

令和 2 年 11 月 24 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460466

研究課題名(和文) がん微小環境における転移制御因子の同定と胃がん治療戦略の確立

研究課題名(英文) A new strategy for a micrometastasis of gastric cancer.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：がんの悪性度には、がん細胞周囲の非がん細胞の作用(がん間質反応)が強く関係している。本研究では、胃がん切除組織と血清を使った解析により次の2つを明らかにした。胃がん切除組織の浸潤部における、がん細胞とがん関連線維芽細胞の複合体(IC factor)にEphrinA2が過剰発現していれば胃がん再発の高リスク症例である。血清中VEGF-A濃度が病勢(再発転移)を反映し、転移マーカーとなり得ること。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん転移や再発は、治療によって原発巣(がんが発生した臓器を含む)を取り除いたのちに、他の場所にごがんが「発生」していると誤解されがちである。実際には治療の時点で、すでに他の場所に「がんの芽」が潜んでいて、やがて大きくなるということが正しい。しかし、臨床的な転移再発が起こるかどうかは、患者の免疫能とがんの悪性度のバランスによる。本研究では、胃がん切除組織と血清を使った解析により、胃がん切除組織の浸潤部にEphrinA2が過剰発現していれば胃がん再発のリスクが高いこと、血清中VEGF-A濃度が病勢(再発転移)を反映し、転移マーカーとなり得ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The cancer stroma reaction is strongly related to the malignant potential of gastric cancer. In this study, we clarified the next criteria for high risk group of recurrence and the early detection by predictive marker. EphrinA2 overexpression in the intermingle of cancer cells and cancer-associated fibroblasts (IC factor) was is the high risk marker of the gastric cancer recurrence. The concentration of serum VEGF-A was a predictive marker for the early detection of metastasis and recurrence.

研究分野：消化器外科学

キーワード：がん間質反応 線維芽細胞 低酸素 GO期 浸潤 転移 胃がん

1. 研究開始当初の背景

世界の胃癌患者の60%は東アジアに集中しており、日本は胃癌の早期診断・手術・化学療法などにおいて指導的立場にある。早期診断法の開発や、手術法(D2 リンパ節廓清)・術後補助化学療法などの標準化によって、胃癌治療成績は向上した。しかし、国内の胃癌による年間死亡者数は50,136人であり、依然として男性・女性ともがん死亡者数の第2位である(2010年)。その原因は進行胃癌や再発胃癌が難治性であり有効な治療法に乏しいことにある。現在、胃癌の細胞生物学的悪性を適切に評価する指標はなく、治療後の治療方針決定にもTNM分類が用いられている。しかし、再発リスクの高い症例を正確に選別できれば、適切な症例に対して強力な術後補助化学療法を行うことが可能になり、治療成績の更なる向上が見込まれる。

近年、がんの浸潤・転移はがん細胞の特性だけでなく、多くの微小環境因子で規定されることが明らかになってきた。例えば、若年発症もみられるスキルス胃癌に多い印環細胞がんでは、早期がんの予後は良好であるが、深部浸潤を伴う進行がんの予後は極めて悪い。このことはがん細胞の性格だけでなく、微小環境が浸潤・転移に影響を与えていることを示唆している。われわれは進行胃癌の微小環境、とりわけ、がん関連線維芽細胞(Cancer associated fibroblasts: CAFs)が、がんの浸潤転移に与える影響に焦点を当て臨床病理学的及び細胞生物学的解析を行っている。スキルス胃癌患者由来の初代培養CAFsとの共培養では、印環細胞がんの単位時間当たりの移動速度や移動距離が劇的に増加した。併せて、CAFs-胃癌細胞間相互作用解析から、胃癌細胞の浸潤性を増す一因がCAFsとの相互作用であることを明らかにしてきている。また、当科で治療切除を行った進行胃癌患者114症例の臨床病理学的解析から、「腫瘍先進部でCAFsと遊走するがん細胞が複合体を形成する症例では、有意差を持って転移再発が多い」ことを見出した。

2. 研究の目的

腫瘍の浸潤転移における微小環境因子の重要性が明らかになりつつあるが、それぞれの因子の具体的な役割は未だ解明されていない。本研究では、胃癌手術時に採取した患者検体を用いた「胃癌微小環境因子(特にがん関連線維芽細胞)」の解析から、がん間質細胞を含む細胞生物学的特性に基づく新しい進行胃癌の治療戦略を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胃癌切除組織におけるIC factorの有無とその他の微小環境因子の解析: 兵庫医科大学上部消化管外科で進行胃癌に対して治

療切除が行われる症例のうちで、術前化学療法などが行われていない症例を対象として、IC factorの有無とCAFs特異的分子群の発現について免疫組織学的に解析を行った。

(2) CAFs, NGFs, NIFsの初代培養細胞ライブラリーの作製: 同一患者由来CAFs, NGFs, NIFsの初代培養細胞ライブラリー(30症例): CAFs, NGFsは切除胃組織由来、NIFsは消化管再建時に切除・廃棄する腸管(空腸)の一部を用いて培養した。

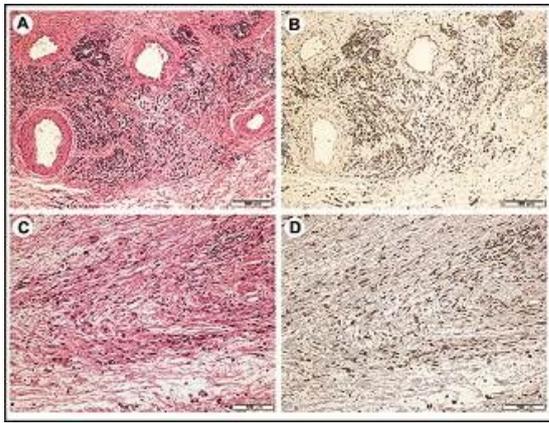
(3) CAFs-胃癌細胞相互作用の細胞生物学的解析: 細胞周期の変化によって異なった蛍光蛋白を発現するFucci遺伝子導入胃癌細胞株・長期間(2週間~)連続撮影による動画解析法・細胞運動自動追尾解析プログラムなどを用いて、初代培養線維芽細胞と胃癌細胞株間相互作用の定量的動態解析を行った。がん細胞周期解析: CAFsとFucci導入胃癌細胞株の共培養を、高感度カメラを用い長期間タイムラプス顕微鏡撮影することで細胞周期を継時的・定量的に解析した。

(4) 進行胃癌患者血清の経時的解析: 再発高リスク群を中心に血清を集めて、再発前後から高度進行再発気における血清を使って、40項目のサイトカインを標的とした網羅解析を行った。

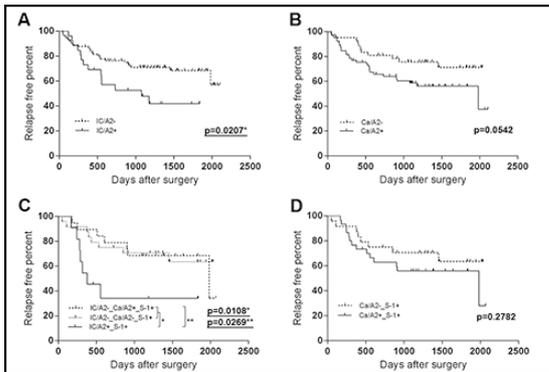
4. 研究成果

平成26年度までに進行胃癌の浸潤最深部におけるがん細胞とがん関連線維芽細胞の複合体(IC factor: Intermingle of Cancer and Cancer Associated Fibroblasts)がEphrin familyの異常発現が胃癌細胞の浸潤・転移に強く関連していることを見出した。

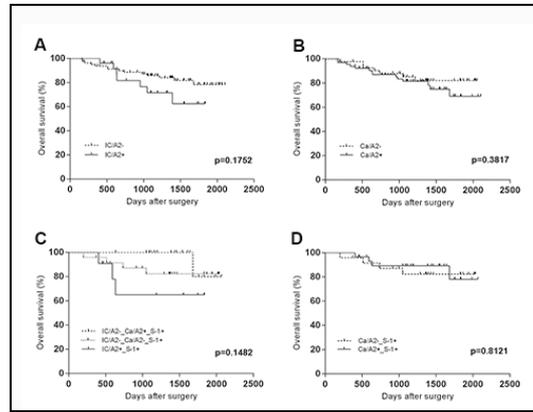
(図1および図2) Gastric Cancer. 2015 Jul;18(3):485-94.



(図1) 胃がん深部浸潤部において、原発巣から遊離した単独のがん細胞と線維芽細胞などの間質細胞が混在している複合体を IC factor (Intermingle of Cancer and Cancer Associated Fibroblasts)とした。また、免疫組織染色におけるエフリン A2 陽性は同切片上の Auerbach 神経細胞より同等以上の染色強度と定義した。A および C, HE 染色 B および D, エフリン A2 染色。A, B は原発巣が intestinal type 胃がんで浸潤部が diffuse type であるもの。C, D は diffuse type である。Original magnification $\times 20$ 。



(図2) Kaplan-Meier 曲線による IC factor と無再発生存期間解析。全患者 107 名のうち、54 名が S-1 による補助化学療法を受けた。(A) IC においてエフリン A2 陽性群は同陰性群に比べて RFS は有意に短かった。(B) 浸潤深部でがん細胞のみエフリン A2 陽性である群は、陰性である群に比べて RFS は短い傾向にあったが有意差はなかった。(C) と(D)は術後補助療法として S-1 を内服した群のみの解析である。(C) IC においてエフリン A2 陽性群は S-1 化療にもかかわらず RFS は有意に短かった。(D) がん細胞のみエフリン A2 陽性である場合は、術後の S-1 内服にもかかわらず再発予後に有意差はなかった。



(図3) IC factor と全生存期間解析

(図2)では IC におけるエフリン A2 異常発現によって再発リスクが予測できることを示した。しかし、(図3)では全生存期間に有意差はなかった。その解釈として再発症例に対しては、ほとんどの症例でセカンドライン以降の化学療法が行われる。その結果生存期間の延長が見られる症例が多く、(図3C)に示すように長期生存も見られている。これらのことを併せて考えれば、IC/A2 陽性(がん間質反応)で再発転移の高リスク群と判断された場合には、標準治療である術後 S-1 を 8 コース内服するだけでなく、より強力な化学療法を補助化療として選択することも、新しい胃がん治療戦略として考えられた。

平成 27 年度においては、線維芽細胞由来の液性因子が胃がん細胞に対して細胞周期・運動能・上皮間葉転換 (EMT) に関する遺伝子発現変化をもたらすことを明らかにした。

全研究期間を通じて、再発高リスク群である進行胃がん患者血清を経時的に解析することで、再発・転移の時期に一致して血清 VEGF-A 濃度が上昇する症例があることを確認した。VEGF-A の由来はがん細胞、がん間質細胞、両者のいずれであるは不明であるが CEA, CA19-9 など胃がん腫瘍マーカーとして広く用いられている分子よりは病勢を反映していると考えられた。

細胞周期について: fucci 遺伝子を導入して細胞周期を可視化したヒトスキルス胃がん細胞株 (HSC43 fucci) を用いて低酸素環境 (1%O₂) で線維芽細胞由来液性因子を加えると、細胞周期が 2 週間以上 G₀ 期にとどまることが明らかになった。また、20%O₂ にするとこれらの細胞が再び増殖期に戻ることをタイムラプス顕微鏡撮影で証明した。低酸素環境で G₀ 期にとどまる胃がん細胞の運動の動態解析から運動能はむしろ亢進することが分かった。これらのことから考えれば、腹腔内のような低酸素環境下での

スキルス胃がん細胞株は線維芽細胞由来の液性因子によって長期間 G0 期に維持されるにもかかわらず、運動能はむしろ亢進する、ということが示唆された。

【まとめ】

当初の研究目的はおおむね達成された。すなわち、胃がん切除組織における IC factor の有無とその他の微小環境因子の解析 胃がん症例の臨床病理学的解析と前向き生存解析による胃がん治療戦略の確立 CAFs-胃がん細胞間相互作用の細胞生物学的解析(浸潤能・増殖能・薬剤耐性の評価)。これらに加えて、胃がん再発患者の血清を使った網羅解析から、VEGF-A 濃度が病勢(再発や増悪)を反映することを明らかにした。胃がんにおいては既存の腫瘍マーカーとは異なるマーカーとして、VEGF-A 値の経時的測定が治療戦略を考える上で重要であると思われた。

本研究の成果として、切除胃がん組織での IC とエフリン A2 の異常発現による再発(微小転移)リスク評価によって、強力な補助化学療法を選択するという治療戦略の妥当性は今後の臨床研究における検討課題である。

5. 主な発表論文等(計 3 件)

(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 3 件)

Niwa H, Maeyama Y, Kikuchi S, Kawaguchi H, Daimon T, Furuya Y, Ito H, Mizuno N, Otsu M, Yasuhara H, Sasako M Cancer cell & Microenvironment 2015; 2:e921, Sep 17, 2015 査読有り

Kikuchi S, Kaibe N, Morimoto K, Fukui H, Niwa H, Maeyama Y, Takemura M, Matsumoto M, Nakamori S, Miwa H, Hirota S, Sasako M. Impacts of cancer-associated stromal cells on growth of human gastric cancer cell lines

Overexpression of Ephrin A2 receptors in cancer stromal cells is a prognostic factor for the relapse of gastric cancer. Gastric Cancer. 18(3):485-94. 2015. 査読有り

Sun C, Fukui H, Hara K4, Zhang X, Kitayama Y, Eda H, Tomita T, Oshima T, Kikuchi S, Watari J, Sasako M, Miwa H. FGF9 from cancer-associated fibroblasts is a possible mediator of invasion and anti-apoptosis of gastric cancer cells. BMC. Cancer. 30;15:333. 2015. 査読有り

[学会発表](計 12 件)

日本消化器外科学会 2016.7.14 アステイ徳島多目的ホール「胃がん休眠と間質反応制御を目的とした免疫治療法の開発」菊池正二郎、小澤 りえ、中尾英一郎、瀧井 麻美子、仁和 浩貴、海辺 展明、大嶋 勉、竹村 雅至、笹子三津留

日本分子生物学会 2015.12.3 [3P0104] 「胃がん組織由来間質細胞はがん細胞を G0 期に誘導し細胞周期を制御する」岩本 典子、菊池正二郎、小澤 りえ、盛本 浩二、中森 正二、笹子三津留 Ccancer stromal reaction, senescence associated secretory phenotype, cell cycle arrest.

日本消化器外科学会 2015.7.16 浜松アクトシティ 「がん間質反応による胃がん晩期再発とがん休眠について」Senescent stromal cell induced dormancy of gastric cancer. 菊池正二郎、前山義博、小澤 りえ、瀧井 麻美子、吉田 佳世、仁和 浩貴、海辺 展明、大嶋 勉、竹村 雅至、笹子三津留

日本外科学会 2015.4.18 「低酸素環境における胃がん細胞の休眠とがん間質反応」Hypoxia and cell-cell interaction regulated dormancy of gastric cancer cells.

菊池正二郎、前山義博、川口拓之、仁和浩貴、小澤りえ、瀧井麻美子、吉田佳世、海辺展明、大嶋勉、竹村雅至、大津真、笹子三津留

日本胃癌学会 2015.3.5 広島県立総合体育館 「胃間質細胞のがん細胞増殖への影響」仁和浩貴、菊池正二郎、瀧井麻美子、吉田佳世、海邊展明、大嶋勉、竹村雅至、笹子三津留

日本癌学会 2014.9.26 横浜国際会議場 「がん間質反応で胃がん治療戦略を考える」Overexpression of EphrinA2 receptor in cancer-stromal cell is a prognostic factor for the relapse of gastric cancer. 菊池正二郎、盛本浩二、仁和浩貴、前山義博、松本雅記、中森正二、廣田誠一、笹子三津留

日本消化器外科学会 2014.7.18 郡山総合体育館 「胃がんとはがん関連線維芽細胞における EphrinA2 受容体発現は胃がんの再発予測マーカーである」Over expression of EphA2 in CAFs was a poor risk factor for the recurrence of gastric cancer. 菊池正二郎、仁和浩貴、海邊展明、山下英孝、瀧井麻美子、大嶋勉、竹村雅至、中森正二、廣田誠一、笹子三津留

日本外科学会 2014.4.4 京都国際会議場 「胃がん関連線維芽細胞は正常線維芽細胞と何が異なるのか? RNA profiling of cancer-associated fibroblasts from gastric cancer tissue.」菊池正二郎、仁和浩貴、前山義博、盛本浩二、竹村雅至、大嶋勉、海邊展明、山下英孝、吉田佳世、瀧井麻美子、中森正二、廣田誠一、笹子三津留

日本外科学会 2013.4.11 福岡マリノメ

ッセ 「がん関連線維芽細胞ががん細胞に与える影響の解析」 前山義博、菊池正二郎、仁和浩貴、笹子三津留

日本癌治療学会 2013.10.25 京都国際会議場 「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」 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

日本癌学会 2013.10.3 横浜 パシフィコ横浜 「Cancer-fibroblasts mixture was a high risk factor of recurrence in gastric cancer patients.」 菊池正二郎、前山義博、仁和浩貴、瀧井麻美子、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

日本消化器外科学会 2013.7.17 宮崎サンホテルフェニックス 「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」 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

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称：標準化学療法に不応又は不耐で治癒切除不能な進行又は再発胃癌患者の治療のための医薬

発明者：菊池正二郎、篠原尚、笹子三津留、三輪洋人、城森孝仁、岸本裕充、野口一馬

権利者：1)学校法人兵庫医科大学、2)OC バイオサイエンス株式会社

種類：特許

番号：201880019266.7

出願年月日：2019 年 9 月 19 日

国内外の別：外国

名称：標準化学療法に不応又は不耐で治癒切除不能な進行又は再発胃癌患者の治療のための医薬

発明者：菊池正二郎、篠原尚、笹子三津留、三輪洋人、城森孝仁、岸本裕充、野口一馬

権利者：1)学校法人兵庫医科大学、2)OC バイオサイエンス株式会社

種類：特許

番号：18771066.0

出願年月日：2019 年 7 月 31 日

国内外の別：外国

名称：標準化学療法に不応又は不耐で治癒切除不能な進行又は再発胃癌患者の治療のための医薬

発明者：菊池正二郎、篠原尚、笹子三津留、三輪洋人、城森孝仁、岸本裕充、野口一馬

権利者：1)学校法人兵庫医科大学、2)OC バイオサイエンス株式会社

種類：特許

番号：16/495045

出願年月日：2019 年 9 月 17 日

国内外の別：外国

取得状況(計 1 件)

名称：標準化学療法に不応又は不耐で治癒切除不能な進行又は再発胃癌患者の治療のための医薬

発明者：菊池正二郎、篠原尚、笹子三津留、三輪洋人、城森孝仁、岸本裕充、野口一馬

権利者：1)学校法人兵庫医科大学、2)OC バイオサイエンス株式会社

種類：特許

番号：6704594

取得年月日：2020 年 5 月 15 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

笹子 三津留 (Sasako, Mitsuru)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40143490

前山 義博 (Maeyama, Yoshihiro)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80614031

(3)連携研究者

該当なし()

研究者番号：

(4)研究協力者

落合 淳志 (Ochiai, Atsushi)

独立行政法人国立がん研究センター・

研究所副所長

研究者番号：601830341

松井 毅 (Matsui, Takeshi)

理化学研究所・副チームリーダー

研究者番号：10452442