

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591949

研究課題名(和文) 上皮間葉系細胞分化転換関連分子を標的とする新しい胃癌腹膜転移治療法の開発

研究課題名(英文) Targeting therapy of Epithelial-Mesenchymal transition about human gastric cancer.

研究代表者

笹子 三津留 (Sasako, Mitsuru)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40143490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：(1)線維芽細胞ライブラリー作製(2)線維芽細胞はがん細胞増殖の足場として重要であった。(3)線維芽細胞はがん細胞の基底膜の分解促進と接着能の低下を導く。(4)線維芽細胞によるがん細胞の運動能や増殖能の変化はEMTが主因ではなかった。(5)プロテオーム解析とRNA microarray：線維芽細胞の網羅的解析を行い、腫瘍の悪性度変化因子としてEphrin receptor familyを同定した。(6)EMT関連分子ではなくEphrin receptorおよびその下流のチロシンキナーゼ阻害が微小環境における腹膜転移阻害薬開発に有望である。

研究成果の概要(英文)：We established primary cultured fibroblast library isolated from gastric cancer patients. Fibroblasts modified invasiveness and EMT status of cancer cell. Proteome analysis, RNA microarray indicated over-expression of Ephrin receptor family in cancer stromal cells. Ephrin receptor and related pathway might be good targets of cancer-microenvironment about gastric cancer.

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：線維芽細胞 胃癌 微小環境 EMT

### 1. 研究開始当初の背景

腹膜転移を伴う胃がんは非常に予後が悪く、多くの症例は6か月以内に死に至る。一般的に固形腫瘍においては腹膜への生着と増殖にはがん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts:以下 CAFs) や細胞外基質の関与が重要であることが解明されつつある。従来、胃がん細胞株を使った基礎研究では、残念ながら腹膜転移治療につながる確固たる研究成果が得られていない。その理由の一つとして、多くの研究ではがん細胞にのみ注目してCAFsとの相互作用に対する研究が臨床検体を使って十分になされていなかったことがあげられる。実際に進行胃がん組織における浸潤部分や腹膜転移病変を観察すると、ほとんどの症例で線維性変化が強く認められ、がん細胞浸潤と線維性変化には密接な関係があることを裏付けている。これらのことから、胃がん浸潤や腹膜転移形成の分子機構解明には、「胃がん細胞のEMTのみならずCAFsとの相互作用を複合的に解析することが必要である」と仮説を立てた。実際に当科で切除した進行胃がん組織と腹膜転移組織を用いてEMT arrayの結果をもとに免疫組織染色を行ったところ、浸潤部分の胃がん組織や腹膜転移の胃がん細胞ではEMT関連分子であるSNAIL1, SNAIL2, NOTCH1, ZEB1, ZEB2などの発現亢進が見られた。その一方で、がん組織周囲のCAFsではPDGFRBなどの発現亢進が特徴的に起きていることも明らかになった。がんの浸潤転移が多種類の細胞の相互作用の一側面である以上、CAFsを含む進行胃がん組織全体で起きている現象を複合的に捉えてEMTの観点から解析することが、浸潤・転移における重要分子群の同定と新しい治療法の開発に有用である。

### 2. 研究の目的

臨床検体を用いて胃がん細胞とがん関連線維芽細胞の相互作用を標的とした新しい胃がん腹膜転移治療法開発を目標とする。がん細胞の浸潤・転移や線維症においては、上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition:以下 EMT) の重要性が明らかになりつつある。当科において切除した胃がん組織・腹膜転移組織を用いてEMT関連分子群のアレイ解析を試験的に行ったところ、がん細胞ではEMT関連分子の発現亢進が認められた。その一方でがん関連線維芽細胞ではplatelet derived growth factor (PDGFRB)を含む特定の受容体型分子群が発現亢進した。本研究では、胃がん組織におけるEMT関連分子群を詳細に解析して、治療標的となりうる受容体型分子群を同定すること。それらの受容体型分子阻害による治療効果をin vitro と in vivo (マウスモデル) で評価することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### 【研究計画要旨】

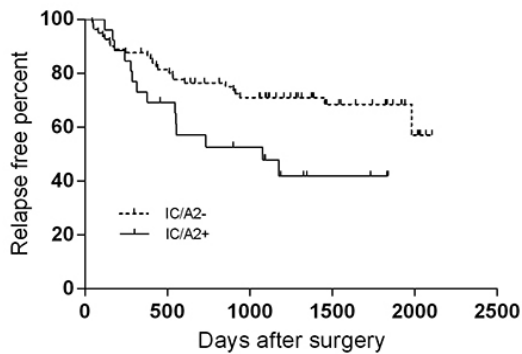
- (1) 進行胃がん 10 症例の粘膜側腫瘍 (lesion1) と漿膜露出腫瘍 (lesion2) および腹膜転移病変 (lesion3) 10 症例の EMT 関連分子 84 分子を網羅的に定量解析した。腹膜転移病変で特異的に発現亢進する分子群で細胞膜に局在する受容体型分子と転写因子に注目して、胃がん細胞と CAFs の関連を免疫組織学的に解析した。
- (2) 胃がん 40 症例の線維芽細胞ライブラリー作製を作製した。
- (3) ヒト胃がん細胞株と CAFs の混合培養における胃がん細胞株の変化を細胞生物学的に解析した。
- (4) (1) ~ (3) において同定した胃がん再発予後に関与する危険因子について臨床病理学的に解析した。

### 4. 研究成果

- (1) 研究計画(1)を順調に進め予定よりも多く、胃がん 40 症例の線維芽細胞ライブラリー作製を行うことができた。40 症例が必要であった理由として、間質細胞である線維芽細胞の多様性 (個体差) が予想以上であったことがあげられる。これは同一患者検体由来のものとしては、国内最大規模である。
- (2) 実験計画(3)の混合培養の解析結果から明らかになったことは、線維芽細胞はがん細胞増殖の足場としての重要性であった。また、線維芽細胞はがん細胞の基底膜の分解促進と接着能の低下を誘導していた。しかしながら、線維芽細胞によるがん細胞の運動能や増殖能の変化はEMTが主因ではなかった。また、網羅解析を real-time PCR だけでなくプロテオーム解析と RNA microarray で行うことで、がん間質におけるタンパク質レベルの腫瘍の悪性度変化因子として Ephrin receptor family を同定した。また、がん細胞自身のEMTよりも、微小環境因子としてのCAFsがより重要と思われた。また、EMTの制御ではなくEphrin receptorおよびその下流のチロシンキナーゼ阻害あるいはEphrin/ephrinの相互作用の特異的阻害が微小環境における腹膜転移阻害薬開発に有望であることを臨床病理学胃的解析で明らかにした (論文業績参照)。
- (3) この時点で得られた解析結果から、臨床応用に近い研究として進行胃がん浸潤部におけるEphrin receptorの発現解析と過去5年間に遡った生存解析を107症例で行った。その結果、胃がん再発リスクマーカーとしてのEphrinA2 receptorの特徴的発現の意義を示した。具体的には、胃がん浸潤部にCAFsとがん細胞が混在しており、両者にEphrinA2の高発現を異所性に認める場合をIC/A2陽性と定義した。IC/A2陽性症例の多くは治療切除後1年以内の早期血行性・腹膜転移再発や

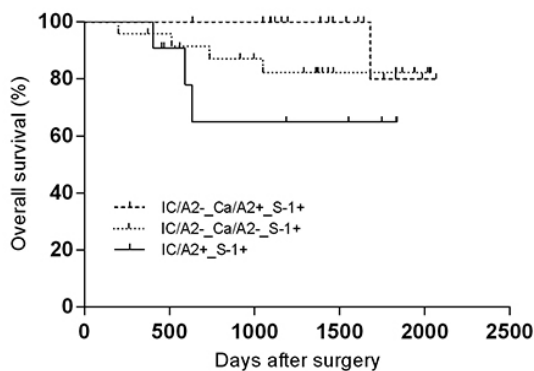
3年以降の晩期腹膜再発を認めた。

また、これらの再発症例では既存の抗腫瘍薬による治療効果も認めた。したがって、IC/A2因子によって手術時に再発リスクを予測することが可能であり、今後の検証研究を経ることで2次治療としてのS-1による標準治療ではなくシスプラチン、オキサリプラチン、タキサンなどの併用による補助化学療法を選択が治療成績の改善を可能にすると思われる。



【無再発生存期間】

IC/A2+では無再発生存期間が短かった (P=0.0207)



【補助化療群における全生存率】

再発後に2次化学療法を行うことで全生存期間は延長しており、IC/A2による有意差は認めない。S-1+: ティーエスワン内服症例

**実験成果のまとめ:** 本研究の当初目標であった胃がん腹膜転移に対する治療法の開発は、再発高リスク群同定と有効な治療薬選択による新しい治療戦略の構築という点でおおむね実現されたと考えている。

## 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 2件)

Shojiro Kikuchi, Nobuaki Kaibe, Koji Morimoto, Hirokazu Fukui, Hirotaka Niwa, Yoshihiro Maeyama, Masashi Takemura, Masaki Matsumoto, Shoji Nakamori, Hiroto Miwa, Seiichi Hirota, Mitsuru Sasako.

Overexpression of EphrinA2 receptor in cancer stromal cell is a prognostic factor for the relapse of gastric cancer. Gastric Cancer. 2014 Jun 8. [Epub ahead of print] 査読有り

Hirokazu Fukui, Xinxing Zhang, Chao Sun, Ken Hara, Shojiro Kikuchi, Takahisa Yamasaki, Takashi Kondo, Toshihiko Tomita, Tadayuki Oshima, Jiro Watari, Johji Imura, T Fujimori, Mitsuru Sasako, and Hiroto Miwa.

IL-22 produced by cancer-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion via STAT3 and ERK signaling. British Journal of Cancer. 2014 [Epub ahead of print] 査読有り

[学会発表](計 5件)

菊池正二郎、盛本浩二、中森正二、竹村雅至、川崎健太郎、堀高明、大嶋勉、仁和浩貴、松本友寛、海邊展明、山下英孝、廣田誠一、前山義博、笹子三津留

「がん関連線維芽細胞は胃がん腹膜播種の悪性度にどのような影響を与えるか?」日本外科学会 2013年04月11日 福岡

前山義博、菊池正二郎、仁和浩貴、笹子三津留

「がん関連線維芽細胞ががん細胞に与える影響の解析」日本外科学会 2013年04月11日 福岡

菊池正二郎、前山義博、仁和浩貴、竹村雅至、堀高明、大嶋勉、松本友寛、海邊展明、山下英孝、笹子三津留

「がん関連線維芽細胞と胃がんの細胞間相互作用における動態解析」日本消化器外科学会 2013年07月17日 宮崎

菊池正二郎、前山義博、仁和浩貴、瀧井麻美子、海邊展明、山下英孝、大嶋勉、竹村雅至、盛本浩二、中森正二、廣田誠一、川口拓之、笹子三津留

Cancer-fibroblasts mixture was a high risk factor of recurrence in gastric cancer patients. 日本癌学会 2013年10月03日 横浜

菊池正二郎、前山義博、仁和浩貴、瀧井麻美子、海邊展明、山下英孝、大嶋勉、竹村雅至、大津真、笹子三津留

「がん関連線維芽細胞は胃がん細胞のMMPs発現と浸潤性を増す」

日本癌治療学会 2013年10月25日 京都

[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 0 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

笹子 三津留 (Sasako, Mitsuru)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40133490

##### (2) 研究分担者

菊池 正二郎 (Kikuchi, Shojiro)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：70381960

##### (3) 連携研究者

( )

なし  
研究者番号：