

機関番号：20101

研究種目：基盤研究B

研究期間：2008～2010

課題番号：20390211

研究課題名（和文）

特異的線維化療法によるスキルス胃癌の新規治療法の開発

研究課題名（英文）

A novel anti-fibrotic therapy for scirrhou gastric cancer.

研究代表者

瀧本 理修（Rishu Takimoto）

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10336399

研究成果の概要（和文）：特異的線維化療法によるスキルス胃癌の新規治療法の開発

研究成果の概要（英文）：A novel anti-fibrotic therapy for scirrhou gastric cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：①癌 ②線維化 ③内科

## 1. 研究開始当初の背景

がん組織は癌細胞と、それを取り巻く間質から成り立っている。ところが、これまで抗腫瘍モダリティの多くはがん細胞のみを標的としてきたために、耐性獲得や不均一性という問題に直面してきた。その点がん間質を標的とすれば、比較的これらの問題点は少ないと考えられる。事実、最近臨床においても使用されている抗血管新生療法の有効性が確認されつつある。

スキルス胃癌は間質増生を特徴とし、診断時には腹膜播種病変を認める事が多く、胃癌の中でも最も予後不良な疾患である。最近、

がんの間質増生に關与する線維芽細胞（がん随伴線維芽細胞，Cancer associated-fibroblasts: CAF と呼称される）はがん細胞からのTGF-βなどの種々のサイトカイン刺激により一般的な線維芽細胞とは異なった特性を示すようになることが明らかにされた（Hardy J, et al., Science 2004; Orimo A, et al., Cell 2005）。つまり、CAFはα-Smooth muscle actin (α-SMA), Vimentinなどを発現し、同時にHGFやTGF-βなどの成長因子を分泌することでがん細胞の増殖を積極的にサポートすることが示されている。

我々はこれまでスキルス胃癌から活性型

TGF- $\beta$  が分泌されていることを示してきた (Horimoto M, Takimoto R, Niitsu Y, et al., Br J cancer 1995; Maraha K, Takimoto R, Niitsu Y, et al., Br J Cancer 1994). 最近になってヒトスキルス胃癌由来 CAF が、肝硬変に關与する肝星細胞 (やはり  $\alpha$ -SMA 陽性) と同様にレチノール結合蛋白受容体 (Kawaguchi R., Science 315, 2007) を介して Vitamin A (VA) を積極的に取り込んでいることを知った. 一方, ごく最近我々は, VA を conjugate させた liposome (VA-lip) にコラーゲン特異的シャペロンの siRNA を封合せ, それを systemic injection することで, 線維化を完全に消失させるという新しい肝硬変の治療法を確立している (Nature Biotech, 2008). そこで, この結果を踏まえてスキルス胃癌に対する新たな治療法を考案した.

## 2. 研究の目的

本研究では抗癌剤を内包させた VA-lip を用いてスキルス胃癌の CAF を特異的に障害させることで, CAF からがん細胞への増殖因子供給を絶つと共に, 障害された CAF から局所で放出された抗癌剤によりがん細胞自身も攻撃するという“スキルス胃癌の新規標的療法を確立する.

## 3. 研究の方法

(1). CAF および正常線維芽細胞 (normal fibroblast: NF) の分離: CAF は癌組織 (消化器癌, 乳癌患者由来組織), 正常線維芽細胞はその近傍の正常組織から単離する. 具体的には, 組織を細切後 0.02% proteinase と collagenase 含有 DMEM で 24 時間培養後, DMEM で洗浄しさらに 48 時間培養, 附着細胞をそれぞれ CAF と正常線維芽細胞とする. CAF および正常線維芽細胞の性状を  $\alpha$ -SMA, desmin,

vimentin, cytokeratin による免疫組織染色を行い分析する. なお,  $\alpha$ -SMA 陽性率 90% 以上認めるものを CAF として用いることとする.

(2). CAF あるいは正常線維芽細胞 (NF) との共培養システムの構築: CAF あるいは NF  $1 \times 10^5$  を two chamber 6 well plate の lower chamber に撒き, 24 時間後, upper chamber にスキルス胃癌細胞株 (KATOIII, OCUM-1 あるいは HSC-39)  $1 \times 10^4$ - $10^5$  で共培養し, 経時的 (day 1, 3, 5) に細胞数を計測する.

同様にスキルス胃癌細胞の DNA profile を検討し S 期の細胞を計測する.

(3). VA-liposome 抗癌剤, VA-liposome-siRNA の作成: Liposome-抗癌剤の作成は凍結乾燥空リポゾームに doxorubicin を混和 (水溶液として 1:1 w/w) することで作製する. なお, 凍結乾燥空リポゾームは数社から購入可能であるため, 最も効率の良いシステムを選択する. 次に, 上記で作成した Lip-抗癌剤に対して Vitamin A (VA) を 1:1~1:5 (w/w) の割合で混和し, 1) で分離した CAF に対する抗腫瘍効果を MTT 法で検討する. なお, VA 特異的に導入されているか否かを, VA conjugate の有無で比較検討することを予定している. 具体的には CAF あるいは NF  $1 \times 10^4$ /well で 96 well plate に撒き, doxorubicin の終濃度が 0 - 10  $\mu$ g/ml になるよう調整した Lip-Dox を VA (+/-) と conjugate し, 24-48 時間後の抗腫瘍効果を検討する.

上記によって得られた殺細胞効果における IC50 の濃度を用いて共培養システムに導入し, 各種スキルス胃癌細胞に対する細胞増殖抑制効果を検討する. VA-liposome-siRNA の混合比に関しては, すでに基礎的検討を終了し最大効率を得られる mol 比を決定している (Nat Biotech, 2008). スキルス胃癌細胞の VA-liposome-siRNA/HSP47, VA-liposome-抗

癌剤によるアポトーシス誘導を AnnexinV assay, FACS で確認する。

(4). スキルス胃癌 (KATO-III) 担癌マウスの作成と VA-liposome-抗癌剤, siRNA-HSP47 による抗腫瘍効果の検討: SCID マウスに  $5 \times 10^6$  個のスキルス胃癌細胞を接種し, 担癌マウスを作製する。腫瘍径が約 5 mm になった時点で研究を開始する。VA-liposome-抗癌剤, liposome-抗癌剤あるいは抗癌剤単独をそれぞれの系において 10 匹ずつのマウスに経静脈投与し, 腫瘍径の変化を経時的に観察し, 抗腫瘍効果を検討する。なお, 投与後 1 週目, 2 週目に腫瘍を摘出し, 腫瘍細胞内にみられるマウス由来の CAF を  $\alpha$ -SMA 染色で同定し, 形態並びにアポトーシスの有無を検討する。

5. VA-liposome-抗癌剤, siRNA-HSP47 及び抗癌剤併用による抗腫瘍の増強効果の検討: 本研究においては上述した VA-lip-抗癌剤あるいは VA-lip-siRNA/HSP47 を投与した上に 5-FU, CDDP などの抗癌剤を全身投与し, 抗腫瘍効果が増強するか検討する。具体的には腫瘍径が 5 mm になった時点で, VA-lip-抗癌剤あるいは VA-lip-siRNA/HSP47 を経静脈投与し, さらに, 上記の実験で得られた腫瘍増殖曲線に基づき 5-FU の投与を予定する (1 週間めが妥当であると考えられる)。

#### 4. 研究成果

(1). CAF および正常線維芽細胞 (normal fibroblast: NF) の分離: 担癌患者から分離した CAF 及び正常組織由来線維芽細胞 (NF) の  $\alpha$ -SMA は CAF で約 90% の陽性率であったのに対し, NF では極めて発現が低値であった (図 1)。つまり, CAF は癌細胞に随伴することで筋線維芽細胞に類似した性質を有し, 肝星細胞のように VA を取り込む可能性が考えられた。そこで, VA-lip あるいは lip 単独に FAM を封入したリポゾーム製剤で CAF, NF を

処理し蛍光色素の導入を検討したところ, 予想通り CAF において高率に蛍光色素の導入が見られ CAF が VA を取り込む性質に変態していることが示唆された。つまり CAF を VA デリポゾームを就職することにより標的とすることが示唆された。

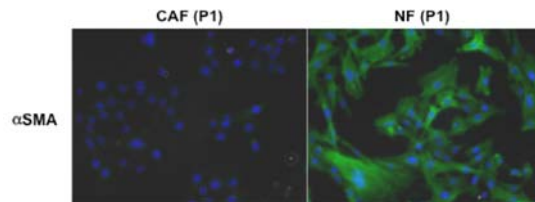


図1. 胃癌患者由来CAFとNFの $\alpha$ -SMA染色

(2). CAF あるいは正常線維芽細胞 (NF) と腫瘍細胞との共培養システムの構築 (図 2): CAF あるいは NF とスキルス胃癌由来細胞株 KATO-III を共培養し, VA-lip-DOX を添加したところ, 有意に KATO-III 細胞の増殖を抑制した。この結果より, CAF を標的とすることによりがん細胞自身の増殖も抑制しうることが考えられた。

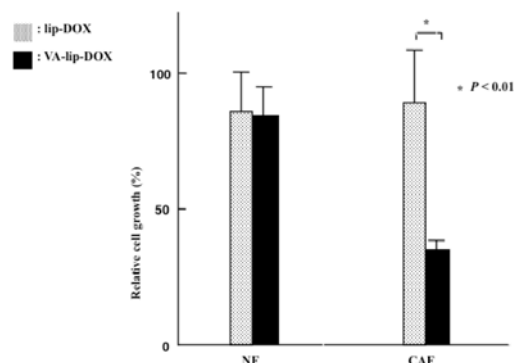


図2. KATO-IIIとNF, CAF共培養系におけるVA-lip-DOXによる抗腫瘍効果

(3). スキルス胃癌 (KATO-III) 担癌マウスの作成と VA-liposome-抗癌剤の効果:

SCID マウスに KATO-III 細胞を移植し作製した皮下腫瘍に対し, preliminary に VA-lip-FAM を尾静脈より静脈投与したところ, FAM が特異的に腫瘍内に集積することを in vivo image analyzer で確認した。そこで, SCID マウスに同様に皮下腫瘍モデルを作製

し、この腫瘍増殖を検討した。その結果、KATO-III の増殖は、VA-liposome-抗癌剤、liposome-抗癌剤あるいは抗癌剤単独をそれぞれの系において造腫瘍性は抑制されたが、VA-liposome 抗癌剤の群において他の群に比較して有意に抑制された(図3)。すなわち、VA-lip-抗癌剤を用いれば CAF を標的としたスキルス胃がんに対する新規治療法となりうる可能性が示唆された。

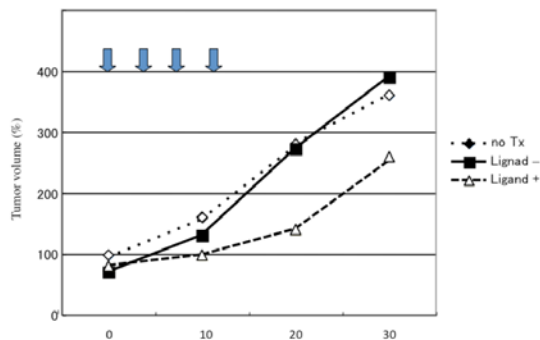


図3. VA-lip-DOXIによる造腫瘍性の抑制効果

## 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 15 件)

- ① Sato Y, Takimoto R, Argon plasma coagulation treatment of hemorrhagic radiation proctopathy: the optimal settings for application and long-term outcome. et al. Gastrointest Endosc. 2011, 73(3):543-9. 査読有
- ② Sato Y, Takimoto R, Endoscopic findings of enteropathy-type T-cell lymphoma by double-balloon enteroscopy and capsule endoscopy. et al. Dig Endosc. 2010, 22(3):243-5. 査読有
- ③ Kuribayashi K, Takimoto R, Pure red cell aplasia associated with Good's syndrome accompanied by decreased stem cell factor production in the bone marrow. et al. Intern Med. 2010;49(5):377-82. 査読有
- ④ Sato Y, Takimoto R, Phase II study of S-1, docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with unresectable metastatic gastric cancer. et al. Cancer Chemother Pharmacol. 2010, 66(4):721-8. 査読有
- ⑤ Hayashi T, Takimoto R, Suppressive effect of sulindac on branch duct-intraductal papillary mucinous neoplasms. et al. J Gastroenterol. 2009;44(9):964-75. 査読有
- ⑥ Kobune M, Takimoto R, Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells. et al. Cancer Sci. 2009, 100(5):948-55. 査読有
- ⑦ Sagawa T, Takimoto R, Treatment of hepatocellular carcinoma by AdAFPep/rep, AdAFPep/p53, and 5-fluorouracil in mice. et al. Hepatology. 2008, 48(3):828-40. 査読有
- ⑧ Sato T, Takimoto R, Apoptosis supercedes necrosis in mitochondrial DNA-depleted Jurkat cells by cleavage of receptor-interacting protein and inhibition of lysosomal cathepsin. et al. J Immunol. 2008, 181(1):197-207. 査読有
- ⑨ Kobune M, Takimoto R, Interaction with human stromal cells enhances CXCR4 expression and engraftment of cord blood Lin(-)CD34(-) cells. et al. Exp Hematol. 2008, 36(9):1121-31. 査読有
- ⑩ Iyama S, Takimoto R, Successful treatment of chronic myeloproliferative disease-unclassifiable (CMPD-U) with no chromosomal abnormalities by imatinib mesylate. et al. Intern Med. 2008; 47(8):791-4. 査読有

⑪ Sato Y, Takimoto R, Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. et al. Nat Biotechnol. 2008, 26(4):431-42. 査読有

⑫ Fujimi A, Takimoto R, Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. et al. Int J Hematol. 2008, 87(4):339-50. 査読有

⑬ Kukitsu T, Takimoto R, Aberrant crypt foci as precursors of the dysplasia-carcinoma sequence in patients with ulcerative colitis. et al. Clin Cancer Res. 2008, 14(1):48-54. 査読有

⑭ Matsunaga T, Takimoto R, Combination therapy of an anticancer drug with the FNIII14 peptide of fibronectin effectively overcomes cell adhesion-mediated drug resistance of acute myelogenous leukemia. et al. Leukemia. 2008, 22(2):353-60. 査読有

⑮ Kobune M, Takimoto R, Adenoviral vector-mediated transfer of the Indian hedgehog gene modulates lymphomyelopoiesis in vivo. et al. Stem Cells. 2008, 26(2):534-42. 査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀧本 理修 (TAKIMOTO RISHU)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 10336399

### (2) 研究分担者

佐藤 康史 (SATO YASUSHI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 80343383

### (3) 研究分担者

高田 弘一 (TAKADA KOICHI)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 90398321