

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462037

研究課題名(和文)胃癌における上皮間葉移行(EMT)制御によるリンパ管浸潤抑制の治療応用

研究課題名(英文)Therapeutic effect of suppression of lymphatic invasion by regulating epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer

研究代表者

和田 則仁(Wada, Norihito)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40256087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、胃癌における上皮間葉移行(EMT)を制御することでリンパ管浸潤を抑制し、治療的応用を検討することを目的とした。先行研究で着目してきたHOXB9と胃癌の悪性度の関係を調べた。臨床検体を用いたHOXB9免疫染色の臨床病理学的検討で、HOXB9発現とリンパ節転移、リンパ管・血管浸潤との関連が認められた。また生存予後との関連も認められた。HOXB9を遺伝子導入した胃癌株TMK-1でリンパ管新生因子の発現亢進が認められた。胃癌ではHOXB9がリンパ管新生を誘導することで進展する可能性が示唆された。HOXB9分子に着目した胃癌の進展抑制の治療的応用は新たな治療戦略の一つとなる可能性が期待された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the therapeutic effect of suppression of lymphatic invasion by regulating epithelial-mesenchymal transition (EMT) in gastric cancer. Clinicopathological study using gastric cancer specimen revealed that patients with HOXB9 expression have higher node metastasis and vascular/lymphovascular infiltration. HOXB9 positive group had worse overall survival, as well. We established a gastric cancer cell line TMK-1 with HOXB9 gene and showed higher level of lymphangiogenic factors using RT-PCR. HOXB9 would be a promising molecule which could suppress the gastric cancer progression in the aspect of lymphatic invasion.

研究分野：一般・消化器外科

キーワード：胃癌 リンパ節転移 リンパ管新生 HOXB9 上皮間葉移行 浸潤能 幹細胞性 リンパ管新生

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで胃癌の浸潤・転移におけるマトリックス分解酵素 (MMP) の関与を研究し報告してきた。肝細胞癌における MMP-1 の特徴的な発現 (Okazaki I, Wada N, et al.: *Hepatology* 1997;25:580-4) を解明するとともに、胃癌における MMP-1 の発現を報告した (Otani Y, et al. *J Gastroenterol* 1994;29:391-7)。MMP 阻害 (Kimata M, Wada N, et al.: *Jpn J Cancer Res* 2002;93:834-41、Minagawa A, Wada N, et al.: *Jpn J Cancer Res* 2001;92:1322-8) により胃癌の腹膜転移が抑制されることを報告した。この機序として血管新生阻害が関与することを明らかにしてきた (Wada N, et al.: *Clin Exp Meta* 2003;20:431-5)。

胃癌の進展様式には、血行性転移および直接浸潤があるが、リンパ行性転移は比較的早期からみられ、予後規定因子となることが多い。リンパ行性転移の制御に着目した研究はなく、この方面からのアプローチは胃癌の新たな治療戦略を築く成果が期待できる。

我々はこれまで規管形成に関わる homeobox 遺伝子群のうち HOXB9 に着目し、種々の癌における悪性度との関連を研究してきた (Hayashida, et al. *PNAS* 2010;107(3) 1100-1105、Seki, et al. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(6):1831-40)。乳癌では HOXB9 の発現により Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) が誘導され (図左)、転移浸潤能が増強し、血管新生関連因子の発現がみられることを報告した。さらに大腸においては、HOXB9 が bevacizumab による抗血管新生療法の biomarker のひとつとなりうることを報告してきた (Hoshino Y, et al. *Mol Cancer*. 2014; 13:102 1-14)。

先行研究 (基盤 C、H22-H24 年度) により、臨床検体における HOXB9 の発現を検討したところ、リンパ節転移およびリンパ管浸潤と関連がみられ、また HOXB9 発現例が予後不良であることが判明した。このことから、胃癌において HOXB9 がリンパ節転移に関与しており、また HOXB9 の制御によりリンパ行性転移が抑制できる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

研究期間内に明らかにすることとして、以下の3点を計画した。

[A] 臨床検体より得られた結果について、さらに症例数増やして結果の妥当性を確認する。また他の臨床病理学的因子と HOXB9 および EMT のマーカーとの関連を調査する。有意な結果が得られた場合、prospective に臨床検体を検討し、胃癌のリンパ節転移予測因子となるかどうか、高い臨床的エビデンスとして追及する。

[B] In vitro では、これまでに得られた HOXB9 低発現胃癌細胞株の TMK-1 に HOXB9 遺伝子を導入する。培養細胞の EMT、悪性度 (浸潤能、増殖能)、血管新生・リンパ管新生

関連因子の発現を、HOXB9 遺伝子の発現を調節して検討する。

[C] In vivo では、免疫不全マウスの xenograft モデルにおいて、HOXB9 遺伝子の発現を調節しながら、EMT、腫瘍の増殖能、脈管浸潤能を評価する。また得られた腫瘍における種々の病理学的因子を評価する。さらにリンパ節転移モデルを用いて HOXB9 のリンパ節転移形成への関与を検討する。HOXB9 の発現調節によるリンパ節転移能の変化を検討し、HOXB9 をターゲットにしたリンパ行性転移の治療応用を検討する。

さらに、学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義として、以下の点が挙げられる。

固形癌では HOXB9 による EMT 誘導に関する研究は、これまで欧米を中心に血行性転移が主体の乳癌や大腸癌を対象に行われてきている。一方、リンパ行性転移が特徴的な胃癌は欧米では稀な疾患であることから、胃癌研究は我が国および東アジアを中心に進められており、この方面の研究が相対的に立ち遅れており、また国際的に優位に立てる分野といえる。HOXB9 の基礎的研究は、分担研究者の林田が米国留学中から取り組んでおり、他の研究者に比し有利な立場にあり、独創性が極めて高い。

我々は以前からマトリックス代謝に着目して胃癌の浸潤転移を研究してきた。EMT という新たな視点からこれまでの研究を再構築することで、飛躍的な学問の進歩が期待される。また当科は数多くの胃癌症例を取り扱っていることから、臨床検体の獲得が容易である点で有利である。また、臨床へのフィードバックを展望した研究の進捗が期待できる。さらに、大教室制による学際性と豊富な人材により、他のグループの研究手法を容易に取り込める環境が醸成している点も有利といえる。特に教室ではセンチネルリンパ節研究の豊富な経験を有し、さまざまな研究手法が確立している。

既に HOXB9 とリンパ節転移およびリンパ管浸潤との preliminary な結果が得られていることから、胃癌における EMT 制御によりリンパ管浸潤を抑制できる可能性が高く、HOXB9 をターゲットにした治療応用の可能性も期待される。少なくとも HOXB9 および関連した因子が、胃癌のリンパ節転移の独立した予測因子となりうる可能性が高い。

胃癌は内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) などの局所治療が大きく進歩してきたが、リンパ節転移のリスクがある場合には、リンパ節郭清を伴う胃切除が必要である。リンパ節転移の機序解明と、高リスク群の絞り込み手法の確立は、ESD の適応拡大にも応用しうるため、低侵襲治療の機会拡大になり、早期胃癌患者にとって大きな福音となりうる。

3. 研究の方法

(1)- 当院における胃癌切除検体 69 例を用いて HOXB9 の発現の確認を免疫染色にて行った。HOXB9 陽性群と陰性群で、進行度・組織型・リンパ管浸潤・静脈浸潤・予後などの項目につき、臨床病理学的患者比較を行った。

さらにリンパ管マーカーである D2-40 を用いて胃癌臨床検体のリンパ管濃度を免疫染色にて評価し、HOXB9 陰性群と陽性群での比較を行った。

(2)- 我々が保有する胃癌細胞培養株 5 種 (TMK-1, MKN-28, MKN-45, MKN-74, KATO) の HOXB9 発現を定量的 PCR 法にて比較解析した。そこで最も HOXB9 が低発現であった TMK-1 に対し、ウイルスベクターを用いて HOXB9 を高発現させた TMK-1/HOXB9 とコントロール株である TMK-1/LacZ を作成した。

この細胞株を用いて HOXB9 による EMT の誘導を評価した。具体的には定量的 PCR 法にて EMT マーカーである E Cadherin, N Cadherin, Vimentin, Snail, Slug, Twist の発現量の変化を解析した。さらには増殖能・遊走能・浸潤能の変化を検討した。具体的には MTT Assay, Scratch Assay, Invasion Assay を行った。

HOXB9 誘導による血管新生およびリンパ管新生を検討した。具体的には、血管新生マーカー (VEGF-A, bFGF, IL-8, ANGPTL2, TGF- β 1, TGF- β 2)・リンパ管新生マーカー (VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3) の比較を PCR 法にて行った。

(3) Tet on System にて作成した胃癌細胞株 TMK-1/TR/HOXB9 を免疫不全マウスの背部に移植した Xenograft モデルを作成した。この細胞はテトラサイクリン経口投与にて、In vitro にても HOXB9 発現調節が可能である。本実験にて HOXB9 発現による継時的な腫瘍径と重量の増大を比較解析した。

4. 研究成果

(1)- HOXB9 を免疫染色し、染色強度と染色範囲でスコアリングし陰性か陽性かを判定した (図 1)。胃癌切除検体 69 例のうち、HOXB9 陰性は 30 例、陽性は 39 例と陽性率は 56.5% であった。

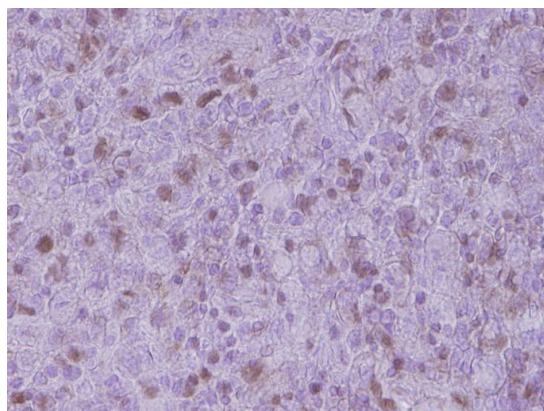


図 1 HOXB9 陽性の免疫染色例

HOXB9 陽性群では腫瘍深達度が深く

($p=0.012$)、リンパ節転移陽性例が有意に多かった ($p=0.007$)。さらに、リンパ管浸潤 ($p=0.003$) および静脈浸潤 ($p=0.017$) も有意に多いという結果であった (表 1)。HOXB9 は胃癌の悪性度と相関しているものと考えられた。

表 1 HOXB9 発現の臨床病理学的特徴

		HOXB8		P 値
		陰性 n=30	陽性 n=39	
性	男性	23	28	0.78
	女性	7	11	
年齢	< 60	18	17	0.23
	60	12	22	
深達度	T1-2	16	9	0.012
	T3-4	14	30	
リンパ節 転移	(-)	19	11	0.007
	(+)	11	28	
ly	(-)	14	5	0.003
	(+)	16	34	
v	(-)	14	7	0.017
	(+)	16	32	

さらに予後についても解析した (図 2)。HOXB9 陽性の胃癌は有意に全生存率が低いという結果が得られた。HOXB9 は胃癌の予後規定因子である可能性が示唆された。

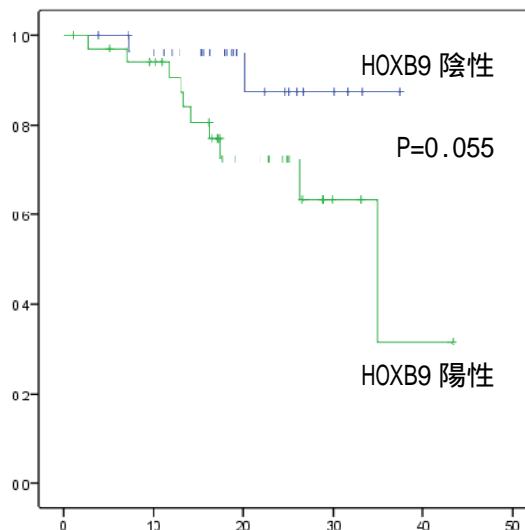


図 2 HOXB9 発現と予後 (全生存率)

(1)- 我々の保有している胃癌検体は主に病理学的診断の前に腫瘍から採取した癌組織の小片であった。リンパ管は主に粘膜下組織に存在するため、我々の検体では評価困難であった。臨床検体におけるリンパ管新生の評価は断念した。

(2)- HOXB9 低発現胃癌野生株である TMK-1 に対し、HOXB9 発現調整を行い、定量的 PCR 法により Transfectant の mRNA が首尾よく亢進していることを確認した。

(2)- TMK-1/HOXB9 とそのコントロールとの

比較実験において、EMT マーカーの変化は確認できなかった。また、MTT Assay、Scratch Assay、Invasion Assay においても明らかな差は確認されなかった。

(2)- TMK-1/HOXB9 とそのコントロールとの比較実験において、各種血管新生マーカーの mRNA 発現の変化は確認できなかった。一方で、リンパ管新生マーカーである VEGF-D の mRNA 発現量が TMK-1/HOXB9 で亢進していることが PCR 法により確認された (図 3)。

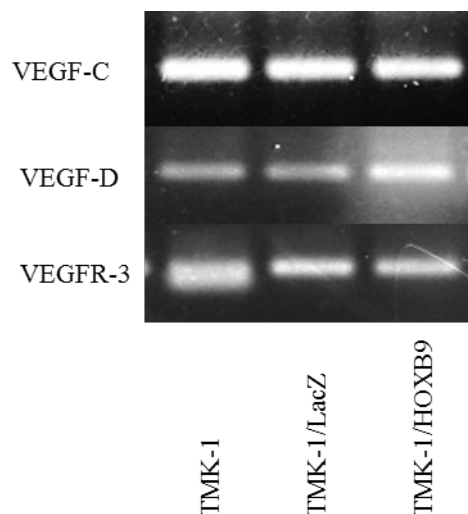


図 3 リンパ管新生マーカー発現

(3)マウス Xenograft モデルにおいて、HOXB9 高発現腫瘍とコントロールの間には、腫瘍径および腫瘍重量に関して有意な差は観察されなかった。

本研究では、HOXB9 発現は胃癌において悪性度と正の相関があり、予後不良因子であることが判明した。仮説で考えた EMT の誘導や血管新生の亢進については今回の一連の実験では証明されなかった。しかし、HOXB9 がリンパ管新生を導く可能性について示された。HOXB9 発現がリンパ管新生を導き、リンパ節転移が起こることにより予後が増悪している可能性が示唆された。HOXB9 は、胃癌の制御における、新しい治療ターゲット、およびバイオマーカーとなる可能性が示唆され、さらなる研究が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

Imaeda H, Wada N (15 more authors, 11th). Percutaneous endoscopic gastrostomy under steady pressure automatically controlled endoscopy: First clinical series. *World J Gastrointest Endosc* (peer reviewed) 8: 2016, 186-191
doi: 10.4253/wjge.v8.i3.186.

Niihara M, Wada N (6 more authors, 6th). Sentinel lymph node mapping for 385 gastric cancer patients. *J Surg Res* (peer

reviewed) 200: 2016, 73-81

doi: 10.1016/j.jss.2015.06.064.

Takesue T, Wada N (7 more authors, 7th). A Prospective Randomized Trial of Enteral Nutrition After Thoracoscopic Esophagectomy for Esophageal Cancer. *Ann Surg Oncol* (peer reviewed) 22: 2015, 802-809

doi: 10.1245/s10434-015-4767-x.

Matsuda S, Wada N (7 more authors, 7th). Correlation Between Intense Postoperative Inflammatory Response and Survival of Esophageal Cancer Patients Who Underwent Transthoracic Esophagectomy. *Ann Surg Oncol* (peer reviewed) 22: 2015, 4453-4460
doi: 10.1245/s10434-015-4557-5.

Takeuchi H, Wada N (5 more authors, 6th). Clinical Significance of Sentinel Node Positivity in Patients with Superficial Esophageal Cancer. *World J Surg* (peer reviewed) 39: 2015, 2941-2947

doi: 10.1007/s00268-015-3217-z.

Tsutsui M, Wada N (9 more authors, 7th). Comprehensive screening of genes resistant to an anticancer drug in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* (peer reviewed) 47: 2015, 867-874
doi: 10.3892/ijo.2015.3085.

Okamura A, Wada N (9 more authors, 8th). Factors affecting cytokine change after esophagectomy for esophageal cancer. (peer reviewed) *Ann Surg Oncol* 22: 2015, 3130-3135

doi: 10.1245/s10434-014-4348-4.

Booka E, Wada N (10 more authors, 9th). The impact of postoperative complications on survivals after esophagectomy for esophageal cancer. (peer reviewed) *Medicine (Baltimore)* 94: 2015, e1369
doi: 10.1097/MD.0000000000001369.

Nishi T, Wada N (10 more authors, 9th). CXCR2 expression and postoperative complications affect long-term survival in patients with esophageal cancer. (peer reviewed) 13: 2015, 1-9

doi: 10.1186/s12957-015-0658-7.

Takahashi M, Wada N (7 more authors, 6th). Surgical Resection of Remnant Gastric Cancer Following Distal Gastrectomy: A Retrospective Clinicopathological Study. *Ann Surg Oncol* (peer reviewed) 22: 2015, 511-521
doi: 10.1245/s10434-015-4678-x.

〔学会発表〕(計 40 件)

Wada N, Furukawa T, Kitagawa Y. Clinical results of a single-institution experience in single-port laparoscopic totally extraperitoneal inguinal hernia repair under local anesthesia with

conscious sedation. 1st World Conference on Abdominal Wall Hernia Surgery. 2015/4/27, Milan (Italy)

Kawakubo H, Wada N (6 more authors, 5th) HOXB9 expression associate with lymphatic invasion in superficial pharyngeal carcinoma. AACR Annual Meeting 2014. 2014/4/6, San Diego (USA)

Kato F, Wada N, Hayashida T (9 more authors, 1st, 2nd, 3rd) HOXB9 expression and cancer progression. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. 2013/12/17, Tokyo Bay Maihama Hotel (Chiba・Urayasu)

〔図書〕(計1件)

Wada N, Furukawa T, Kitagawa Y. Springer, Reduced Port Laparoscopic Surgery. 2014, 527 pages (363-370)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：医療用処置具把持具

発明者：矢作直久、和田則仁(他4名、2番目)

権利者：学校法人慶應義塾(他3社)

種類：特許

番号：特願 2015-72559

出願年月日：平成27年3月31日

国内外の別：国際段階(PCT出願)

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

慶應義塾大学医学部一般・消化器外科上部消化管班ホームページ

http://keiosurg.net/study_group/joubusyoka.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 則仁 (WADA, Norihito)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号：40256087

(2) 研究分担者

林田 哲 (HAYASHIDA, Tetsu)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号：80327543

(3) 連携研究者

加藤 文彦 (KATO, Fumihiko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90573428