

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07640

研究課題名（和文）治療応用を目指した胃癌におけるタイト結合分子CL-18.2発現調節機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of regulation mechanism of CL-18.2 expression in gastric cancer.

研究代表者

伊東 竜哉（Ito, Tatsuya）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10516636

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、胃粘膜特異的に発現するclaudin-18.2蛋白を標的とした抗体治療に向けて、胃癌におけるclaudin-18.2の発現状況とその調節機構を解明することを目的とした。まず胃癌原発巣および転移巣でのclaudin-18.2発現状況の差異を検討した。その結果、claudin-18.2発現胃癌のおよそ半数は転移巣においてもclaudin-18.2を発現が維持されることが判明した。一方で残り半数は発現強度が減弱ないし消失した。claudin-18.2発現胃癌では腫瘍先進部においても良好に発現が得られ、claudin-18.2発現と周囲微小環境、がん転移能獲得との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間中に胃癌に対するclaudin-18.2を用いた抗体療法の臨床試験の結果が複数報告され、本邦においても本治療の承認が得られた。一方でclaudin-18.2発現調節機構や、癌における機能については不明である。本研究ではこれらの端緒に触れるも、全貌の解明には至っていない。しかし我々は過去の研究も踏まえ、claudin-18.2蛋白の細胞内局在がこれらを解決する重要な点と考えたとともに、これは実際の治療応用に際しても重要な点になると考えている。現在、本研究はcell lineを用いた研究に発展・進行中である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the expression status and regulatory mechanisms of claudin-18.2 in gastric cancer, targeting the claudin-18.2 protein, which is specifically expressed in gastric mucosa, for antibody therapy. First, we examined the differences in claudin-18.2 expression between primary and metastatic lesions of gastric cancer. As a result, it was found that approximately half of the gastric cancers expressing claudin-18.2 maintained claudin-18.2 expression in metastatic lesions as well. On the other hand, the remaining half showed reduced or lost expression. In gastric cancers expressing claudin-18.2, favorable expression was also observed in the leading edge of the tumor, suggesting a correlation between claudin-18.2 expression and the surrounding microenvironment, as well as the acquisition of metastatic potential.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：胃癌 claudin-18.2 薬物療法 分子生物学的研究

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は今後の罹患数の減少が見込まれるものの、本邦では罹患率 2 位・死亡率 3 位と、いまだ予後向上への対策が必要な疾患である。これまで新規分子標的治療薬の開発は目覚ましい成果をあげているが、それでもなお進行再発胃癌の治療成績は、生存期間中央値で 14 か月程度と満足できるレベルに達していない。そのため新たな治療薬の開発がいまだに重要である。近年、正常胃粘膜上皮特異的に発現するタイト結合分子 Claudin-18.2 をターゲットとした抗体療法が開発され、臨床試験において有望な結果が得られつつあるが、胃癌における Claudin-18.2 の発現率が十分に判明していないことや、Claudin-18.2 は正常胃粘膜上皮に恒常的高発現することなど、治療効果や副作用の面での課題があった。

2. 研究の目的

本研究では、胃癌における Claudin-18.2 の発現調節機構について解明し、より広い対象に Claudin-18.2 を治療応用するために克服すべき課題を明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

計画時点では以下の 3 つの研究方法を順次進行させるプランとした。

1. 胃癌切除標本を用いた Claudin-18.2 発現の解析

本研究では胃癌における CL-18.2 発現の解析のため、手術標本における疾患部と正常部とでの CL-18.2 発現と局在の違いを検討する。発現量の評価にはリアルタイム PCR 法や Western blot 法を用い、局在の変化については免疫染色法を用いる。申請者らは、これまでに胃癌手術後の再発症例における CL-18.2 発現状況の解析を行い、同時性リンパ節転移巣や、これまで報告のない異時性遠隔転移巣において、おおむね原発巣の CL-18.2 発現パターンが保たれることを解明した。本研究においては様々な胃癌症例に対して同様の検討を行い、臨床病理学的因子との関連を評価するとともに、これらと連結させた基礎データを作成する。

2. 胃癌細胞株を用いた Claudin-18.2 発現調節機構の解析

ヒト胃癌由来の細胞株に対して薬物を作用させ、CL-18.2 の発現変化を検討することにより、胃癌における CL-18.2 の発現調節機構を解明する。申請者らはこれまで、いくつかの臓器・腫瘍において CL-18.2 を含むタイト結合分子の発現調節機構に PKC pathway が大きく関わることを解明し報告してきた(研究業績 1,4,5,6,7,9)(図 6)。胃癌における CL-18.2 発現にも同様の経路が深く関与していることが想定され、本研究では PKC 作動薬を細胞株に作用させ、さらに PKC サブタイプの分析を加えることで発現調節機構の解析を行う。また CL-18 そのものを knockdown することでの発現・局在の変化についても評価する。発現量の評価にはリアルタイム PCR 法や Western blot 法を用い、局在の変化については 3-D 免疫染色法を用いる。

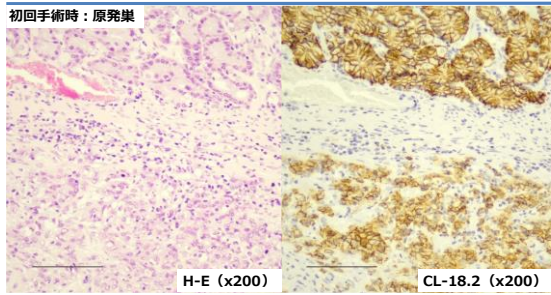
3. 胃癌細胞株を用いた Claudin-18.2 抗体療法の治療効果の解析

CL-18.2 の臨床応用のためには CL-18.2 の発現・局在が重要であるという仮説を裏付けるために、CL-18.2 を様々な変化させた胃癌細胞株に zolbetuximab を作用させ、局在を含めた CL-18.2 発現の違いと治療効果の関連について検討する。解析には MTT assay や invasion assay を用いる。

4. 研究成果

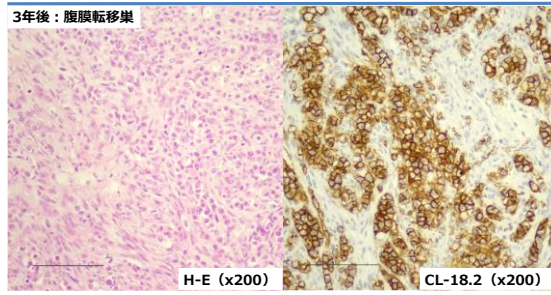
本研究ではまず胃癌切除標本を用いた胃癌組織中の Claudin-18.2 発現状況の解析を主に免疫染色法を用いて行った。特に原発巣と異時性再発巣での Claudin-18.2 発現状況の変化に着目し、双方の検討可能な組織標本が存在する例について解析を行うと、双方において Claudin-18.2 発現パターンの相同性が観察された(結果 1,2,3)。また原発巣癌先進部にも Claudin-18.2 の高発現が観察された。その結果をもとに、周囲微小環境との関連について着目し、癌先進部でのマクロファージや fibroblast と Claudin-18.2 発現との関連について検討をおこなったところ、desmoplastic reaction やリンパ球浸潤が Claudin-18.2 発現癌細胞の周囲に観察された(結果 4)。これらより、Claudin-18.2 の抗体療法は進行再発胃癌に対して病理学的側面からも効果が期待できることと、Claudin-18.2 が胃癌の浸潤転移成立メカニズムに関与することが示唆された。現在臨床面においては Claudin-18.2 抗体薬の胃癌に対する 2 本の第 III 相臨床試験で有望な結果が示され、本邦でも臨床使用が開始される見込みである。一方で、胃癌における Claudin-18.2 発現調節機構や、局在と抗体薬の治療効果との関連については不明な部分が多く、引き続き本研究は継続予定である。特に計画 2・3 の細胞株を用いた実験について、現在進行中である。

結果1 : CL-18.2染色(原発巣)



Department of Surgery, Surgical Oncology and Science, Sapporo Medical University 

結果2 : CL-18.2染色(腹膜転移巣)



Department of Surgery, Surgical Oncology and Science, Sapporo Medical University 

結果3 : CL-18.2染色(原発巣と転移巣)

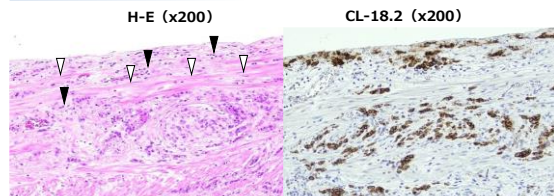
原発巣・転移巣のCL-18.2染色強度

		原発巣・転移巣のCL-18.2染色強度				
		0	1+	2+	3+	
転移巣 原発巣	0	1	0	0	0	原発巣で高発現：93%
	1+	0	0	0	0	-原発巣・転移巣で高発現：50%
	2+	0	0	0	0	-転移巣で発現減弱：43%
	3+	2	1	3	7	原発巣で発現なし：7%
						-原発巣・転移巣で発現なし：7%
						-転移巣のみで発現：0%

原発巣と転移巣でのCL-18.2発現に相同性あり

Department of Surgery, Surgical Oncology and Science, Sapporo Medical University 

結果4 : CL-18.2染色(腫瘍先進部)



リンパ球浸潤(▼)やDesmoplastic reaction(▽)とともに
CL-18.2陽性腫瘍細胞(右写真茶)が観察された

Department of Surgery, Surgical Oncology and Science, Sapporo Medical University 

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	高澤 啓 (Takasawa Akira) (00593021)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	竹政 伊知朗 (Takemasa Ichiro) (50379252)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	信岡 隆幸 (Nobuoka Takayuki) (50404603)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	

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