

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461978

研究課題名(和文)炎症性微小環境に起因する胃癌の悪性化進展機構の解明と抗悪性化療法の開発

研究課題名(英文) Development of anti-metastasis therapy in the inflammation-related gastric cancer progression

研究代表者

西崎 正彦 (NISHIZAKI, MASAHIKO)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：30379789

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)：慢性炎症に伴う炎症性微小環境は胃癌発生の重要な危険因子である。本研究では、炎症性微小環境の線維芽細胞やマクロファージが胃癌の悪性化進展過程に促進的に関与することを明らかにした。さらに、癌特異的に増殖して癌抑制遺伝子p53を誘導する腫瘍融解アデノウイルス製剤OBP-702が胃癌の腹膜播種性転移を強力に抑制する新たな治療戦略となる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation-related inflammatory microenvironment is a risk factor in gastric cancer development. In this study, we showed the promoting effect of inflammatory microenvironment, such as stromal fibroblast and macrophage, in gastric cancer progression. Moreover, we confirmed that a tumor-specific replication-competent oncolytic adenovirus OBP-702 that induces tumor suppressor p53 gene had a therapeutic potential to induce profound anti-tumor effect against intraperitoneal metastasis of gastric cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 慢性炎症 微小環境 悪性化進展 p53

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ菌の感染に伴う慢性胃炎は、胃癌発生の重要な危険因子である。正常胃上皮細胞から胃癌細胞が発生する発癌過程への慢性炎症の関与は広く研究されているが、低悪性度胃癌細胞が高悪性度胃癌細胞に悪性化進展する過程における慢性炎症の関与については不明瞭である。近年、胃癌細胞の悪性化進展過程に周囲の微小環境の関与が次第に明らかとなっている。間質を多く含む未分化型スキルス胃癌では、間質内に存在する活性化した線維芽細胞が胃癌細胞の浸潤や腹膜播種転移に促進的に作用する。一方、多くの胃癌患者が罹患する分化型腺癌は慢性炎症に伴い発症し、進行した場合には浸潤傾向を示し、肝臓や肺などへ血行性転移を起こす。しかし、炎症性微小環境が分化型胃癌細胞の悪性化進展にどのように関与するかについては不明である。そのため、胃癌の浸潤や転移に対する有効な治療法は未だ確立していない。

胃癌の治療抵抗性や悪性化進展に關与する胃癌幹細胞は、重要な治療標的として近年注目されている。我々は、癌特異的に制限増殖するアデノウイルス製剤 OBP-301 (テロメライシン) を開発し、OBP-301 が胃癌幹細胞に対して抗腫瘍効果を発揮する事を明らかにした。さらに、癌抑制遺伝子 p53 を発現する癌特異的制限増殖型アデノウイルス製剤 OBP-702 を開発し、OBP-702 が OBP-301 よりも強力な治療効果を発揮する事を明らかにした。以上の研究成果より、OBP-702 は悪性化進展を示す胃癌細胞に対して強力な細胞死を誘導し、新たな抗悪性化療法の開発につながる可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、胃癌の悪性化進展過程における炎症性微小環境の関与とその分子機構を明らかにし、癌抑制遺伝子 p53 の発現誘導によって胃癌細胞と微小環境を制御する新たな抗悪性化療法の開発を行う事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 分化度の異なる胃癌細胞と線維芽細胞との相互作用の検証

分化度の異なるヒト胃癌細胞株 4 種類 (高分化型腺癌(MKN7)、中分化型腺癌(MKN74)、低分化型腺癌(MKN45)、未分化型スキルス癌(KatoIII))と微小環境を構成するヒト線維芽細胞株 2 種類 (WI-38、FEF3) との相互作用について検討した。

(2) 活性化線維芽細胞が胃癌細胞の遊走能に与える影響とメカニズムの検証

胃癌細胞が誘導する活性化線維芽細胞がヒト高分化型胃癌細胞株 MKN7 の遊走能に及ぼす影響と炎症性サイトカインの関与について検討した。

(3) マクロファージのタイプ別による胃癌細胞への EMT 誘導能の検証

炎症性微小環境に存在する 3 種類のマクロファージ (M0 型、M1 型、M2 型) を作成し、ヒト高分化型胃癌細胞株 MKN7 の悪性化進展に關与する上皮間葉系移行 (EMT) の誘導能を検討した。

(4) 胃癌細胞に対する p53 誘導性ウイルス製剤の治療効果と治療メカニズムの検証

癌抑制遺伝子 p53 の遺伝的背景が異なる 3 種類のヒト未分化型スキルス胃癌細胞株 (NUGC4(p53 正常型)、GCIY(p53 変異型)、KatoIII (p53 欠損型)) に対する 2 種類の p53 誘導性ウイルス製剤 (非増殖型 Ad-p53、癌特異的増殖型 OBP-702) の治療効果とアポトーシスやオートファジーの誘導能を検討した。さらに、胃癌の悪性化に重要と考えられるチロシンキナーゼ型受容体 (RTK) の発現についてウイルス感染後の変化を検討した。

(5) 胃癌細胞のスフェロイド形成に対する p53 誘導性ウイルス製剤の治療効果と細胞死誘導の検証

癌抑制遺伝子 p53 の遺伝的背景が異なる 3 種類のヒト未分化型スキルス胃癌細胞株を用いて腹膜播種性転移を想定して 3 次元培養法で作成したスフェロイドに対する 2 種類の p53 誘導性ウイルス製剤 (Ad-p53、OBP-702) の治療効果とアポトーシスの誘導能を検討した。

(6) 胃癌細胞の腹膜播種性転移に対する p53 誘導性ウイルス製剤の治療効果の検証

ルシフェラーゼ遺伝子を導入したヒト未分化型スキルス胃癌細胞株 GCIY-Luc (p53 変異型) を用いて胃癌腹膜播種マウスモデルを作製し、2 種類の p53 誘導性ウイルス製剤 (Ad-p53、OBP-702) の治療効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 分化度の異なる胃癌細胞と線維芽細胞との相互作用の検証

4 種類の胃癌細胞株を無血清培地で 48 時間培養し、細胞成分を除いた無血清培地を回収した。各胃癌細胞株由来の無血清培地でヒト線維芽細胞株 WI-38 と FEF3 を 5 日間培養し、線維芽細胞の活性化について形態学的変化や癌関連線維芽細胞マーカー (α -SMA、FAP) の発現をウェスタンブロット法で検証した。

高分化型胃癌細胞株 MKN-7 と中分化型胃癌細胞株 MKN-74 由来の無血清培地の処理によって、ヒト線維芽細胞株 WI-38 と FEF3 は活性化を示す筋線維芽細胞様の紡錘形で密に収縮した形態変化を示し、 α -SMA の発現が増加したが、FAP の発現は変化しなかった。一方、低分化型胃癌細胞株 MKN45 と未分化型スキルス胃癌細胞株 KatoIII 由来の無血清培地の処理によって、ヒト線維芽細胞株

WI-38 と FEF3 は活性化を示す形態変化やマーカーの発現変化を認めなかった。以上より、高分化型や中分化型の Intestinal type (腸型) の胃癌細胞は低分化型や未分化型の Diffuse type (びまん型) の胃癌細胞よりも活性化線維芽細胞を誘導する可能性が示唆された。

(2) 活性化線維芽細胞が胃癌細胞の遊走能に与える影響とメカニズムの検証

ヒト高分化型胃癌細胞株 MKN7 の無血清培地をヒト線維芽細胞株 FEF-3 に処理して活性化線維芽細胞を誘導した際の培養上清を回収し、MKN7 細胞に処理した場合に MKN7 細胞の遊走能が有意に上昇した。さらに、活性化線維芽細胞が分泌する炎症性サイトカインの TGF- β で MKN7 細胞を処理した場合、形態学的に間葉系形質を示す紡錘形に変化した。以上より、活性化線維芽細胞は TGF- β を介して分化型胃癌細胞に EMT を誘導する可能性が示唆された。

(3) マクロファージのタイプ別による胃癌細胞への EMT 誘導能の検証

マウスマクロファージ RAW264.7 細胞から未処理 (M0 型)、LPS/IFN- γ 処理 (M1 型)、IL-4 処理 (M2 型) の 3 種類の RAW264.7 細胞を作成した。3 種類の RAW264.7 細胞と MKN7 細胞を共培養した場合、全てのタイプの RAW264.7 細胞が MKN7 細胞の上皮系マーカーである E-カドヘリン発現を低下させた。以上より、炎症性微小環境に存在するマクロファージは分化型胃癌細胞に EMT を誘導する可能性が示唆された。

(4) 胃癌細胞に対する p53 誘導性ウイルス製剤の治療効果と治療メカニズムの検証

3 種類のヒト未分化型スキルス胃癌細胞株 (NUGC4, GCIY, KatoIII) に 2 種類の p53 誘導性ウイルス製剤 (Ad-p53、OBP-702) を感染後 72 時間において、XTT アッセイで細胞生存率を評価した。全ての胃癌細胞株において、OBP-702 は Ad-p53 よりも強力な抗腫瘍効果を示した。ウイルス感染後 72 時間に Ad-p53 は軽度のアポトーシスの誘導を認め、OBP-702 は著明なアポトーシスとオートファジーの誘導を認めた。さらに、胃癌の悪性化に関与する 3 種類の RTK (c-Met、EGFR、FGFR2) の発現は、細胞死の誘導に一致して OBP-702 が Ad-p53 よりも強力に抑制する事を確認した。以上より、OBP-702 は Ad-p53 よりも未分化型胃癌細胞に対して RTK の抑制を介して強力に細胞死を誘導するがん治療用ウイルスである可能性が示唆された。

(5) 胃癌細胞のスフェロイド形成に対する p53 誘導性ウイルス製剤の治療効果と細胞死誘導の検証

3 種類のヒト未分化型スキルス胃癌細胞株 (NUGC4, GCIY, KatoIII) が形成するスフェロイドに 2 種類の p53 誘導性ウイルス製剤

(Ad-p53、OBP-702) を 6 日間感染させた場合の細胞死の誘導について、Live/Dead アッセイとカスパーゼ 3 アッセイにて検討した。Ad-p53 はスフェロイド辺縁のみにアポトーシス細胞死を誘導したのに対し、OBP-702 はスフェロイド辺縁部と中心部にアポトーシス細胞死を誘導した。以上より、OBP-702 は Ad-p53 よりも未分化型胃癌細胞の転移巣に対して強力に細胞死を誘導できる可能性が示唆された。

(6) 胃癌細胞の腹膜播種性転移に対する p53 誘導性ウイルス製剤の治療効果の検証

ルシフェラーゼ発現ヒト未分化型スキルス胃癌細胞株 GCIY-Luc (2×10^6 細胞) をヌードマウス 24 匹の腹腔内に移植し、移植後 13 日目に IVIS システムを用いて腹膜播種転移の形成をルシフェラーゼ発光強度で確認した。8 匹ずつの 3 群に分けた後に移植後 14 日目から 1 週間おきに 3 回、腹腔内に PBS 投与 (Mock 群)、Ad-p53 (1×10^8 PFU) 投与 (Ad-p53 投与群)、OBP-702 (1×10^8 PFU) 投与 (OBP-702 投与群) を行った。癌細胞移植後 20、27、34、41、48 日目に IVIS システムによる腹膜播種転移のルシフェラーゼ発光強度を観察し、治療効果を検討した。OBP-702 は Ad-p53 よりも強力に腹膜播種転移の形成を抑制する事を確認した。一方、Ad-p53 は Mock 群と比較して腹膜播種転移の形成を抑制できなかった。以上より、OBP-702 は Ad-p53 よりも強力に未分化型胃癌細胞の腹膜播種転移を抑制する可能性が示唆された。

本研究の結果から、炎症性微小環境に存在する線維芽細胞やマクロファージは、分化型胃癌細胞に対して EMT の誘導を介して悪性化進展を促進させる可能性が示唆された。さらに、p53 誘導性癌特異的増殖型アデノウイルス製剤 OBP-702 は、すでに臨床応用されている p53 誘導性非増殖型アデノウイルス製剤 Ad-p53 よりも強力に RTK の抑制や細胞死を誘導して未分化型胃癌細胞の腹膜播種転移を抑制する抗悪性化療法となる可能性が示唆された。

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 10 件)

Kikuchi S, Kagawa S, Kubota T, Kuwada K, Kuroda S, Nishizaki M, Tanaka T, Fujiwara T. Pathological complete response in a case of advanced gastric cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 2014;41:2282-2284. (査読あり)

Kubota T, Kagawa S, Kikuchi S, Kuroda S, Nishizaki M, Fujiwara T. Two cases of stage IV gastric cancer responding to chemotherapy and leading to pathological complete response. *Gan*

To Kagaku Ryoho 2014;41:2308-2310. (査読あり)

Kuroda S, Kubota T, Aoyama K, Kikuchi S, Tazawa H, Nishizaki M, Kagawa S, Fujiwara T. Establishment of a non-invasive semi-quantitative bioluminescent imaging method for monitoring of an orthotopic esophageal cancer mouse model. *PLoS One* 2014;9:E114562. (査読あり)

Kikuchi S, Kishimoto H, Tazawa H, Hashimoto Y, Kuroda S, Nishizaki M, Nagasaka T, Shirakawa Y, Kagawa S, Urata Y, Hoffman RM, Fujiwara T. Biological ablation of sentinel lymph node metastasis in submucosally invaded early gastrointestinal cancer. *Mol Ther* 2015;23:501-509. (査読あり)

Shigeyasu K, Tazawa H, Hashimoto Y, Mori Y, Nishizaki M, Kishimoto H, Nagasaka T, Kuroda S, Urata Y, Goel A, Kagawa S, Fujiwara T. Fluorescence virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumor cells for non-invasive companion diagnostics. *Gut* 2015;64:627-635. (査読あり)

Yamatsuji T, Fujiwara Y, Matsumoto H, Hato S, Namikawa T, Hanazaki K, Takaoka M, Hayashi J, Shigemitsu K, Yoshida K, Urakami A, Uno F, Nishizaki M, Kagawa S, Ninomiya M, Fujiwara T, Hirai T, Nakamura M, Haisa M, Naomoto Y. Feasibility of oral administration of S-1 as adjuvant chemotherapy in gastric cancer: 4-week S-1 administration followed by 2-week administration followed by 1-week rest. *Mol Clin Oncol*, 2015;3:527-532. (査読あり)

Kuwada K, Kuroda S, Kikuchi S, Hori N, Kubota T, Nishizaki M, Kagawa S, Fujiwara T. Strategic approach to concurrent aberrant left gastric vein and aberrant left hepatic artery in laparoscopic distal gastrectomy for early gastric cancer: A case report. *Asian J Endosc Surg*, 2015;8:454-456. (査読あり)

Kuroda S, Nishizaki M, Kikuchi S, Noma K, Tanabe S, Kagawa S, Shirakawa Y, Fujiwara T. Double-flap technique as an antireflux procedure in esophagogastrectomy after proximal gastrectomy. *J Am Coll Surg*, 2016;223:e7-e13. (査読あり)

Kikuchi S, Kagawa S, Ohara T, Kubota T, Kuwada K, Kagawa T, Kuroda S, Shirakawa Y, Nishizaki M, Fujiwara T. Recurrence after endoscopic curative resection of mucosal gastric cancer associated with an adjacent neoplastic precursor lesion. *Acta Med Okayama* 2016;70:213-216. (査読あり)

Kikuchi S, Nishizaki M, Kuroda S, Tanabe S, Noma K, Kagawa S, Shirakawa Y, Kato H, Okada H, Fujiwara T. Nonexposure laparoscopic and endoscopic cooperative surgery (closed laparoscopic and endoscopic cooperative surgery) for gastric submucosal tumor. *Gastric Cancer* 2016;20:553-557. (査読あり)

[学会発表](計 12 件)

Watanabe M, Kagawa S, Ishida M, Hori N, Kikuchi S, Kuroda S, Kishimoto H, Nishizaki M, Tazawa H, Urata Y, Fujiwara T. Virus-guided fluorescence imaging of intraperitoneal gastric cancer cells as an alternative to cytology. **第20回日本遺伝子治療学会**, 2014年8月8日、東京

渡邊めぐみ、香川俊輔、石田道拓、橋本悠里、堀直人、菊地覚次、黒田新士、岸本浩行、西崎正彦、田澤大、浦田泰生、藤原俊義：蛍光発現ウイルスを用いた腹腔内がん細胞の検出技術の開発。 **第73回日本癌学会学術総会**, 2014年9月26日、横浜

堀直人、田澤大、西崎正彦、菊地覚次、矢野修也、石田道拓、渡邊めぐみ、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義：ヒトスキルス胃癌細胞に対する腫瘍融解アデノウイルスの抗腫瘍効果。 **第73回日本癌学会学術総会**, 2014年9月26日、横浜

Li Y, Tazawa H, Nishizaki M, Hashimoto Y, Hori N, Katsube R, Kuroda S, Noma K, Kagawa S, Fujiwara T. Differentiated gastric cancer cells have a potential to induce cancer-associated fibroblasts. *106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 2015年4月20日、Philadelphia, USA

Hori N, Tazawa H, Nishizaki M, Kikuchi S, Yano S, Ishida M, Watanabe M, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. Preclinical study of telomerase-specific p53 tumor suppressor overexpression in human scirrhous gastric cancer cells with different p53 status. *106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, 2015年4月20日、Philadelphia, USA

Hori N, Tazawa H, Nishizaki M, Watanabe M, Tamura S, Koujima T, Kuroda S, Urata Y, Kagawa S, Fujiwara T. Preclinical evaluation of telomerase-specific p53 tumor suppressor gene overexpression in human scirrhous gastric cancer cells with different p53 status. **第21回日本遺伝子治療学会**, 2015年7月25日、大阪

堀直人、田澤大、西崎正彦、渡邊めぐみ、田村周太、國府島健、黒田新士、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義：スキルス胃癌細胞に対する腫瘍特異的 p53 遺伝子治療の前臨床評価。 **第74回日本癌学会学術総会**, 2015年10月10日、名古屋

李云成、田澤大、西崎正彦、橋本悠里、堀直人、勝部亮一、黒田新士、野間和広、香川俊輔、藤原俊義：分化型胃癌細胞による癌関連線維芽細胞の活性化機構。 **第74回日本癌学会学術総会**, 2015年10月10日、名古屋

Ieda T, Tazawa H, Kikuchi S, Kuroda S, Ohara T, Noma K, Kishimoto H, Nagasaka T, Nishizaki M, Kagawa S, Fujiwara T. A novel imaging system for inflammation-induced epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancers *107th Annual Meeting of*

the American Association for Cancer Research,
2016年4月16日~2016年4月20日、New
Orleans, USA

Tazawa H, Hori N, Koujima T, Kuwada K,
Tanimoto T, Kuroda S, Nishizaki M, Urata Y,
Kagawa S, Fujiwara T. Inhibition of peritoneal
dissemination of scirrhous gastric cancer by
oncolytic adenovirus-mediated activation of
tumor suppressor p53 and suppression of
oncogenic receptor tyrosine kinase. **第22回日本
遺伝子細胞治療学会**, 2016年7月28日~2016
年7月30日、東京

田澤 大、堀 直人、國府島 健、谷本光
隆、家田偉史、渡邊めぐみ、黒田新土、西崎
正彦、浦田泰生、香川俊輔、藤原俊義：p53
活性化能を有するテロメラーゼ標的型ウイル
ス療法による腹腔内胃癌微小環境の浄化
作用。 **第75回日本癌学会学術総会**, 2016年
10月6日~2016年10月8日、横浜

家田偉史、田澤 大、菊地覚次、黒田新土、
大原利章、野間和広、岸本浩行、永坂岳司、
西崎正彦、香川俊輔、今村健志、藤原俊義：
炎症性微小環境によって誘導される EMT の
蛍光生細胞イメージングシステム。 **第75回
日本癌学会学術総会**, 2016年10月6日~2016
年10月8日、横浜

〔図書〕(計 2 件)

Tazawa H, Kagawa S, Shigeyasu K, Fujiwara
T. *Advances in Medicine and Biology*. Volume
110. Nova Science Publishers, 2017;226
(95-114).

Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T. *Recent
Results in Cancer Research (Current Strategies in
Cancer Gene Therapy)*, Springer International
Publishing, 2016;121 (1-15).

〔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

西崎正彦 (NISHIZAKI MASAHIKO)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：30379789

(2) 研究分担者

田澤 大 (TAZAWA HIROSHI)

岡山大学・岡山大学病院・准教授

研究者番号：90415513

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし