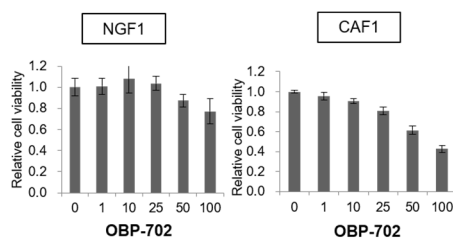


図 4. OBP-702 の CAF への効果

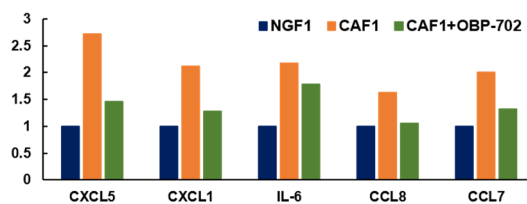


図 5. OBP-702 による CAF への影響

(4) CAF による腹膜播種促進作用

ヌードマウスを用いて、胃癌腹膜播種モデルを作成。腫瘍細胞単独に比べて、腫瘍細胞と CAF を共接種した方が、腹膜播種形成の増加、腫瘍サイズの増加を認め、播種形成および増大に CAF が関わっていることが示唆された (図 6)。

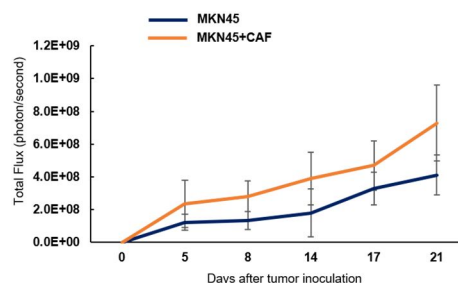


図 6. CAF による腫瘍増大効果

(5) 腹膜播種に対する腹腔内ウイルス療法

マウスを用いた腹膜播種モデルに、OBP-702 および PTX を腹腔内投与し、治療効果を検証した結果、OBP-702 と PTX 併用療法では、強力な腹膜播種治療効果を示し、播種組織中の CAF も抑制して

いることがわかった (図7)。

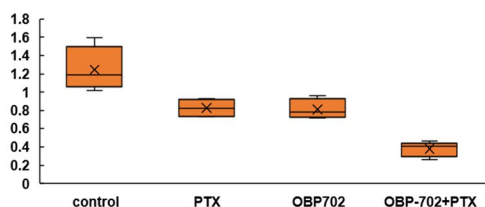


図 7a. 腹腔内治療による播種治療効

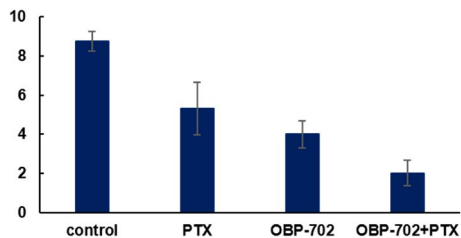


図 7b. 腹腔内治療による CAF への効果

今回の研究成果から、腹膜播種におけるがん微小環境中で CAF は播種形成や腫瘍の増大に大きく関わっており、また CAF において癌抑制遺伝子である p53 が機能異常を起こしていることがその一因となっている可能性が考えられた。さらに、p53 を搭載した腫瘍溶解ウイルスである OBP-702 は、癌細胞のみならず、CAF にも影響を与えて、抗腫瘍効果を発揮することがわかった。そのため、腹膜播種に対する OBP-702 を用いた腹腔内治療は、治療困難な腹膜播種に対して有効な新規治療になる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ogawa T, Kikuchi S, Ishikawa W, Tazawa H, Tabuchi M, Kuroda S, Noma K, Nishizaki M, Kagawa S, Urata Y, Fujiwara T
2. 発表標題 Boosting replication and penetration of telomerase-specific replicative virus by paclitaxel induces synthetic lethality in peritoneal metastasis of gastric cancer
3. 学会等名 アメリカ癌学会 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ogawa T, Kikuchi S, Ishikawa W, Tazawa H, Tabuchi M, Kuroda S, Noma K, Nishizaki M, Kagawa S, Urata Y, Fujiwara T
2. 発表標題 A novel intraperitoneal theranostic virotherapy with Paclitaxel for peritoneal metastasis of gastric cancer
3. 学会等名 第25回日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ogawa T, Kikuchi S, Ishikawa W, Tazawa H, Tabuchi M, Kuroda S, Noma K, Nishizaki M, Kagawa S, Urata Y, Fujiwara T
2. 発表標題 The impact of p53 arming multi-potent oncolytic adenovirus on gastric cancer cells and tumor microenvironment
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川 俊博, 菊地 寛次, 田淵 幹康, 田澤 大, 黒田 新士, 野間 和広, 西崎 正彦, 香川 俊輔, 浦田 泰生, 藤原 俊義
2. 発表標題 p53搭載腫瘍溶解アデノウイルスを用いた胃癌腹膜播種に対する治療戦略と癌微小環境に与える影響
3. 学会等名 第32回日本バイオセラピー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshihiro Ogawa, Satoru Kikuchi, Wataru Ishikawa, Hiroshi Tazawa, Motoyasu Tabuchi, Shinji Kuroda, Kazuhiro Noma, Masahiko Nishizaki, Shunsuke Kagawa, Yasuo Urata, Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 Boosting replication and penetration of telomerase-specific replicative virus by paclitaxel induces synthetic lethality in peritoneal metastasis of gastric cancer
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019 (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
---------	---------