

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20836

研究課題名（和文）新規胃癌マウスモデルの作成及び腸型-びまん型移行を誘導する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Development of a novel mouse model of gastric cancer and elucidation of the molecular mechanisms that induce the intestinal-type to diffuse-type transition.

研究代表者

山崎 淳太郎（Yamasaki, Juntaro）

藤田医科大学・がん医療研究センター・研究員

研究者番号：10963580

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腸型胃癌を形成するマウス胃癌細胞株GAN-KPに対し、びまん型胃癌で頻繁に変異が見られるCdh1をノックアウトすることで新規びまん型胃癌マウス細胞株を樹立した。Cdh1をノックアウトした胃癌細胞（GAN-KPC）を用いた動物モデルを作成し、元の腸型胃癌細胞（GAN-KP）と比較することで、Cdh1のノックアウトが浸潤・転移を促進することを示唆した。また、主要な抗がん剤に対する感受性や代謝特性の違いも評価し、Cdh1のノックアウトが解糖系への依存度の増加やフェロトーシス感受性の低下に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌の組織型は大きく分けてIntestinal-type（腸型）、Diffuse-type（びまん型）、両者が混在するMixed-type（混合型）が存在し、中でも細胞の未分化性が高く頻繁に腹膜播種を引き起こすDiffuse-typeは、とくに予後不良になることが知られている。本研究で新たに樹立されたびまん型胃癌マウスモデルは免疫が正常な同系マウスに同所移植されたもので、免疫細胞や腫瘍微小環境との相互作用を明らかにするための有用なモデルであり、びまん型胃癌の好転移性メカニズムの解明や治療標的の探索に用いることで、予後不良なびまん型胃癌に対する新たな治療薬の開発に貢献しうる。

研究成果の概要（英文）：This study established a novel diffuse-type gastric cancer mouse cell line by knocking out Cdh1, which frequently mutates in diffuse-type gastric cancer, in the mouse gastric cancer cell line GAN-KP that forms intestinal-type gastric cancer. A mouse model using the Cdh1-knockout gastric cancer cells (GAN-KPC) was created, and comparisons with the original intestinal-type gastric cancer cells (GAN-KP) suggested that the knockout of Cdh1 promotes invasion and metastasis. Additionally, the study evaluated the differences in sensitivity to major anticancer drugs and metabolic characteristics, indicating that the knockout of Cdh1 contributes to an increased dependence on glycolysis and a decrease in ferroptosis sensitivity.

研究分野：胃がん

キーワード：胃がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胃がんの組織型は大きく分けて Intestinal-type (腸型)、Diffuse-type (びまん型)、両者が混在する Mixed-type (混合型)が存在し、中でも細胞の未分化性が高く頻りに腹膜播種を引き起こす Diffuse-type は、とくに予後不良になることが知られている。各組織型の発生機序の理解や浸潤・転移に対する治療法を開発するためには、実際の胃がんの病態を模した動物モデルを用いて、腫瘍微小環境相互作用を含めた分子病理学的背景をより深く知ることが重要である。Diffuse-type 胃がんにおいて Cdh1 (E-cadherin) の変異が最も頻りに生じることが知られており、Trp53 及び Ch1 のダブルコンディショナルノックアウトマウスでは低分化がん細胞が発生することが示されている (Shimada et al., Gut, 2012, Zhang et al., Gastric Cancer, 2022)。しかしながら、Cdh1 の変異によって Intestinal-type から Diffuse/Mixed-type への組織型移行が誘導されるかについては知られていない。

### 2. 研究の目的

近年、上皮系の組織幹細胞を *in vitro* で培養することが可能となるオルガノイド技術が報告され、我々も GAN マウスの腫瘍細胞から腫瘍オルガノイドを作成し、胃がんにおける CD44 の機能解析や (Seishima et al., Cancer Prev Res, 2015)、さらに遺伝子改変を行った高悪性胃がんモデルの樹立 (Yamasaki et al., Cancer Sci, 2022) を行なってきた。腫瘍オルガノイドは *in vitro* の遺伝子操作や薬剤感受性評価が容易であり、これを移植したマウスは自然発生型マウスモデルに比べて個体間でのばらつきが低減されるため、がん治療モデルとしても使用できる。そこで本研究は Intestinal-type 胃がんに対して Diffuse-type 胃がんでは特徴的な遺伝子変化を加えることで、胃がん幹細胞がどのように変化するか、さらには浸潤・転移能の変化における役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、Intestinal 型胃がんを形成する GAN-KP 細胞を遺伝子改変し、Diffuse 型胃がんでは頻りに変異が見られる Cdh1 をノックアウトした GAN-KPC 細胞を樹立する。この細胞を用いてマウスの胃壁に同所移植することで新たな Diffuse 型胃がんマウスモデルを確立する。またこの二種類のマウスモデルを比較することで原発腫瘍の増大や遠隔転移に Cdh1 が影響を与えているかを検討する。さらに、これらの細胞のプロファイリングとして胃がんでは主に用いられている抗がん剤の感受性を調べることで、またそれぞれの代謝特性の違いを検討する。

### 4. 研究成果

#### Cdh1 ノックアウト胃がん細胞の樹立

我々がすでに樹立している Intestinal 型胃がんを形成する GAN-KP 細胞に対して、CRISPR/Cas9 システムを用いて Cdh1 をノックアウトすることで GAN-KPC を樹立した。GAN-KP は E-cadherin を発現しているが、Cdh1 をノックアウトした GAN-KPC では E-cadherin が発現していないことをウェスタンブロッティング法で確認した (図 1 A)。これらの細胞を顕微鏡で観察すると、GAN-KP 細胞は細胞同士が接着し、島状のコロニーを形成しながら増殖するが、GAN-KPC は細胞同士が接着せず、各細胞が独立して増殖していることが明らかになった (図 1 B)。

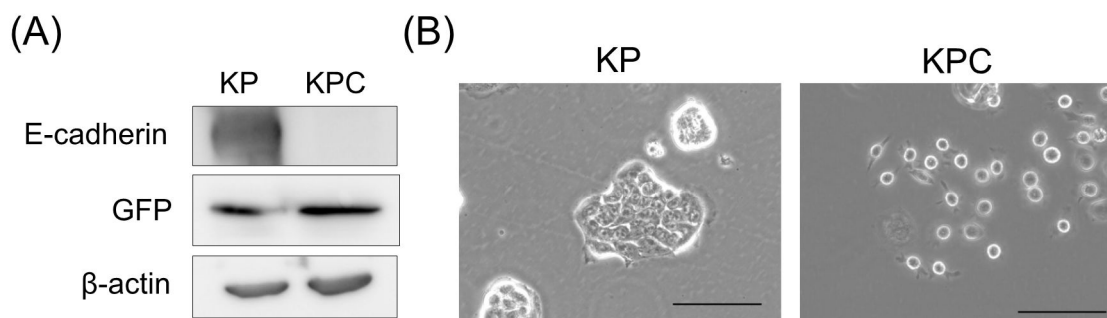


図1 (A)KPおよびKPCにおけるE-cadherinの発現 (B)明視野画像 スケールバー;100 μm

#### 同所移植と転移能の評価

C57BL/6J マウスの胃壁に GAN-KP および GAN-KPC を  $1 \times 10^5$  個同所移植した。移植後 28 日目にマウスを安楽死させ、腫瘍を摘出した。GAN-KPC を移植したマウスは GAN-KP を移植したマウスに比べて顕著な腹水の貯留が観察された (図 2A)。原発巣では GAN-KP、GAN-KPC とともに大きな腫瘍を形成していたのに対し、腸間膜への遠隔転移を観察したところ、GAN-KP では転移巣は見られず、GAN-KPC では複数の転移巣が認められた (図 2B)。このことから Cdh1 のノックアウトにより

転移能が亢進する可能性が示唆された。

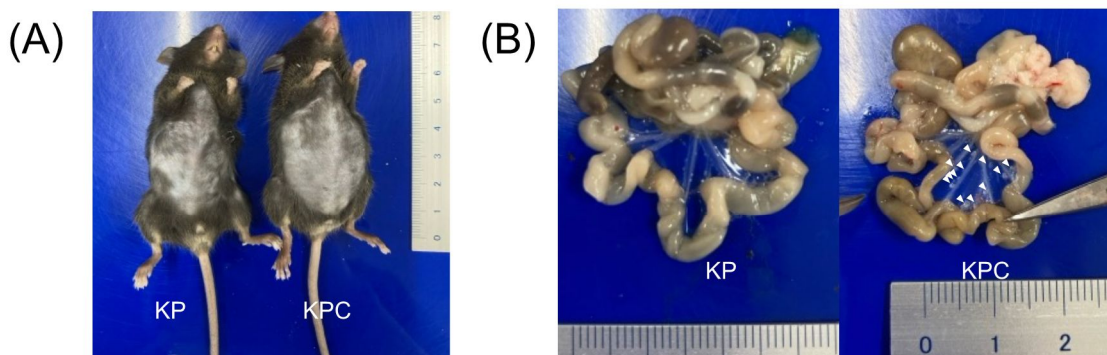


図2 (A) 同所移植後28日後のマウス (B)腸間膜への転移巣形成 矢頭;転移巣

### 胃がんにおける代表的化学療法に対する感受性試験

胃がんの化学療法ではフッ化ピリミジン系の 5-FU、プラチナ系のシスプラチン、タキサン系のパクリタキセルなどが用いられる。そこでこれらの薬剤に対する GAN-KP および GAN-KPC の感受性を比較した(図3)。その結果、E-cadherin の発現の有無はこれらの薬剤に対する感受性に影響を与えないことが分かった。

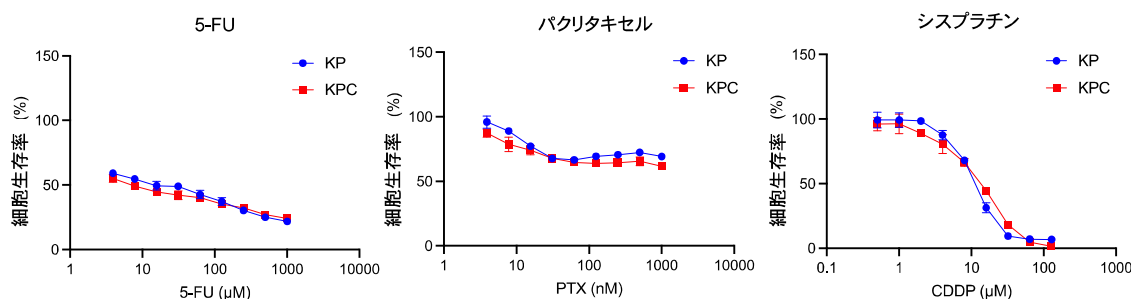


図3 胃がんにおける代表的化学療法(5-FU、パクリタキセル、シスプラチン)に対する感受性試験

### 解糖系およびシスチンへの依存度の検討

グルコースのアナログである 2DG はグルコースと拮抗して細胞内に取り込まれ解糖系を阻害する。2DG に対する感受性は解糖系への依存度とも考えられるため、E-cadherin の発現の有無が解糖系にどのような影響を与えているかを検討した。その結果 GAN-KP に比べて GAN-KPC では 2DG に対する感受性が亢進しており、より解糖系に依存していることが示唆された。エラスチンはシスチン・グルタミン酸トランスポーターである xCT の阻害剤である。xCT の阻害は細胞内のグルタチオンの枯渇およびそれに伴う過酸化脂質の増加によりフェロトーシスと呼ばれる鉄依存的細胞死を引き起こす。E-cadherin の発現の有無がフェロトーシス感受性にどのような影響を与えているかを検討するため、それぞれの細胞にエラスチンを添加した。その結果、GAN-KP に比べて GAN-KPC ではエラスチンへの感受性が低下していることが分かった。これらのことから GAN-KP と GAN-KPC の間では主要な代謝経路のスイッチおよびそれに伴う細胞内活性酸素レベルの変化が起きていることが示唆された。

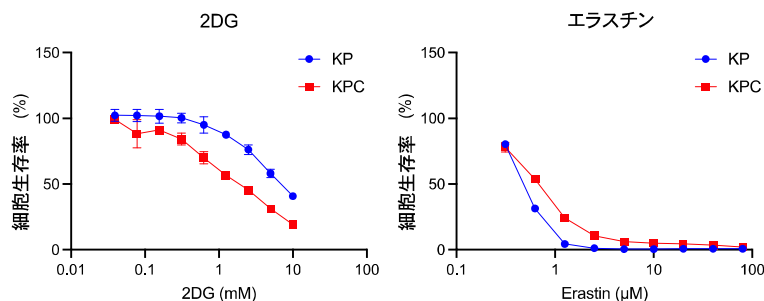


図4 解糖系阻害剤およびフェロトーシス誘導剤に対する感受性試験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Zhang Jun, Fu Lingfeng, Wang Huaitao, Yonemura Atsuko, Semba Takashi, Yasuda-Yoshihara Noriko, Nishimura Akiho, Tajiri Takuya, Tong Yilin, Yasuda Tadahito, Uchihara Tomoyuki, Yamazaki Masaya, Okamoto Yuya, Yamasaki Juntaro, Nagano Osamu, Baba Hideo, Ishimoto Takatsugu	4. 巻 591
2. 論文標題 RAC1-mediated integrin alpha-6 expression in E-cadherin-deficient gastric cancer cells promotes interactions with the stroma and peritoneal dissemination	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 216901 ~ 216901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2024.216901	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 Yonemura A, Semba T, Zhang J, Fan Y, Yasuda-Yoshihara N, Wang H, Uchihara T, Yasuda T, Nishimura A, Fu L, Hu X, Wei F, Kitamura F, Akiyama T, Yamashita K, Eto K, Iwagami S, Iwatsuki M, Miyamoto Y, Matsusaki K, Yamasaki J, Nagano O, Saya H, Song S, Tan P, Baba H, Ajani J A., Ishimoto T	4. 巻 43
2. 論文標題 Mesothelial cells with mesenchymal features enhance peritoneal dissemination by forming a protumorigenic microenvironment	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113613 ~ 113613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.113613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura F, Semba Ti, Yasuda-Yoshihara N, Yamada K, Nishimura A, Yamasaki J, Nagano O, Yasuda T, Yonemura A, Tong Y, Wang H, Akiyama T, Matsumura K, Uemura N, Itoyama R, Bu L, Fu L, Hu X, Wei F, Mima K, Imai K, Hayashi H, Yamashita Y, Miyamoto Y, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 8
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblasts reuse cancer-derived lactate to maintain a fibrotic and immunosuppressive microenvironment in pancreatic cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.163022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wei F, Uchihara T, Yonemura A, Yasuda-Yoshihara N, Yasuda T, Semba T, Fukuda M, Akiyama T, Kitamura F, Kariya R, Yamasaki J, Aihara K, Yamashita K, Nagano O, Okada S, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 -
2. 論文標題 A novel tdTomato transgenic mouse model to visualize FAP positive cancer associated fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16712	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama Takahiko, Yasuda Tadahito, Uchihara Tomoyuki, Yasuda-Yoshihara Noriko, Tan Benjy J.Y., Yonemura Atsuko, Semba Takashi, Yamasaki Juntaro, Nagano Osamu, Satou Yorifumi, Saya Hideyuki, Tan Patrick, Baba Hideo, Ishimoto Takatsugu	4. 巻 83
2. 論文標題 Stromal Reprogramming through Dual PDGFR / Blockade Boosts the Efficacy of Anti-PD-1 Immunotherapy in Fibrotic Tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 753 ~ 770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-22-1890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchihashi Kenji, Hirata Yuki, Yamasaki Juntaro, Suina Kentaro, Tanoue Kenro, Yae Toshifumi, Masuda Kenta, Baba Eishi, Akashi Koichi, Kitagawa Yuko, Saya Hideyuki, Nagano Osamu	4. 巻 30
2. 論文標題 Presence of spontaneous epithelial-mesenchymal plasticity in esophageal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101246 ~ 101246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno Shodai, Seishima Ryo, Yamasaki Juntaro, Hattori Kaoru, Ogiri Masayo, Matsui Shimpei, Shigeta Kohei, Okabayashi Koji, Nagano Osamu, Li Liang, Kitagawa Yuko	4. 巻 148
2. 論文標題 Angiopoietin-like 4 promotes glucose metabolism by regulating glucose transporter expression in colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1351 ~ 1361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-022-03960-z	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎淳太郎
2. 発表標題 MEKの阻害がKRAS遺伝子変異胃癌の転移性進行を抑制する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
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
---------	---------