

平成21年 5月18日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590726

研究課題名（和文） 腫瘍間質を標的とした胃癌に対する新しい治療法の開発

研究課題名（英文） Development of new therapeutic strategy for gastric cancer targeting to tumor stroma

研究代表者

北台 靖彦（KITADAI YASUHIKO）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 10304437

研究成果の概要：

胃癌組織においては、PDGFR の発現は間質において認められ、筋線維芽細胞、ペリサイト、リンパ管内皮細胞が主な発現細胞であった。ヌードマウス同所移植モデルを用い、PDGFR リン酸化阻害剤イマチニブの胃癌に対する治療実験を行ったところ、腫瘍間質の質的、量的変化、抗癌剤の腫瘍増殖抑制効果の増強作用が認められた。本研究により癌間質を標的とした胃癌に対する新しい治療法の可能性が示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード：胃癌、腫瘍間質、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

従来の癌研究は癌細胞自身の特性に重点をおくものが多数をしめる。しかしながら、腫瘍組織には豊富な間質組織を含み、癌細胞と間質構成細胞の相互作用が癌の増殖、進展に重要な働きをすることが推測されている。腫瘍間質は活性化した線維芽細胞（筋線維芽細胞あるいは癌関連間質細胞）、炎症細胞（免疫細胞）、血管内皮細胞、ペリサイトなどで構成されているが、これまで間質構成細胞を重点においた分子生物学的解析の報告は極めて少ない。

2. 研究の目的

癌細胞は遺伝子不安定性のため、遺伝子的に heterogeneous であり、抗癌剤耐性をきたし易い。それに対し、血管内皮細胞など間質の正常細胞は遺伝子的に homogeneous で薬剤耐性をきたし難いと考えられている。我々はこれまで、癌間質組織における血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、炎症細胞など、非腫瘍細胞に注目し、血管新生抑制療法に関する研究を行ってきたが、本研究では活性化した線維芽細胞、血管内皮を覆っているペリサイト、リンパ管内皮細胞に高発現している細胞増殖因子レセプターである platelet derived

growth factor receptor (PDGFR)を分子標的とした癌治療法の可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 胃癌組織における PDGF/レセプター系の発現とその意義

胃癌細胞株 5 株 (TMK-1, MKN-1, MKN-28, MKN-45, KKLS) とヒト胃癌組織 38 例において PDGFR- β と PDGF-BB の発現をそれぞれ real time PCR で測定し、リンパ節転移や胃癌組織型など臨床病理学的事項との関連を検討した。また、ヒト胃癌細胞のヌードマウス同所移植腫瘍やヒト胃癌組織を用いて蛍光免疫染色を行い、PDGFR- β と PDGF-BB 蛋白の局在を調べた。

(2) ヌードマウス同所移植モデルを用いた治療実験 (PDGFR チロシンリン酸化阻害剤を用いた治療実験)

マウスの胃壁にて間質反応の強い腫瘍を形成することが知られている TMK-1 細胞を用いた。TMK-1 同所腫瘍を PDGFR チロシンリン酸化阻害剤 (STI-571; イマチニブ) を用いて治療を行った。また、抗癌剤 (CPT-11) と PDGFR チロシンリン酸化阻害剤を併用し、腫瘍増殖抑制効果、転移抑制効果を検討した。

具体的には TMK-1 細胞 1×10^6 個をヌードマウスの胃壁に同所移植し、移植 2 週間後に下記の 4 群に分類し治療実験を開始した。

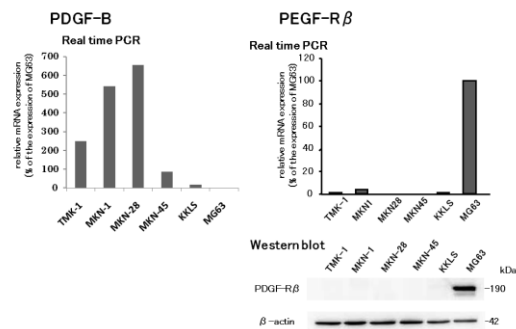
- ① コントロール群
- ② STI-571 単独投与群 (50mg/kg /day)
- ③ CPT-11 単独投与群 (5mg/kg /week)
- ④ CPT-11 + STI-571 併用群 (CPT-11 5mg/kg /week, STI-571 50mg/kg /day)

上記治療を 28 日間継続し、マウスの体重変化や腫瘍重量・体積、リンパ節転移の有無について評価し、パラフィンや凍結切片を用いて免疫組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) 胃癌細胞株における PDGF/レセプター系の発現。PDGFR- β は胃癌細胞株 5 株中 2 株 (KKLS, MKN-1) でわずかに mRNA を発現しているのみであったが、PDGF-BB は KKLS を除く 4 株で mRNA の強い発現を認めた (図 1)。

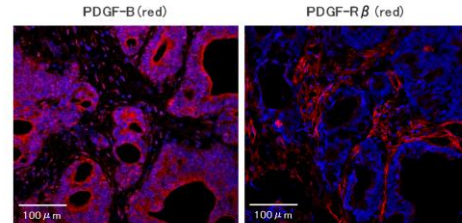
Expression of PDGF-B and PEGF-R β in gastric carcinoma cell lines



(2) 胃癌組織における PDGF/レセプター系の発現。

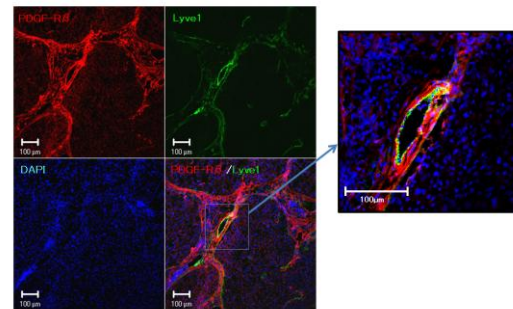
蛍光免疫染色にて PDGF/レセプター系蛋白の発現を検討したところ、ヒト胃癌組織では、PDGFR- β は間質の筋線維芽細胞に、PDGF-BB は癌細胞に免疫活性を認めた (図 2)。

Immunofluorescence (human gastric carcinoma specimen)



リンパ管内皮マーカーである Lyve1 と PDGFR- β との二重染色を行い共焦点顕微鏡にて強拡大で観察したところ、腫瘍リンパ管内皮は PDGFR- β を発現していることが確認された (図 3)。

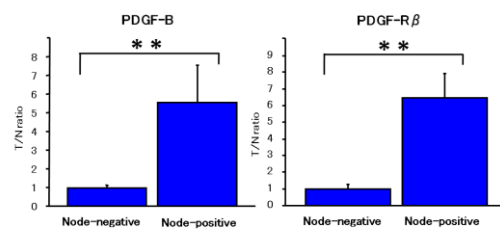
Immunofluorescence (TMK-1 orthotopic tumors)



(3) PDGF/レセプター系の発現と臨床病理学的事項との関連。

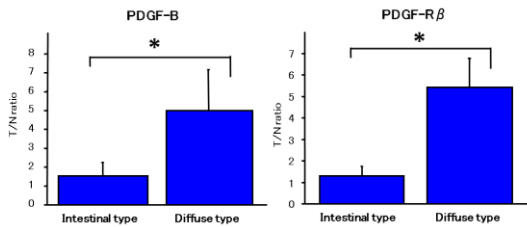
ヒト胃癌組織における PDGFR- β と PDGF-BB の mRNA 発現レベルと臨床病理学的事項を検討したところ、リンパ節転移のない群に比し、リンパ節転移のある群で PDGFR- β (P<0.001)、PDGF-BB (P=0.03) とともに有意に mRNA の発現が高かった (図 4)。

Correlation of PDGF-B and PDGF-R β mRNA expression with regional lymph node metastasis in human gastric carcinoma



胃癌では未分化型の癌でリンパ節転移のリスクが高いため、組織型と PDGFR-β や PDGF-BB の mRNA 発現レベルとの関連についても検討したところ、分化型腺癌に比し未分化型癌で PDGFR-β (P=0.01)、PDGF-BB (P=0.02) ともに有意に mRNA の発現が高か

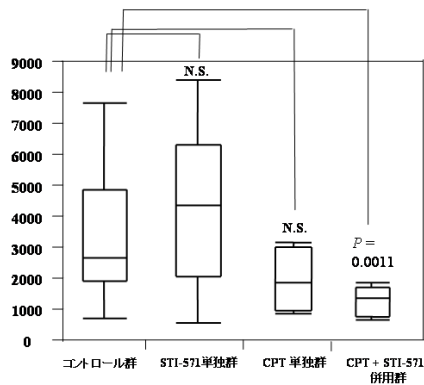
Correlation of PDGF-B and PDGF-Rβ mRNA expression with histological type in human gastric carcinoma



った (図 5)。

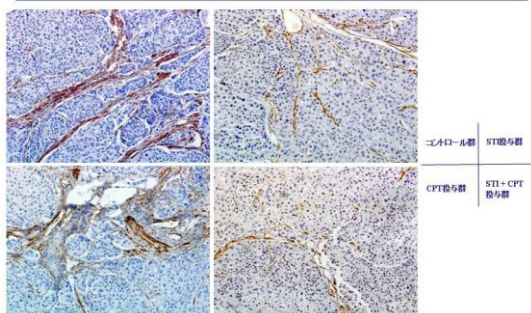
(4) ノードマウス同所移植モデルを用いた治療実験

PDGFR リン酸化阻害剤であるイマチニブを用いた治療実験を行ったが、イマチニブ単剤では腫瘍縮小効果は得られなかった。しかし、イマチニブと細胞障害性抗癌剤である CPT-11 との併用にて強い腫瘍増殖抑制効果が認められた (図 6)。

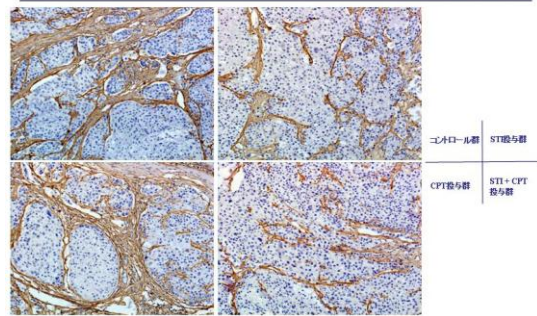


病理組織学検討では、イマチニブ治療群あるいは薬剤併用群では、腫瘍間質が減少していた (図 7、8)。

α-SMA免疫染色



Type1-Collagen免疫染色



(図 7: α-SMA 染色, 8: Type1-collagen 染色)

考察

胃癌組織においては、PDGFR の発現は間質において認められ、筋線維芽細胞、ペリサイト、リンパ管内皮細胞が主な発現細胞であった。胃癌組織における PDGFR mRNA の発現レベルは、胃癌の組織型やリンパ節転移と相関していたことより、胃癌の増殖、進展に重要な役割をしていることが示唆された。リンパ節転移は腫瘍の悪性度や予後予測因子として重要な指標と考えられているが、リンパ管新生に関する研究の多くは、リンパ管内皮に発現している VEGFR-3 のリガンドである VEGF-C と VEGF-D に焦点が当てられている。最近、線維肉腫において PDGF-BB も腫瘍内のリンパ管新生やリンパ節転移を促進することが報告された。本研究にてヒト胃癌においても、リンパ管内皮細胞に PDGFR が発現していることが明らかとなった。

PDGFR リン酸化阻害剤イマチニブを用いた治療実験では、腫瘍間質の変化、抗癌剤の腫瘍増殖抑制効果の増強作用は認められたが、リンパ節転移抑制効果は認められなかった。今回の実験では癌細胞を胃壁に移植後 2 週間目より治療を開始したために、治療前すでにリンパ節転移をきたしていた可能性が考えられる。今後は治療開始時期や PDGFR リン酸化阻害剤の投与量などについて、さらなる検討が必要である。

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 6 件)

1. Kuwai, T., Nakamura, T., Kim, S. J., Sasaki, T., Kitadai, Y., Langley, R. R., Fan, D., Hamilton, S. R., Fidler, I. J.: Intratumoral heterogeneity for expression of tyrosine kinase growth factor receptors in human colon cancer surgical specimens and orthotopic tumors. Am. J. Pathol., 172:

- 358-366, 2008 査読有
2. Kuwai, T., Nakamura, T., Sasaki, T., Kitadai, Y., Kim, J. S., Langley, R. R., Fan, D., Wang, X., Do, K. A., Kim, S. J., and Fidler, I. J.: Targeting the EGFR, VEGFR, and PDGFR on colon cancer cells and stromal cells is required for therapy. Clin. Exp. Metastasis., 25: 477-489, 2008 査読有
 3. Kodama, M., Kitadai, Y., Tanaka, M., Kuwai, T., Tanaka, S., Oue, N., Yasui, W., Chayama, K. Vascular endothelial growth factor C stimulates progression of human gastric cancer via both autocrine and paracrine mechanisms. Clin. Cancer Res. 14, 7205-7214, 2008 査読有
 4. Sasaki, T., Kitadai, Y., Kuwai, T., Nakamura, T., Bucana, C. D., Fidler, I. J.: Inhibition of EGFR and VEGFR phosphorylation on tumor-associated endothelial cells leads to treatment of orthotopic human colon cancer in nude mice. Neoplasia, 9: 1066-1077, 2007 査読有
 5. 北台靖彦, 児玉美千世, 桑井寿雄, 茶山一彰: 癌間質を標的とした消化器癌転移制御の可能性を探る。分子消化器病 4: 41-46, 2007 査読無
 6. 北台靖彦, 児玉美千世, 桑井寿雄, 茶山一彰: PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤による大腸癌間質反応の抑制と腫瘍増殖・転移抑制効果。消化器科 44: 463-467, 2007 査読無

[学会発表] (計 9 件)

1. Kitadai, Y., Kodama, M., Tanaka, M., Sasaki, T., Kuwai, T., Nakamura, T., Fidler, I.J.: Inhibition of reactive stroma by platelet derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor reduces growth and lymph node metastasis of human colon carcinoma. 20th Meeting of the European Association for Cancer Research, Lyon, France, 2008. 7. 5 (poster presentation)
2. Tanaka, M., Kitadai, Y., Kodama, M., Shinagawa, K., Sumida, T., Kuroda, T., Tanaka, S., Chayama, K.: A potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine factor for human gastric carcinoma. 20th Meeting of the European Association for Cancer Research, Lyon, France, 2008. 7. 5. (poster presentation)
3. Kodama, M., Kitadai, Y., Tanaka, M., Shinagawa, K., Sumida, T., Kuroda, T., Tanaka, S., Chayama, K.: Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF-receptor beta is associated with lymphatic metastasis in gastric carcinoma. 20th Meeting of the European Association

for Cancer Research, Lyon, France, 2008. 7. 5 (poster presentation)

4. 北台靖彦, 桑井寿雄, 佐々木隆光, 児玉美千世, 田中信治, 茶山一彰: 大腸腫瘍間質をターゲットとした分子標的治療 -ヌードマウス同所移植腫瘍モデルを用いた検討。第 18 回日本消化器癌発生学会総会、ワークショップ、札幌、2007. 11. 8
5. 児玉美千世, 北台靖彦, 品川 慶, 田中美和子, 炭田知宜, 黒田 剛, 田中信治, 茶山一彰: 胃癌増殖における PDGF/レセプター系の発現はリンパ節転移や胃癌の組織型と関連する。第 18 回日本消化器癌発生学会総会、パネルディスカッション、札幌、2007. 11. 8
6. 桑井寿雄, 北台靖彦, 佐々木隆光, 中村透, Kim, S-J, Fidler I.J.: ヌードマウス同所移植腫瘍モデルを用いた大腸癌の EGFR, VEGFR, PDGFR をターゲットとした分子標的治療の検討。第 16 回日本がん転移学会総会、ワークショップ、富山、2007. 7. 9
7. 児玉美千世, 北台靖彦, 品川 慶, 田中美和子, 炭田知宜, 黒田 剛, 田中信治, 茶山一彰: 胃癌増殖において vascular endothelial growth factor C はオートクライン的にも作用する。第 16 回日本がん転移学会総会、ワークショップ、富山、2007. 7. 9
8. Kitadai, Y., Sasaki, T., Kuwai, T., Nakamura, T., Bucana, C.D., Chayama, K., Fidler I.J.: Targeting the Expression of Platelet-Derived Growth Factor Receptor by Reactive Stroma Inhibits Growth and Metastasis of Human Colon Carcinoma. 98th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Los Angeles, CA, USA, 2007. 4. 14 (Mini Symposium)
9. 北台靖彦, 佐々木隆光, 桑井寿雄, 茶山一彰: 大腸癌の微小血管構成細胞をターゲットとした血管新生抑制療法 -ヌードマウス同所移植腫瘍モデルを用いた検討。第 3 回日本消化管学会学術集会 コアシンポジウム、東京、2007. 2. 1

[図書] (計 2 件)

1. 安井 弥, 北台靖彦: 分子標的治療 (総論). 消化器がん化学療法 2008 (日本メディカルセンター), pp28-36, 2008
2. 桑井寿雄, 北台靖彦, 茶山一彰: 大腸腫瘍間質をターゲットとした分子標的治療. 消化器疾患における Translational Research (アークメディア), pp146-152, 2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

北台 靖彦 (KITADAI YASUHIKO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科
准教授
研究者番号 10304437

(2)研究分担者

(3)連携研究者