

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591709

研究課題名（和文） ヒト胃癌細胞の転移形式別にみた特異的転移関連因子の解析

研究課題名（英文） Analysis on factors relating metastasis in human gastric cancer cell line focusing on the metastasis patterns

研究代表者

木村 康利 (KIMURA YASUTOSHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80311893

研究成果の概要（和文）：低転移性のヒト胃癌細胞株をマウス胃壁に接種する細胞注入法を用い同所性移植を施行、これを繰り返すことでリンパ節転移、肝転移巣、腹膜播種を選択的に引き起こす細胞株を各々樹立した。同様に、ヒト膵癌の高肝転移株を樹立した。様々な転移阻害物質による転移阻害実験、血管新生因子産生量の解析、各種転移関連遺伝子の発現解析をおこなった。

現在のところ、胃癌細胞の肝転移促進にはエンドセリンの関与が、リンパ節転移には VEGF-C の関与が、また、膵がん細胞の肝転移形成には、osteopontin の発現亢進が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanisms of cancer metastasis, we established highly lymphatic, liver metastatic and peritoneal disseminated models in nude mice, and then characterized several factors related to metastasis in these cells. We investigated several biological properties and mRNA levels of differentially-expressed genes involved in cancer metastasis by cDNA macroarray. We also conducted the availability of metastasis inhibition substances and the relation between metastatic potential and angiogenesis factors. To date, *Endothelin* expression level in gastric cancer cell line might contribute to the liver metastasis and *VEGF-C* to the lymphatic metastasis. *Osteopontin* might also contribute to the liver metastasis in pancreatic cancer cell line.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃十二指腸外科学、胃がん、膵癌、同所性移植モデル、肝転移、リンパ節転移、腹膜播種

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における胃癌による死亡者数は、年間約 30 万人とされる癌死亡者数の部位別死

亡者数において、現在もなお第 2 位となっている。年齢調整罹患率についても、地域がん登録資料からの推計によりその死亡者数の

低下は確かであるが、年齢調整死亡率ほど顕著ではなく、現在でも胃癌は日常診療においてもっとも多く遭遇する癌である。性別にみても胃癌による死亡者数は男性では肺癌に次いで第2位、女性においても大腸癌に次いで第2位、人口10万人あたりの胃癌死亡率は中国に次いで第2位であり、依然として胃癌大国としての国民性を物語るものであろう。

(2) 胃癌の外科治療成績は著しく向上している。これは早期胃癌発見機会の増加と進行癌に対する広範リンパ節郭清、そして抗癌化学療法などによる集学的治療の進歩によるところが大きい。一方、根治切除可能である胃癌患者における最大の予後規定因子は、リンパ節転移と腹膜転移である。しかし、診断時に既に広範なリンパ節転移、腹膜転移、そして肝・肺・骨髄などに転移を認める症例や術後再発症例においては、外科治療の適応外となることも多く、化学療法や放射線治療、免疫療法などのいわゆる補助療法に期待するのが現状であり、その治療成績は満足すべきものではない。

(3) 転移現象は癌細胞の原発巣からの離脱、周辺組織浸潤、遠隔転移巣の形成に至るまでの複雑な反応カスケードから成り立つものである。1973年、Isaiah Fidlerによる経尾静脈モデルによりマウス B16 メラノーマ細胞の肺選択的転移性株樹立以来、癌転移現象を細胞レベルで研究することが可能となった。転移はランダムに起こるものではなく、絶えざる遺伝子変化を伴い不均一な癌細胞集団から転移に好都合な細胞形質(増殖能、薬剤感受性、免疫原性、浸潤能、形態など)を獲得し、さらには宿主の淘汰圧から逃れ首尾良くこれらの過程を突破した少数の癌細胞によって形成される。それら転移における各段階において、がん細胞側と宿主側の相互関係によりがんの転移性、臓器選択性が決定される。これらの段階を再現し評価するいくつかの実験モデルを使い分けて用いることにより、新規薬剤の開発、詳細な浸潤・転移のメカニズムの解析、転移に関連する新規分子や遺伝子の探索・同定、あるいは更なる優れた実験モデルの開発等に役立てることが出来るものである。

(4) 近年、癌転移の分子生物学的・遺伝子学的検討により、前述のカスケードのなかで、複雑に絡み合いつつ生じる数々の現象の転移形式別解明が進んでいる。転移実験モデルによる癌転移研究の急速な進展において、腫瘍細胞や腫瘍組織を本来の発生臓器に移植する同所性移植モデルの開発は、移植癌細胞が単に存在すべき場で増殖促進が図られることにとどまらない。自然発生癌に類似した微小環境が提供されると考えられるとともに、転移臓器組織との相互関係を評価すること

に適しているものと考えられる。このモデルを用いることは、各種の転移形式別の癌転移研究関連因子を解析するうえで、重要な役割を担うものであることに相違ない。これまで我々は、同一の共通する胃癌細胞株(親株)から転移形式別の高転移性株を樹立してきた。本研究では同一のヒト胃癌細胞株から樹立した肝高転移モデルとリンパ節高転移モデル、そして高腹膜播種株を用いて、それらに関与する因子、遺伝子を同定し、それらの発現・機能を明らかにするとともに、それらを転移形式別抑制・制御を検討し、ヒト胃癌外科治療における臨床応用の可能性を探索するものである。

2. 研究の目的

これまで、胃癌における転移形式別の転移形成に関与する分子機構については、それぞれ単一の分子による検討が行われてきた。それらの検討は細胞株が異なると必ずしも転移に強い影響を与えないこともあった。そこで、単一の細胞株から転移形式別の転移関連因子あるいは遺伝子を独立して選定することが可能であれば、各々の転移形式特有の転移を決定づける因子あるいは遺伝子となりうる可能性があるものと想定される。そこで、胃癌細胞株 AZ521 を親株として、*in vivo* のセクションにより高肝転移株、高リンパ節転移株、高腹膜播種株を作成し、転移形式別の関連因子を特定することを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) Fidler らの方法に準じて、低分化型腺癌であるヒト胃癌細胞株 AZ521 $5 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$ をマウス胃壁に接種する細胞注入法を用い同所性移植を施行し、6週目に犠牲死せしめ腹腔内の肝転移巣、リンパ節転移巣から癌細胞を培養し、転移能を有する癌細胞を培養する。腹膜播種については、AZ521 を腹腔内投与し、*in-vivo* のセクションをかける。本研究では、すでに低転移性ヒト胃癌細胞株である AZ521 を本来の発生臓器である胃に移植する同所性移植モデルにより、高肝転移株、高リンパ節転移細胞株を樹立している。また、腹腔内投与により高腹膜播種株を樹立している。3系統の転移株ともに継代を重ねるに伴いそれぞれリンパ節、肝への転移率の上昇を認め、転移形式別の有意な転移能を示した。病理組織学的には medullary growth であった。この組織型を示す胃癌は元来肝転移しやすい特性を持つとして知られているが、AZL5G はリンパ節転移有意の転移能を示した最初のヒト胃癌同所性転移株と考えられる。

(2) 同様の手法を用いて、腺癌細胞株 HPC-3 を親株とする高肝転移株 HPC3H4 を樹立し、実験に供した。

(3) 遺伝子発現解析と転移関連分子の同定
樹立した高転移株と親株の遺伝子プロファイリングの差異を cDNA マイクロアレイにより解析する。

(4) 上記(3)で得られた分子発現結果から、入手可能な転移阻害物質候補を抽出し、転移阻止実験を行う。

4. 研究成果

(1) 胃癌細胞株における転移関連遺伝子発現 AZ521 を親株とし、in-vivo selection を経て樹立された高肝転移株 AZ-H5c、高リンパ節転移株 AZ-L5G、高腹膜転移 AZ-P7a を得た。親株に対するこれらの遺伝子発現解析の結果、AZ-H5c では Endothelin-A receptor、RNA polymerase II、Human VEGF-related protein の発現亢進が確認された。AZ-P7a においては、Endothelin-A receptor、Insulin-like growth factor-binding protein-3、NGFI-B/nur77 β -type transcription factor homolog が、また、AZ-L5G においては、Endothelin-A receptor、NGFI-B/nur77 β -type transcription factor、TGF β -IIR α の発現が更新していた。

(2) 膀胱癌細胞株における転移関連遺伝子発現 HPC-3 を親株とする高肝転移株 HPC3-H4、高腹膜転移株 HPC-3P5a を得た。親株に対するこれらの遺伝子発現解析の結果、HPC3-H5 では metallothionein、Rab 3、Integrin beta1 (CD29) を含む 22 遺伝子の発現亢進と、BID、GADD153、KKIALRE を含む 44 遺伝子の発現減弱が確認された。HPC-3P5a においては、Gelsolin、BLCAM (CD22)、VHL などの 9 遺伝子の発現亢進と BAI1、PI3 kinase p110 β 、FBN-1 を含む 28 遺伝子の発現減弱が確認された。

(3) Endothelin-A receptor の選択的阻害薬である YM598 を用いた転移阻止実験を行った。ヌードマウスを用いた in-vivo の実験では、YM598 (0.5-10.0mg/kg) は AZ-H5c の発育を有意に減少させた。また、YM598 の投与により、AZ-H5c の同所性異色モデルにおける肝転移形成率は有意に低下した (control 83.3%、YM598 1mg/kg 16.7%、10mg/kg 20%、1mg/kg 16.7%)。

(4) VEGF-C 遺伝子の外来性導入による転移能上昇

AZ-521 と AZ-L5G の遺伝子発現解析の途上において、AZ-L5G における VEGF-C の発現上昇が確認されたことから、VEGF-C 強制発現ベクターを開発し、低転移性の AZ521 に遺伝子導入した (AZ-VEGFC)。AZ-VEGFC は細胞増殖能において AZ521 と差を認めなかったものの、同所性移植によるリンパ節転移能が有意に上昇した。

(5) 膀胱癌細胞株を用いた転移阻止実験

Osteopontin (OPN) の RNA interference (RNAi、miOPN) と anti-OPN antibody (OPN-Ab)

を用い、HPC-3H4 の肝転移阻止実験を行った。HPC-3H4/miOPN は肝転移率が 25%であったのに対し、コントロールあるいは無処置群は 100%であり、miOPN は HPC-3H4 の脾静脈注射による肝転移を有意に減少させた。また、OPN-Ab の投与による肝転移減少率は 50%であった。

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 5 件)

① 信岡隆幸、原田敬介、木村康利、他. 【Stage IV 胃癌治療への挑戦】 Stage IV 胃癌に対する積極的化学療法後の胃切除の安全性. 消化器外科 2011; 34: 559-567、査読なし、掲載論文の DOI なし

② 平田公一、信岡隆幸. 【アトラスで学ぶ達人の手術】 胃・十二指腸の手術 噴門側胃切除空腸囊間置術. 消化器外科 2011; 34: 728-736、査読なし、掲載論文の DOI なし

③ 古畑智久、平田公一、他. 外科と化学療法 大腸癌肝転移の治療. 北海道外科雑誌 2011; 56: 20-25、査読あり、掲載論文の DOI なし

④ 野村裕紀、平田公一、他. PET/CT が有用であった胃 GIST 併存サルコイドーシスの 1 例. 日本臨床外科学会雑誌 2011; 72: 3050-3055、査読あり、掲載論文の DOI なし

⑤ Ohno K、Kimura Y、Hirata K. et al. Inhibition of osteopontin reduces liver metastasis of human pancreatic cancer xenografts injected into the spleen in a mouse model. Surgery Today 2010; 40: 347-356 (DOI 10.1007/s00595-009-4082-x)、査読あり

[学会発表] (計 8 件)

① 信岡隆幸、原田敬介、木村康利、他. 胃癌に対する化学療法の新展開 切除可能高度進行胃癌症例に対する術前 Docetaxel+CDDP+S-1 療法. 第 73 回日本臨床外科学会総会 2011.11.17, 東京

② 原田敬介、信岡隆幸、木村康利、他. 進行胃癌に対する術前 Docetaxel/CDDP/S-1 (DCS) 療法の治療成績. 第 111 回日本外科学会定期学術集会 震災により誌上開催

③ 信岡隆幸、原田敬介、木村康利、他. Stage IV 胃癌に対する Docetaxel/CDDP/S-1 (DCS) 療法後 adjuvant surgery の有用性. 第 111 回日本外科学会定期学術集会 震災により誌上開催

④ 信岡隆幸、原田敬介、木村康利、他. がん治療患者に対する栄養療法: 治療完遂をめざした新しい栄養療法 高度進行胃癌術前化学療法症例に対する 3 剤併用化学療法の消化器毒性とその対策. 日本外科代謝栄養学

会第 48 回学術集会 2011.7.7, 名古屋

⑤ 信岡隆幸, 原田 敬介, 木村康利, 他. Docetaxel+CDDP+S-1 療法による胃癌術前補助化学療法 切除不能症例治療経験を切除可能高度進行症例へ. 第 66 回日本消化器外科学会総会 2011.7.14, 名古屋

⑥ 佐藤康史, 信岡隆幸, 平田公一, 他. 切除可能進行胃癌に対する Docetaxel+Cisplatin+S-1 (DCS) 術前化学療法第 II 相試験. 第 49 回日本癌治療学会学術集会 2011.10.27, 名古屋

⑦ 原田 敬介, 信岡隆幸, 木村康利, ほか. 大動脈周囲リンパ節転移陽性胃癌に対する術前 Docetaxel/CDDP/S-1 (DCS) 療法の治療成績. 第 65 回日本消化器外科学会. 2010.7-14-16, 下関

⑧ 原田 敬介, 信岡隆幸, 木村康利, ほか. Docetaxel+CDDP+S-1 (DCS) 療法が著効した骨転移を伴う高度進行胃癌の 1 例. 第 47 回日本癌治療学会学術集会. 2009.10.22-24, 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 康利 (KIMURA YASUTOSHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80311893

(2) 研究分担者

平田 公一 (HIRATA KOICHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50136959

水口 徹 (MIZUGUCHI TORU)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 30347174

信岡 隆幸

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50404603

原田 敬介

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00560004

(3) 連携研究者

()

研究者番号: