

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15965

研究課題名(和文) 印環細胞型胃癌の内皮細胞依存的スキルス性獲得メカニズムの解析と標的治療

研究課題名(英文) Analysis of the endothelial cell-dependent mechanism under scirrhous gastric cancer development

研究代表者

畑 昌宏 (Hata, Masahiro)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：90892505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では独自のスキルス胃癌マウスモデルを用いて、同腫瘍細胞に特徴的なCD38・LRG1発現上昇による血管新生・線維化亢進の機序を解析した。遺伝子発現解析により、胃腫瘍内ではLRG1の受容体であるCD105陽性血管内皮細胞と腫瘍関連線維芽細胞が協調して血管新生・線維化・炎症を誘導し、腫瘍免疫微小環境を形成することが判明した。また、線維芽細胞の寄与に関しては、CD38抗体治療により一部抑制されることを示した。さらに、遺伝子改変オルガノイドのリン酸化プロテオーム解析によりPak遺伝子を同定し、PAK阻害剤は胃癌細胞のCD38・LRG1蛋白発現を低下させ、その抗腫瘍性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は極めて予後不良であるスキルス胃癌の性質の解明と新規治療薬の発見を目的としたものである。今回の解析により、スキルス胃癌の特徴である血管新生(異常血管の増加)と線維化(硬化)が、遺伝子変異を有する腫瘍細胞の発する分子によって増強されていることが示された。その分子の阻害によって胃癌進行を抑えることがマウスモデルでは示されており、今後も同分子の機能解析を続けることで、胃癌治療の進歩の一助となる可能性がある。また、リン酸化プロテオーム解析という別の手法により、上記と異なる治療標的になり得る遺伝子を特定しており、胃癌治療の更なる発展への貢献に繋がることを期待している。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism of angiogenesis and fibrosis exacerbation due to specific CD38 and LRG1 expression in tumor cells of our unique scirrhous gastric cancer mouse model. Through gene expression analysis, it was revealed that CD105-positive vascular endothelial cells, which are a receptor for LRG1, and cancer-associated fibroblasts induced the upregulation of angiogenesis, fibrosis, and inflammation in a coordinated manner. Therefore, tumor-specific molecules seemed to contribute to the formation of tumor immune microenvironment with tumor-stroma interaction. CD38 antibody treatment suppressed a part of fibroblast genetic changes and functions in gastric cancer. Moreover, we found that Pak gene could be associated with scirrhous gastric cancer through phosphoproteomics of organoids. PAK inhibitor decreased the expression of both CD38 and LRG1 in tumor organoids, suggesting its potential as a novel therapeutic agent.

研究分野：胃癌

キーワード：スキルス胃癌 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

消化器癌、特に胃癌は我が国の癌死亡の上位を占める罹患率・死亡率の高い疾患である。胃癌の中でも特に予後不良かつ患者の QOL を低下させるのが、いわゆるスキルス胃癌を含む浸潤型の胃癌である。スキルス型胃癌では、癌細胞がびまん性に胃壁内を浸潤し、早期に腹膜播種をはじめとした全身への転移をきたすとともに、胃内拡張不良による経口摂取不良による悪液質、QOL 低下が患者を苦しめている。胃癌研究に応用可能なマウス胃癌モデルとしては、Helicobacter 感染や発癌剤 MNU の経口投与、およびヒト胃癌の全遺伝子解析の結果(Nature, 2015)をもとにした Kras, Apc, p53 などの遺伝子変異を組み合わせたモデルが用いられてきたが、それらのモデルにおいて、癌は粘膜内にとどまり、ヒトの進行胃癌で見られるような浸潤性や致死性は認められていなかったため、炎症や線維化を伴いながら粘膜下へ深く浸潤するヒトスキルス胃癌を模したマウスモデルの出現が必要と考えられていた。さらに、近年 HER2 及び VEGFR を標的とした分子標的治療や、PD-L1 などを標的とした抗腫瘍免疫治療が胃癌にも用いられるようになったが、特に印環細胞癌型胃癌に対しては奏功しないことがわかった。すなわち、「胃癌の著しいスキルス性や治療抵抗性が生じるメカニズムは何故か？」という疑問は長年解明されず、印環細胞型胃癌の新規治療の発展が依然として望まれる状況が続いている。

2. 研究の目的

印環細胞型胃癌のスキルス性や既存の治療に対する治療抵抗性のメカニズムを解明するとともに患者の QOL 改善、生命予後延長に直結する新規治療薬の開発を行う。

3. 研究の方法

我々は独自に保有する胃上皮特異的標識マウス (Tff1-Cre, J Pathol 2019) と、Cre 依存的遺伝子改変マウスを組み合わせ、印環細胞型スキルス性胃癌を模倣する致死的なマウスモデルの樹立に成功した。このマウスはヒトのスキルス胃癌で高頻度に見られる 3 種の遺伝子変異を有し、その表現型も印環細胞型癌細胞が粘膜下・筋層浸潤を生後 3 週からきたし、食餌摂取不良・他臓器直接浸潤をきたして生後 8 週までに癌死に至るといふ、極めてヒトスキルス胃癌に類似した経過を辿るモデルである。本マウス腫瘍の浸潤病変部位では著明な線維芽細胞の増生と血管新生が生じており、ヒトのスキルス胃癌と極めて類似した病理像を呈していた。これまでに、本マウス腫瘍組織、および腫瘍から樹立したオルガノイドの網羅的遺伝子発現解析を完了しており、スキルス胃癌マウス腫瘍組織での線維化・血管新生誘導遺伝子群の発現上昇を確認し、その中から腫瘍オルガノイドで特異的に上昇している血管新生誘導因子である LRG1・CD38 を特定した。実際、腫瘍組織より単離した血管内皮細胞では、LRG1・CD38 と結合する CD105・CD31 の異常高発現を認め、同マウスモデルにおいてこれらの因子を特異的中和抗体により阻害することにより、血管新生の抑制のみならず、線維芽細胞・免疫細胞の浸潤抑制を認め、さらに腫瘍細胞の粘膜下浸潤も抑制した。LRG1・CD38 を治療標的とすることにより、内皮細胞の増殖・活性化を抑制し、そのことが浸潤性胃癌組織全体のスキルス性を抑制し、生命予後の延長につながると考えたため、LRG1・CD38 が印環細胞型胃癌で高発現するメカニズムと、これらの阻害により腫瘍内内皮細胞を含めた腫瘍微小環境全体に与える影響を網羅的に解析するための研究計画を立案した。

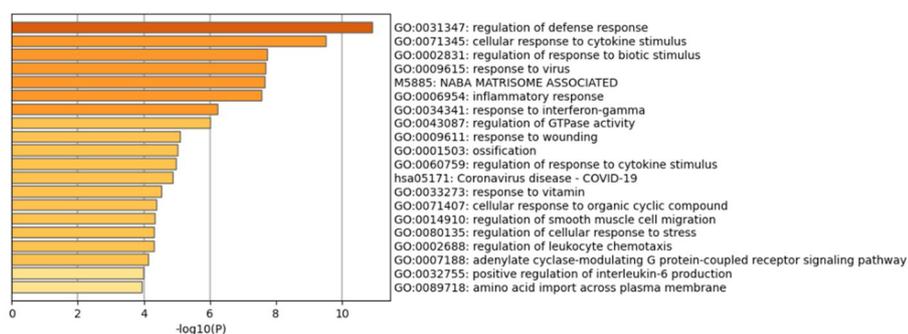
計画 LRG1・CD38 標的の内皮細胞阻害が胃癌組織中遺伝子プロファイルに与える影響

LRG1・CD38 標的治療前後の腫瘍組織をコラゲナーゼ処理して単一細胞へと消化し、シングルセル RNA シークエンスを含めた網羅的遺伝子解析を施行することによって、腫瘍内の各種細胞群が内皮細胞依存的にスキルス性を獲得する分子メカニズムを明らかにする。腫瘍内の免疫プロファイルを把握するため、FACS/CytoF を用いた検討を行い、内皮細胞治療前後の腫瘍免疫プロファイリングを行う。これらの解析で内皮・腫瘍・免疫・線維芽細胞間の相互作用を制御する因子と考えられるものに関しては、腫瘍オルガノイドと線維芽細胞・内皮細胞・免疫細胞との共培養を行い、細胞分画間の相互作用を *in vitro* で解析する。具体的には、スキルス胃癌マウスに対し抗 LRG1・CD38 特異的抗体を 2 週間にわたり週 3 回投与し、腫瘍組織から単離した細胞群から抽出した RNA を用いて RNA 解析を行う。コントロール群として非特異的 IgG 抗体を同様に投与したマウスを用いる。RNA sequence 解析は腫瘍内の全細胞をアプライ可能なシングルセル RNA sequence と、FACS によって選択的に単離した腫瘍細胞・免疫細胞・内皮細胞・線維芽細胞の Bulk RNA sequence を組み合わせる。FACS にて単離した各細胞分画は *in vitro* の共培養系にも使用する。免疫細胞の詳細な分画解析には FACS・CyTOF による免疫プロファイルを行う。これにより、LRG1・CD38 依存的な内皮細胞活性化を抑制することによる抗腫瘍効果の機序を明らかにする。

計画 内皮細胞標的治療効果を増強する追加治療標的の探索

スキルス胃癌マウスの腫瘍細胞でなぜ LRG1・CD38 が高発現するのかを解析し、内皮細胞活性化を生じさせるこれらの因子そのものの誘導抑制が可能かを検討する。p53 +Cdh1 +Tgfb2(PTC) 変異腫瘍細胞において、p53 +Cdh1 (PC) のみの腫瘍細胞と比較して LRG1・CD38 の発現が著明に上昇している。このメカニズムを解明するため、正常・PC・PTC 腫瘍オルガノイドより抽出したタンパク質の Kinase array およびリン酸化プロテオーム解析を施行し、PTC 腫瘍オルガノイド

に特異的な活性化 pathway を同定する。その上で、東京大学薬学部創薬機構の化合物ライブラリーを用いて当該 pathway を阻害する薬剤を screening し、LRG1・CD38 の発現低下について検討を行う。In vitro で確認された化合物に関しては Tff1-PTC マウスに投与し、腫瘍組織中の LRG1・CD38 発現量および腫瘍進展抑制効果の検討を行う。これにより、スキルス胃癌における LRG1・CD38 発現制御機構を明らかにする。



4. 研究成果

第一に「LRG1・CD38 標的的内皮細胞阻害が胃癌組織中遺伝子プロファイルに与える影響」について報告する。計画当初はスキルス型胃癌マウスモデルである *Tff1*^{Cre}; *p53*^{R172H}; *Tgfbr2*^{F/F}; *Cdh1*^{F/F} (T1-PTC) マウス胃腫瘍の single cell RNA sequence(seq)を予定していたが、腫瘍組織の線維化の強さから完全な単一細胞化は施行困難と判断し、代替策として FACS を用いた Bulk RNA seq による解析を行った。T1-PTC マウスの胃腫瘍組織から FACS 手技を用いて CD105 陽性血管

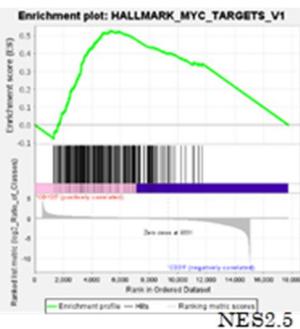
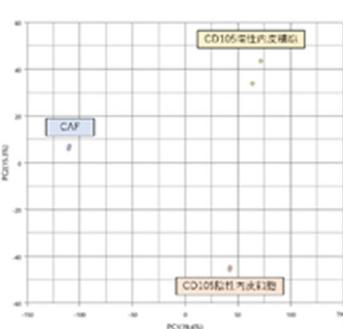


図 1 主成分分析

図 2 CD105 陽性内皮細胞 GSEA

内皮細胞(EC)・CD105 陰性 EC・線維芽細胞(CAF)を回収し、各々の Bulk RNA seq を施行した。まず主成分分析を行い、各分画・サンプルの相関を確認した(図 1)。次に CD105 陽性 EC と CD105 陰性 EC の発現遺伝子を比較した。GSEA では、CD105 陽性 EC は CD105 陰性 EC に比し、Myc 関連遺伝子群の強い関連が示された(図 2、Hallmark Gene Set 使用)。血管内皮における Myc シグナルは血管新生亢進への関連が報告されており、スキルス胃癌に特徴的な CD105 陽性 EC が腫瘍優位の血管新生に寄与していることが示唆された。続いて DEGs を抽出し、Metascape によるエンリッチメント解析を施行したところ、血管新生関連遺伝子群の高発現が確認された(図 3、FC>1.4、P<0.05、n=393)。特定の遺伝子としては、Flt1(VEGFR1)・KDR(VEGFR2)の発現上昇を認め、また FGF1・Angpt2・Apln・Aplnr・Emcn・Tgfb1・Egfl7 といった血管新生関連遺伝子の発現上昇も判明した。さらに CD105 陽性 EC では血管新生のみならず、細胞外マトリックス増生・細胞接着を亢進する遺伝子群の高発現も確認され(Ecm1、Icam1、Selp、Cd40、Csf3、Madcam1、Ackr1 など)、線維化・炎症誘導にも寄与することで TME 形成に貢献していると推測された。次に、CAF の遺伝子発現を解析した。深部浸潤を伴う腫瘍を呈す T1-PTC マウスにおける CAF と腫瘍細胞の粘膜下浸潤を伴わない *Tff1*^{Cre}; *p53*^{R172H}; *Cdh1*^{F/F} (T1-PC) マウスにおける CAF における遺伝子発現を GSEA で比較したところ、炎症・免疫反応・血球遊走関連の遺伝子群が数多く変動していた(図 4、Gene Ontology (bp) Gene Set 使用)。EC と同様に DEGs を抽出し Metascape によるエンリッチメント解析を施行すると、やはり同様に炎症・サイトカイン関連の遺伝子群の発現亢進が見られた(図 5、FC>1.4、P<0.05、n=245)。具体的な遺伝子としては、Ccl11・Ccl12・Cxcl10・Cxcl13・Il23a・Il133 といったケモカイン関連遺伝子や Vcam1・Vav2・Trpm2・Flrt3・Tnfsf4・Adamts12・Has2 などの線維化亢進関連遺伝子、骨化関連遺伝子の FGF9・Wnt11・Igf1bp5・Mgp の発現上昇がみられ、それぞれスキルス胃癌における線維化形成への関与が示唆された。

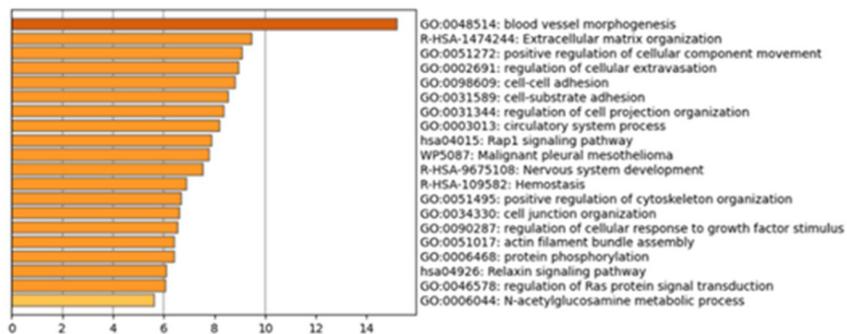


図 3 CD105 陽性血管内皮細胞特異的に発現亢進がみられる遺伝子群



図 4 GSEA T1-PTC マウスの CAF で発現亢進がみられる遺伝子群上位 30

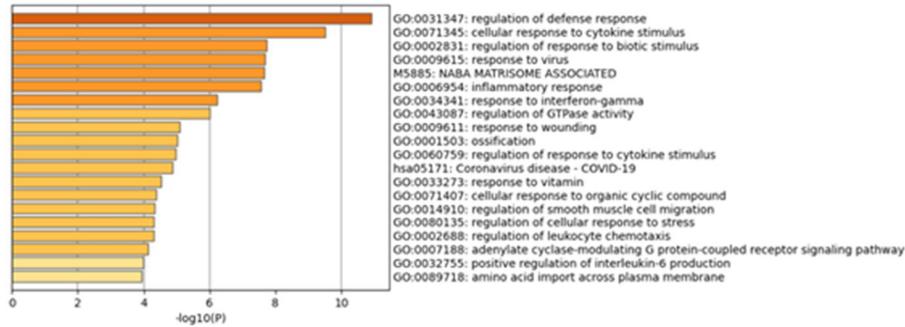


図 5 T1-PTC マウスの CAF で発現上昇がみられる遺伝子群

上述の結果に続いて、同様の手法による CD38 特異的中和抗体・CD105 特異的抗体 (TRC-105) による治療後腫瘍の各細胞分画の遺伝子解析を試みたが、FACS による各細胞の回収に難渋し、CD38 抗体治療後腫瘍の CAF のみ解析が可能であったためその結果を示す(元々線維化が強い組織であることや治療後の変化による細胞数変化などを原因と考えている)。上述の 3 種の CAF についての主成分分析を行ったところ、CD38 抗体は、Tgfr2 KO が T1-PC と T1-PTC の CAF にもたらず遺伝子的変化を部分的にキャンセルしていると考えられた(図 6、縦軸方向緑矢印)。そこで、PC に比し PTC で発現が上昇し、かつ CD38 抗体治療によって発現が低下した遺伝子を抽出し、それらを用いて Metascape による解析を行い(図 7、FC>1.4, P<0.05, n=72)、CAF において T1-PTC マウスで T1-PC マウスに比し上昇している遺伝子群のうち、CD38 抗体治療により軽減された遺伝子群が明らかになった。サイトカインやインターフェロン に対する反応に加え、CAF における線維芽細胞増殖因子への応答、すなわち線維芽細胞増殖(線維化)も CD38 抗体治療によって軽減していることが示された。具体的な遺伝子として、Ccl12・Flrt3・FGF9・Trpm2・Vav2 が含まれており、これらがスキルス胃癌における Tgfr2 KO と CD38 発現に関連し、線維化に寄与している可能性が示唆された。

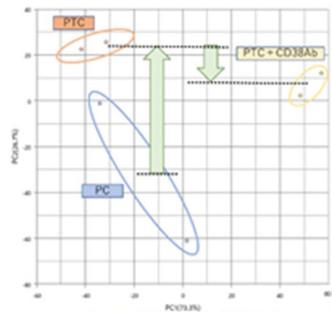


図 6 主成分分析 (CAF)

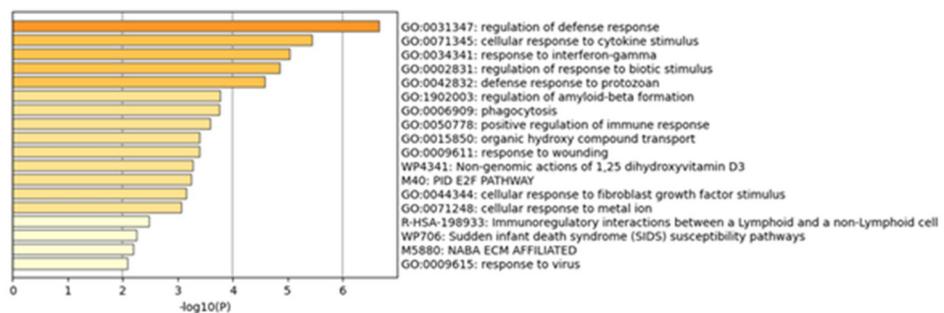


図 7 PTC マウスで上昇している遺伝子群のうち、CD38 抗体治療により軽減された遺伝子群

次に、遺伝子解析とは異なりリン酸化プロテオーム解析により、スキルス胃癌特異的な活性化経路・マスターレギュレーターの検索を行った。Tgfbr2 KO による多彩なシグナルの変動を検討するため、オルガノイドの3群 (WT・PC・PTC) でのリン酸化プロテオーム解析を施行した(図8)。当初予想されていた SMAD 関連遺伝子や BMP・アクチビン関連遺伝子のリン酸化の変化は特定できなかったが、PTC オルガノイドにおいて特異的な経路を検索すると、PAK 遺伝子が同定された。PAK は Rho ファミリーのエフェクター蛋白で、アクチン重合の制御を介し細胞骨格調節・細胞接着などに影響を及ぼすとされている。そこで PAK 阻害剤の PTC 胃腫瘍に対する効果を確認するため、in vitro 系で評価を行った。その結果、PAK 阻害剤は濃度依存性に PTC オルガノイドでの CD38・LRG1 の発現を低下した(図9)。すなわち PAK は Tgfbr2 KO により誘導される CD38・LRG1 シグナルの上流であると考えられたため、T1-PTC スキルス胃癌における新規治療薬の可能性が示唆された。

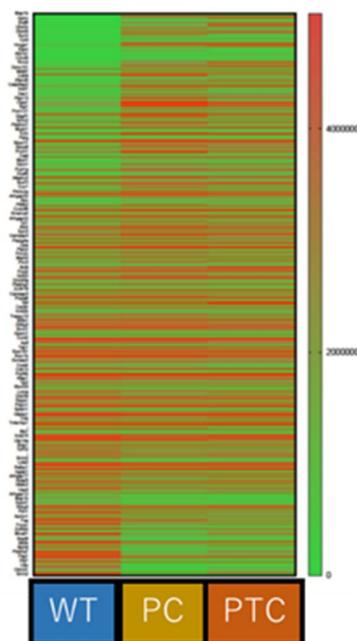


図8 リン酸化プロテオーム解析
クラスターリング解析

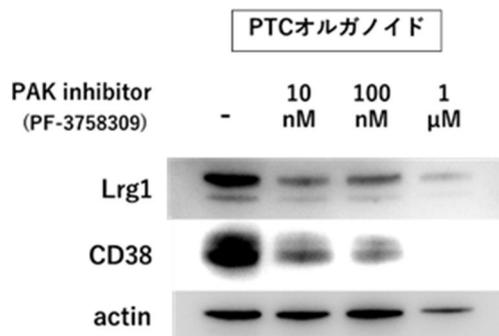


図9 Western blotting

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 畑昌宏
2. 発表標題 印環細胞型胃癌の腫瘍周囲微小環境の解明と新規治療標的の導出
3. 学会等名 GI week
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
---------------------------	-----------------------	----

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