

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890191

研究課題名（和文）テーラメイド医療への展開を視野に入れたマウス癌性腹膜炎モデルの開発

研究課題名（英文） Establishment of mouse model of carcinomatous peritonitis for tailor maid cancer therapy.

研究代表者 金高 賢悟 (KANETAKA KENGO)

長崎大学・病院・助教

研究者番号：10549570

研究成果の概要（和文）：胃癌における癌幹細胞マーカーCD44発現と癌性腹膜炎をはじめとした臨床病理学的因子との検討

臨床検体における検討にて癌幹細胞マーカーであるCD44およびCD133の発現が胃癌の癌性腹膜炎の発症との関連を検討した。免疫染色と臨床データによる検討の結果では、癌性腹膜炎の発症と積極的に関与するとの知見は得られなかった。しかし少なくともこれらのマーカーの発現が陽性である症例では生存率が悪い傾向があるため、癌の進展に何らかの役割が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cancer stem cell marker CD44 expression in T3/4 gastric cancer.

We investigated the correlation between expression of CD44 and clinicopathological factors such as carcinomatous peritonitis in patients with advanced T3/4 gastric adenocarcinoma. Present study did not show any correlation between the expression of CD44, known cancer stem cell marker, and clinicopathological factors. However, even among patients with advanced (T3-4) gastric adenocarcinoma, CD44 positive group showed poorer prognosis than CD44 negative one. These results suggested that CD44, putative cancer stem cell marker, might be involved in tumor progression, although the precise mechanism remains to be elucidated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	930,000	279,000	1209,000
2010年度	840,000	252,000	1092,000
年度			
年度			
年度			
総計	1770,000	531,000	2301,000

研究分野：消化器癌

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：胃癌、癌性腹膜炎、動物モデル

1. 研究開始当初の背景

胃癌の死亡率は近年減少傾向にあるが、

未だ日本人に多い癌の一つである。早期胃癌に関しては適切な治療による治癒率も高く、また内視鏡的粘膜剥離術や、縮小手術としての腹腔鏡下胃切除術など、治療法の発展もめざましい。しかし、依然として約半数の症例が進行癌として発見され、治癒的切除によっても、少なからぬ症例がリンパ節転移や癌性腹膜炎として再発し、その予後は極めて不良である。このような再発胃癌の治療として有望な抗癌剤治療として TS1/CDDP 併用療法が広く行われているが、その奏功率は未だ満足出来るものではない。

一方、固形癌に対する抗癌剤に変わる薬物として、癌特異的抗体などの分子生物学的製剤の臨床応用が進んでおり、乳癌におけるハーセプチン、GIST に対するグリベック、大腸癌に対するアバシチンなどが例としてあげられるが、胃癌に対しては効果のある分子生物学的製剤が明らかでない。従って胃癌の癌性腹膜炎に対する有効な治療法を確立するためには、その成立機序の解明が必要である。

癌性腹膜炎の成立には、1) 癌細胞の腹腔内への露出、2) 原発巣からの癌細胞の遊離、3) 腹腔内での癌細胞の生存、4) 腹膜への癌細胞の生着 などの種々のステップが必要である。これまでの病理組織検索の結果によると、胃癌の腹膜への露出（ステップ 1）が癌性腹膜炎の大きなリスクであることは疑いの余地がないが、病理学的に漿膜面への露出を認めたにも関わらず、必ずしも癌性腹膜炎に至らない症例は臨床的に経験するところである。また、成立した癌性腹膜炎がにおいても 1) 結節型、2) 小結節型、3) びまん浸潤型、4) 浸潤硬化型など形態は多彩であり、症例ごとの腹腔内増殖形式の差が示唆される。特に癌性腹膜

炎成立の初期段階において癌細胞は血管からの栄養補給なく腹腔内にて生存しなければならず、低酸素などのストレス環境下での生存能力が癌性腹膜炎の成立に重要ではないかと考えられる。

このような環境下での生存に関与する遺伝子として、HIF-1 関連遺伝子、VEGF 遺伝子が知られている。これらは低酸素時に発現し、腫瘍の血行維持に重要な働きをもつ遺伝子であり、胃癌でもその発現が報告されているが、手術的に得ることができない腹膜転移巣での検索は困難であり、癌性腹膜炎の成立過程での発現の有無は不明である。

2. 研究の目的

我々は、胃癌細胞の腹腔内における進展形式と、ストレス環境下での生存能力に関連があるのではと考え、実際に手術にて切除された臨床検体より採取された臨床的胃癌細胞を用いて、これを免疫不全マウス腹腔内へと移植するマウス癌性腹膜炎モデルを作成することにより、種々の段階の腹膜播種転移巣による HIF-1 関連遺伝子などの発現の検索が可能であると考えた。加えて、このマウスモデルは各々の症例について、より臨床状態に近い癌性腹膜炎モデルとなる可能性があり、マウスでの結果と、切除胃の病理組織学的所見や術後の臨床経過と比較することにより、癌性腹膜炎の発症機序のさらなる解明が可能であると考えられる。

3. 研究の方法

当初の予定より適格症例が少なかったこと、および近年、癌の転移などにも関わると考えられる cancer stem cell の研究において同様の animal model が確立されつつあるため、これらの手技を応用することとし、若干の改変を加えた。

漿膜への浸潤が疑われる胃癌症例より、胃摘出後早期に新鮮組織標本を採取し、しかるべき処理の後、免疫不全マウス腹腔内へ同所性に移植し、癌性腹膜炎成立の経時的観察と、得られた腹腔内腫瘍を用いた発現解析を行う。一方で、予後の明らかな胃癌症例での切除標本を用いて、cancer stem cell marker の発現の解析と癌性腹膜炎を含めた臨床病理学的因子との解析を行う。これらの結果と、臨床病理学的因子との関連について検討する。

対象

術前診断によって肉眼的に漿膜浸潤が疑われた進行胃癌患者のうち、手術前に本研究に関する十分なインフォームド・コンセントを行った上で承諾の得られた症例を対象とする。期間は平成21年4月から2年間とする。

検討1.

- 1) 胃切除後に切除標本にて主病変を観察した後、病理組織学的検索に支障を来さない範囲にて胃癌組織片 2mm³ を3片程度採取。
- 2) 採取した組織片は清潔操作にてマウス移植までの2-4時間の間、培養液にて維持。
- 3) 造腫瘍性を確認するために、5-6 齢週の免疫不全マウスの胃壁へと縫縮する。1つのグループに対し5匹のマウスを使用する。
- 4) 移植後、1週間に2度程度の間隔にてマウスを観察、状態の悪化を一つの目安とし、犠牲死させ、腹腔内を観察。腹腔内腫瘍の数、大きさを記録するとともに病理組織学的検索を行う。病理組織学的な検索は、HIF-1 や VEGF などに対する抗体を用いた免疫組織学的検索を含む。尚、腹腔内腫瘍が形成されない場合も一つの所見として記録す

る。

検討2.

2001年より2006年において当科にて切除された胃癌症例の標本を用いて、胃癌の stemness marker として報告されている CD44、CD133 の発現と、臨床病理学的因子との関連を検討する。検討1において作成された癌性腹膜炎マウスモデルにおいて、CD44 などの stemness marker の発現を検討する。

4. 研究成果

検討1. 癌性腹膜炎モデルの確立

当初の予定よりも適格症例が少なく、結果的に以下の3症例4病変より新鮮標本を得、高度免疫不全マウスである NOD/SCID マウス胃壁内へと移植を行った。



表

症例	深達度	分化度	進行度
76 M	pT4a (SE)	低分化	StageIIIB
69 M	pT3 (SS)	高分化	StageIIIA
	pT2 (MP)	高分化	
55 F	pT4a (SE)	低分化	StageIIIC

それぞれの群において麻酔や手術の影響にて術後短期にて2-3匹を失った。Cancer stem cell の研究においては移植後4-6ヶ月にて造腫瘍性が確認される。現在移植後3-4ヶ月経過を観察しているが、moribund

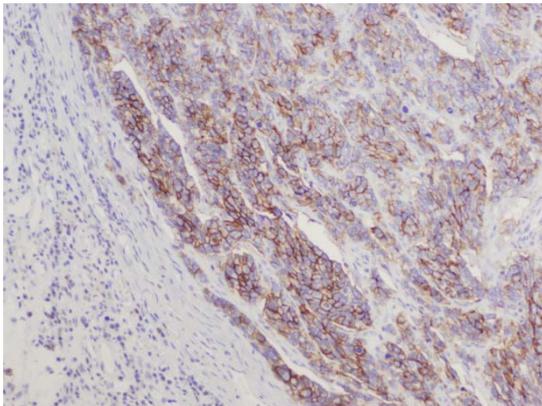
となった mouse はなく、いましばらくの観察が必要と考える。

検討 2. 胃癌切除臨床検体を用いた stemness marker の発現と臨床病理学的因子との関連

当科において 2001 年～2006 年の 5 年間に手術を施行した癌性腹膜炎の発症の高リスクと考えられる T3-4 胃癌（漿膜下～漿膜外、隣接臓器浸潤癌）、89 例を対象とした。これまでの報告を踏まえ CD44 は腫瘍最大断面にて 5%以上の癌細胞にて細胞膜への染色を認めた症例を染色陽性とした。CD133 は同様に 1%以上にて染色を認めた症例を陽性と判定した。

これらの症例のうち、約 42%が CD44 染色陽性であった。CD133 に関しては約 10%に染色を認めた。

図)CD44 発現



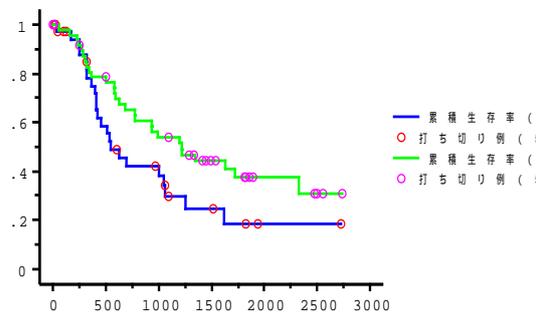
腫瘍径、深達度、組織型、リンパ管侵襲、脈管侵襲、リンパ節転移度など臨床病理学的因子、および当科における検討にて癌性腹膜炎との関連が示唆される腹水中 CEA 値との関連（投稿準備中）を検討した。発現と生存期間を Kaplan-Meier 法にて検討し、Logrank test にて検定した。

表：CD44 の発現と臨床病理学的因子

	>5%	5%>	
年齢(yr)	67.8	67.0	n. s.
腫瘍径(mm)	62.1	63.8	n. s.

分化度			n. s.
高	16	20	
低	23	30	
深達度			n. s.
T3(SS)	14	26	
T4a(SE)	21	23	
T4b(SI)	4	1	
脈管侵襲			P=0.046
低	9	22	
高	30	28	
リンパ節転移			n. s.
低	21	33	
高	17	16	
血清 CEA (μg)	8.9	6.0	n. s.
腹水 CEA (μg)	1308	1136	n. s.

グラフ：CD44 発現と生存曲線(p=0.06)

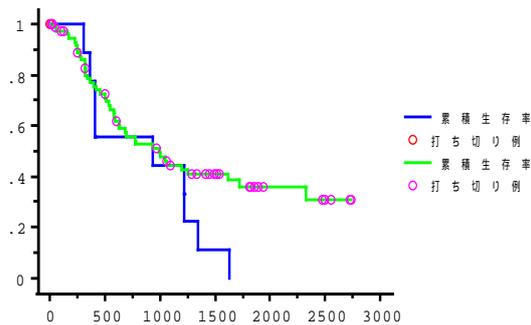


表：CD133 の発現と臨床病理学的因子

	+	-	
年齢(yr)	70.4	67.0	n. s.
分化度			n. s.
高	4	32	
低	6	47	
深達度			n. s.
T3(SS)	4	36	
T4a(SE)	6	5	
T4b(SI)	0	38	
リンパ管侵襲			P=0.05

リンパ節転移	低	0	32	
	高	10	54	
	低	5	49	n. s.
	高	5	28	
血清 CEA (μ g)		6.38	7.42	n. s.
腹水 CEA (μ g)		1038	1229	n. s.

グラフ：CD133 発現と生存曲線 (p=0.12)



結語

1. 4 症例より得た胃癌組織をそれぞれ 5 匹の高度免疫不全マウスへと移植を行った。移植後 3 ヶ月経過した時点での観察では未だ移植片が生着した様子はないため引き続きの観察を行う予定である。

2. 臨床検体における検討にて癌幹細胞マーカーである CD44 および CD133 の発現が胃癌の癌性腹膜炎の発症に積極的に関与するとの知見は得られなかった。しかし少なくともこれらのマーカーの発現が陽性である症例では生存率が悪い傾向があるため、癌の進展に何らかの役割が示唆された。今後、マウス癌性腹膜炎モデルの確立など更なる解析が必要だと考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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
金高 賢悟 (KANETAKA KENGO)
長崎大学・病院・助教
研究者番号：10549570

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：