

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09031

研究課題名（和文）消化器癌における血球細胞を介した癌進展機序の解明と新たな治療法開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of hematopoietic cell-mediated cancer progression in gastrointestinal cancer and development of new treatment methods

研究代表者

市川 大輔 (Ichikawa, Daisuke)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：20347446

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：胃癌細胞と血小板が直接接着することによって、癌の腹膜への接着能や増殖能が亢進し、遊走・浸潤能も更新することが判明した。同様に膵臓癌細胞でも、これら血小板の接着による癌細胞の悪性度の増強が確認され、実際に手術中の出血量が多い群で予後が不良であり局所再発も多いことが判明した。また、血小板上のCLEC-2分子のリガンドであり癌関連線維芽細胞の表面マーカーでもあるPodoplaninの測定を行ったところ、血漿中Podoplanin値が予後不良のバイオマーカーとなり得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

依然として高度進行胃癌に対する治療成績は不良であり、転移に対する新たな治療戦略が望まれている。本研究課題は、癌細胞自体や組織中の線維芽細胞等の間質に注目して行われてきた従来の研究とは異なり、循環血液中や手術中の出血によって癌細胞が容易に相互作用を起こし得る血液成分の中の血小板に着目した新たな観点からの解析の試みである。研究成果として、癌細胞と血小板との接着が転移形成における様々な段階で促進的に働く可能性が示唆され、その分子機序の解明によって全く新たな治療戦略に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that platelets from GC patients promote malignant behaviours of GC cells through EMT-related signalling, especially by direct contact with tumour cells. In pancreatic cancer, platelets also enhance the malignant behaviors of cancer cells, potentially contributing to poor prognosis for pancreatic cancer patients. Plasma soluble podoplanin was found to be a marker for diffuse gastric cancer, and the high expression level could be a poor prognostic marker in patients with gastric cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌悪性度 血小板

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内の核酸等の遺伝情報が蛋白質と共に exosome 等の microvesicles に封入され、細胞外でも安定した状態で存在し、細胞間の情報伝達物質として癌の進展に深く関わる可能性が示唆されている。我々は、これまでに消化器癌患者における末梢血液中の microRNA について、その診断的有用性ならびに治療効果予測因子としての有用性を報告してきた。また、新たな胃癌における腹膜播種の進展機序として、これら microRNA 等を含んだ癌細胞由来 exosome が、別の癌細胞の浸潤能を亢進させ、中皮細胞へも作用し細胞表面上の接着因子の発現上昇を介して接着能も亢進させることを報告してきた。

一方で、担癌状態における血球成分の異常は以前から知られており、癌の進展に伴う貧血の進行や血小板の増加や減少等も実地臨床では頻繁に経験される。血小板等の数的異常と癌患者の予後との相関も報告されているが、術中出血量と腹膜播種再発との相関も報告してきた。これら血球成分には極めて多量の microRNA が含有されることや、赤血球において exosome 等の microvesicles が能動的に分泌されることも報告されている。血小板については、癌転移・浸潤における様々な機能が報告されており、腫瘍血管新生作用や血液中の遊離癌細胞との相互作用による転移の促進や免疫機構からの回避への関与も報告されている。

## 2. 研究の目的

前述の知見から、『消化器癌担癌患者の血球細胞由来の細胞外遊離 exosome や、血球細胞と癌細胞との細胞接着を介した細胞間の情報伝達が存在し、癌の進展に関与している』との仮説を立てた。手術侵襲によって急速な進展を認めることも実地臨床では経験するところであり、本研究課題では、『消化器癌における血球細胞を介した新たな癌進展機序の解明と臨床応用』を目指して、特に周術期における術中出血の観点からも、血球細胞と癌細胞との接着や、血球細胞由来の exosome (赤血球、血小板、白血球由来)の癌細胞や周囲支持細胞への影響を検討し、その分子機序についても解析することで、新たな周術期の併用治療法の開発にも繋げる予定である。近年、microRNA を中心とする様々な遺伝情報が exosome 等の媒体を介して細胞間を越えて伝達される可能性が示唆されているが、無核である血球細胞にもこれら多数の遺伝情報が含まれ、その一部は分泌された後、他の受け側細胞でも機能することが報告されている。

一方で、担癌患者における血球成分の数的異常や、癌の予後との相関は以前から報告され、血小板については、癌の様々な進展形式への関与も報告されている。手術中の出血や術後合併症の発生と予後との関連についても以前から報告されてきたが、その詳細な機序については不明であった。今回、消化器癌担癌患者の血球細胞が癌の更なる進展に関与し周術期の治療成績にも影響を及ぼすとの考えのもと、本研究課題では、消化器癌における血球成分を介した新たな癌進展機序の解明を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 胃癌細胞と血小板との相互作用による悪性度変化についての検討

)胃癌患者や対照者から血小板を精製し、胃癌細胞株への添加後に電子顕微鏡による観察を行った。

)胃癌細胞株 (NUGC-3、MKN74) の培養液中に胃癌患者由来血小板を投与し、添加の有無によ

る各種機能評価について検討した。具体的には、細胞増殖能に加えて、中皮細胞を予め接着させたプレートを用いた接着能解析を行った。また、Boyden chamber assay を用いた遊走・浸潤能解析も行い、血小板添加を行わない群との比較検討を行った。

）前述 .での悪性度変化の機序について、血小板から分泌される Exosome を含む様々な液性分子による間接的な影響と、血小板の接着による直接的な影響が考えられるため、血小板不透過膜を介した条件下に同様の機能解析を行った。

）胃癌細胞株のみの培養と血小板との共培養を行い、各々の細胞株から抽出した mRNA を用いて microarray 解析を行なった。その結果をもとに、胃癌細胞と血小板との相互作用の分子機序について検討した。

）血小板表面上の C-type lectin like receptor 2(CLEC-2)の生体内リガンドであり、癌関連線維芽細胞の表面マーカーでもある podoplanin を検索対象として、2つの異なる胃癌患者コホートの術前血漿を用いた解析を行い、その測定値と臨床病理学的因子との比較検討を行った。

#### (2) 膵臓癌細胞と血小板との相互作用と臨床意義についての検討

）膵臓癌細胞株 Panc-1 を用いて、胃癌細胞株での解析と同様に血小板を培養液中に添加した後の各種機能解析（細胞増殖能、中皮細胞への接着能、遊走・浸潤能）を行った。

）膵臓癌細胞の悪性度増強について、血小板から分泌される様々な液性分子による間接的な影響と、血小板の接着による直接的な影響について検討するため、血小板不透過膜を介した前述の機能解析も行い、細胞間接着の意義について検討を行った。

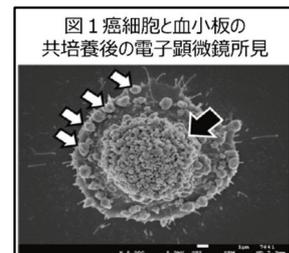
）炎症下での接着能も想定し、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- (TNF- )の添加による影響についても検討した。

）臨床上的意義を検討するため、当科で手術を施行した 107 名の膵臓癌患者の手術中出血量と予後との相関について検討した。また、膵液漏の意義や再発形式についての検討も行った。

### 4. 研究成果

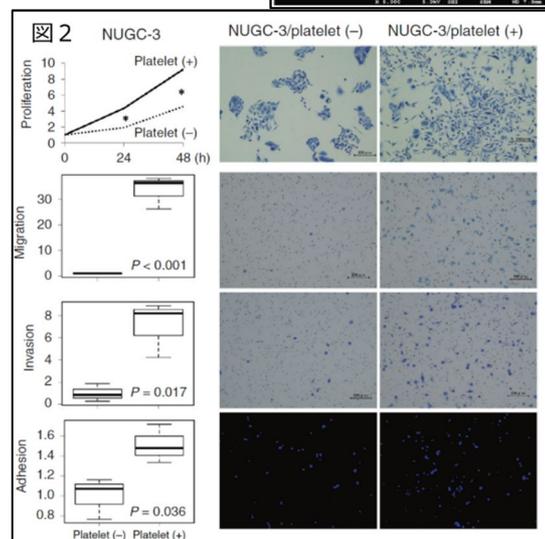
#### (1) 胃癌細胞と血小板との相互作用による悪性度変化についての検討

胃癌患者や対照者の末梢血液から精製した血小板を胃癌細胞株へ添加したところ、癌細胞表面全体にわたる多数の血小板の接着が確認された(図1 黒矢印; 癌細胞、白矢印; 血小板)。

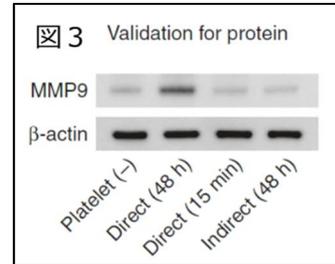


胃癌細胞株 NUGC-3 への血小板の添加によって、細胞増殖能の有意な増加を認め ( $p < 0.05$ )、中皮細胞に対する接着能も有意に上昇した ( $p = 0.036$ )、また、遊走能や浸潤能も血小板の共培養によって、顕著に亢進した ( $p < 0.001$ 、 $p = 0.017$ ) (図2)。

MKN74 を用いた解析でも同様に、増殖能や中皮細胞への接着が増強し、遊走・浸潤能の顕著な亢進を認めた。一方で、血小板不透過膜を用いた液性因子のみ通過可能な条件下での共培養に比較して、血小板が癌細胞に接着可能な通常の共培養では、有意に増殖能や中皮細胞への接着能が増強し ( $p < 0.05$ 、 $p = 0.009$ )、遊走・浸潤能も顕著に亢進し ( $p < 0.001$ 、 $p = 0.003$ )、これらの悪性度増強が癌細胞と血小板の直接接着に起因する可能性が示唆された。



また、胃癌細胞株と血小板との共培養後の発現解析では、617 個の分子において有意な発現増強を認め、734 個の分子については有意な発現低下を認めた。GO 解析では、増殖、細胞接着ならびに細胞遊走関連遺伝子群に有意な差を認め、EMT 関連分子である MMP9 (図 3) や Integrin 5 の発現増強ならびに Claudin1 や Cadherin1 の発現低下も確認された。これら EMT を来たす機序



について、血小板の活性化によって放出される 顆粒内に多く含有される transforming growth factor- (TGF-) に着目し、TGF- receptor kinase inhibitor (TRKI) による遊走・浸潤能の変化を検討したところ、MMP9 をはじめとする EMT 関連分子の発現増強が抑制されることも確認された。

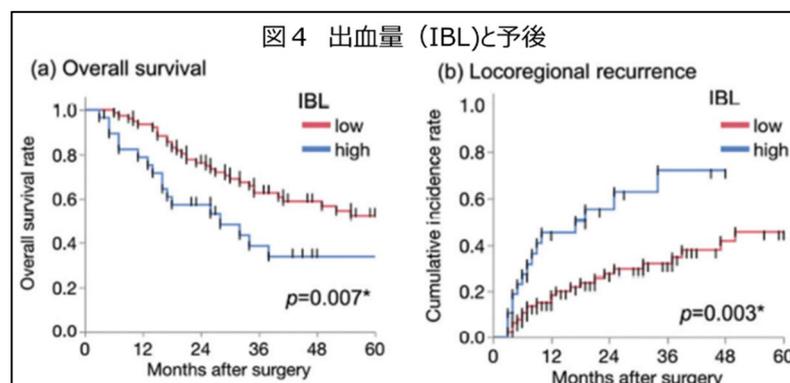
一方で、血小板表面上の C-type lectin like receptor 2 (CLEC-2) の生体内リガンドであり、癌関連線維芽細胞の表面マーカーでもある Podoplanin について、2 つの異なる胃癌患者コホートの術前血漿を用いた測定を行い、その測定値と臨床病理学的因子との比較検討を行ったところ、胃癌患者の血漿中可溶性 Podoplanin 高値群が、スキルス胃癌を代表とする浸潤型胃癌の血漿中バイオマーカーとなる可能性が示唆され、高値群で予後が有意に不良であった。

### (2) 膵癌細胞と血小板との相互作用と臨床意義についての検討

前述の胃癌細胞株を用いた解析と同様に、膵臓癌細胞株 Panc-1 を用いて血小板を培養液中に添加した後の各種機能解析を行い、血小板非添加群との比較検討を行ったところ、細胞増殖能の増強を認めた ( $p < 0.01$ )。また、遊走・浸潤能解析でも同様に、血小板添加による有意な亢進を認めた ( $p = 0.007$ ,  $p < 0.001$ )。一方で、中皮細胞への接着能については、血小板の添加のみでは有意な増強を認めなかったが、炎症環境下では顕著な増強が確認された ( $p < 0.001$ )。

血小板の癌細胞に対する臨床上的意義を検索するため、当科で手術を施行した 107 名の膵臓癌患者の手術中の出血量と予後との相関について検討したところ、単変量解析では、術中出血量 ( $p = 0.007$ ) が腫瘍マーカー高値や腫瘍遺残等と共に予後不良因子であった。多変量解析でも術中出血多量群が腫瘍遺残と共に独立予後規程因子として選択された ( $p = 0.037$ )。再発形式の解析では、血行性転移に有意な差を認めなかったが、出血多量群で局所再発を多く認めた ( $p = 0.003$ )

(図 4)。更に詳細な解析では、臨床的に顕著な膵液漏を来たした症例で、特に術中出血量多量群の予後が有意に不良であり、局所再発も有意に多く認める一方で、膵液漏を認めない群では、その傾向が認められないことも確認された。



### 引用文献

- Wendler F, Favicchio R, Simon T, Alifrangis C, Stebbing J, Giamas G; Extracellular vesicles swarm the cancer microenvironment: from tumor-stroma communication to drug intervention. *Oncogene* 36:877-884,2017
- Ichikawa D, Komatsu S, Konishi H, Otsuji E; Circulating microRNA in digestive tract cancers. *Gastroenterology* 142:1074-1078,2012

Maruyama S, Furuya S, Shiraishi K, Shimizu H, Saito R, Akaike H, Hosomura N, Kawaguchi Y, Amemiya H, Kawaida H, Sudo M, Inoue S, Kono H, Ichikawa D; Inhibition of apoptosis by miR-122-5p in  $\alpha$ -fetoprotein-producing gastric cancer. *Oncol Rep* 41:2595-2600,2019

Arita T, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Shiozaki A, Ogino S, Fujita Y, Hiramoto H, Hamada J, Shoda K, Kosuga T, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E; Tumor exosome-mediated promotion of adhesion to mesothelial cells in gastric cancer cells. *Oncotarget* 7:56855-56863,2016

Arita T, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Shiozaki A, Hiramoto H, Hamada J, Shoda K, Kawaguchi T, Hirajima S, Nagata H, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E; .Increase in peritoneal recurrence induced by intraoperative hemorrhage in gastrectomy. *Ann Surg Oncol* 22:758-764,2015

Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, Tait JF, Tewari M; Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res* 5:492-497,2012

Regev-Rudzki N, Wilson DW, Carvalho TG, Sisquella X, Coleman BM, Rug M, Bursac D, Angrisano F, Gee M, Hill AF, Baum J, Cowman AF; Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell* 153:1120-1133,2013

Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA; Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 168:670-691,2017

Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Hempel D, Tucker SC, Honn KV; Platelets and cancer angiogenesis nexus. *Cancer Metastasis Rev* 36:249-262,2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Saito Ryo, Kawaida Hiromichi, Hosomura Naohiro, Amemiya Hidetake, Itakura Jun, Yamamoto Atsushi, Takiguchi Koichi, Maruyama Suguru, Shoda Katsutoshi, Furuya Shinji, Akaike Hidenori, Kawaguchi Yoshihiko, Sudo Makoto, Inoue Shingo, Kono Hiroshi, Ichikawa Daisuke	4. 巻 28
2. 論文標題 Exposure to Blood Components and Inflammation Contribute to Pancreatic Cancer Progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 8263 ~ 8272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-021-10250-4	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 -

1. 著者名 Saito R, Shoda K, Maruyama S, Yamamoto A, Takiguchi K, Furuya S, Hosomura N, Akaike H, Kawaguchi Y, Amemiya H, Kawaida H, Sudo M, Inoue S, Kono H, Suzuki-Inoue K, Ichikawa D.	4. 巻 124
2. 論文標題 Platelets enhance malignant behaviours of gastric cancer cells via direct contacts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 570-573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-01134-7.	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 -

1. 著者名 Takiguchi K, Shoda K, Nakayama T, Takahashi K, Saito R, Yamamoto A, Furuya S, Akaike H, Hosomura N, Kawaguchi Y, Amemiya H, Kawaida H, Inoue S, Kono H, Konishi H, Otsuji E, Ichikawa D.	4. 巻 47
2. 論文標題 Soluble podoplanin as a biomarker in diffuse type gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 51-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2022.8262.	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齊藤 亮, 庄田 勝俊, 古屋 信二, 仲山 孝, 赤池 英憲, 河口 賀彦, 雨宮 秀武, 川井田 博充, 河野 寛, 市川 大輔
2. 発表標題 スキルス胃癌の制圧に向けての進歩 血小板に着目した胃癌術後腹膜播種再発 新規治療標的の開発と臨床応用を目指して
3. 学会等名 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齊藤 亮, 庄田 勝俊, 丸山 傑, 赤池 英憲, 河口 賀彦, 山本 淳史, 滝口 光一, 古屋 信二, 細村 直弘, 雨宮 秀武, 川井田 博充, 須藤 誠, 井上 慎吾, 河野 寛, 市川 大輔
2. 発表標題 胃癌進展における血小板の役割
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齊藤亮, 庄田勝俊, 丸山傑, 山本淳史, 滝口光一, 芦沢直樹, 中山裕子, 古屋信二, 市川大輔
2. 発表標題 癌進展における血小板の役割
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 齊藤 亮, 庄田 勝俊, 丸山 傑, 山本 淳史, 滝口 光一, 古屋 信二, 赤池 英憲, 細村 直弘, 河口 賀彦, 雨宮 秀武, 川井田 博充, 須藤 誠, 井上 慎吾, 河野 寛, 市川 大輔
2. 発表標題 胃癌進展における血小板の役割
3. 学会等名 第31回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 滝口光一, 庄田勝俊, 古屋信二, 仲山孝, 高橋和徳, 山本淳史, 齊藤亮, 白石謙介, 赤池英憲, 細村直弘, 河口賀彦, 雨宮秀武, 川井田博充, 河野寛, 大辻英吾, 市川大輔
2. 発表標題 胃癌細胞に対する可溶性Podoplaninの作用機序の解析
3. 学会等名 JDDW2022
4. 発表年 2022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
研究分担者	河口 賀彦  (Kawaguchi Yoshihiko)  (80402048)	山梨大学・大学院総合研究部・講師   (13501)	
研究分担者	赤池 英憲  (Akaike Hidenori)  (00402032)	山梨大学・大学院総合研究部・助教   (13501)	
研究分担者	古屋 信二  (Shinji Furuya)  (80622381)	山梨大学・大学院総合研究部・助教   (13501)	
研究分担者	庄田 勝俊  (Shoda Katsutoshi)  (70783421)	山梨大学・大学院総合研究部・助教   (13501)	

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
---------	---------