

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19591534	
研究課題名（和文）	胃癌腹膜播種における TGF β およびアンギオテンシン系を介した分子標的治療の開発
研究課題名（英文）	Development of molecular targeted therapy via TGF β and angiotensin system for peritoneal dissemination of gastric cancer
研究代表者	
伏田 幸夫（FUSHIDA SACHIO）	
金沢大学・附属病院・助教	
研究者番号：10301194	

研究成果の概要：アンギオテンシン II を介した細胞の増殖や間質の線維化および抗アポトーシスが胃癌の腹膜播種の成立に関与していると予想し、そのメカニズムの解明および治療への応用が可能か否かを検討した。その結果、胃癌組織中のアンギオテンシン II 濃度は正常胃組織と比較して有意に高濃度であり、腫瘍周囲に浸潤した肥満細胞から発現される mast cell tryptase によって生成されることが明らかとなった。また、アンギオテンシン II の受容体である AT1 は胃癌原発巣や腹膜播種巣に高率に発現していた。肥満細胞の機能を抑制し、かつ TGF β の機能も抑制するトラニラストおよび AT1 アンタゴニストの candesartan を用いてマウス腹膜播種モデルにおいて播種が抑制されることを解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：胃癌、腹膜播種、線維化、アンギオテンシン II、TGF β 、candesartan、tranilast

1. 研究開始当初の背景

本邦における胃癌の治療成績は早期胃癌の増加に伴い向上しているが、進行胃癌に関しては予後の改善を見ない。最大の原因は再発形式でもっとも頻度の高い腹膜播種の診断法および治療法が確立されておらず、腹膜播

種と診断された後の予後は約 3-6 ヶ月ときわめて不良であるためである。現在、腹膜播種の診断法として CT による腹水貯留、水腎症の診断、注腸検査による結腸・直腸狭窄の診断で確定されることが多いが早期診断さ

れることはほとんどなく、全身状態の悪化による化学療法不能例も多く予後不良の原因となっている。

血清腫瘍マーカーではCA125が腹膜転移に特異的であるが、陽性率は低く(14%)新しいバイオマーカーの出現が望まれる。腹膜播種の主体は線維化であるため、早期診断のカギは腹膜(後腹膜含む)や腸管の線維化を反映するバイオマーカーを見つけることである。肝硬変に代表される肝線維化マーカーとしてヒアルロン酸、Ⅲ型プロコラーゲン、Ⅳ型コラーゲンなどが有用とされている。胃癌症例においてこれらのマーカーのうち、機序は不明であるが血清Ⅳ型コラーゲン値が腹膜播種の診断にCA125以上に有用であることをわれわれは明らかにした(第63回日本癌学会総会記事)。

治療法として転移巣の完全切除(Peritomy)が理想的であるが、技術的な問題や高い術後合併症率のため普及していない。最近頻用されている5FUの代謝拮抗剤が含まれるS-1や従来の制癌剤とは異なるp53非依存性アポトーシスを誘導するタキサン系制癌剤の全身投与が腹膜播種の余命延長に貢献しているものの、その50%生存率は約1年であり2年生存率はほぼゼロに等しい。抗癌剤の腹腔内投与は高濃度の薬剤を直接細胞に接触させることが可能であるため播種の可及的切除と術中腹腔内化学療法が頻用されているが、明らかに播種が遺残した症

例に対する術中1回のみの治療効果は少ないという状況であった。また、再発例に対しては術後の癒着によるデリバリーの低下や再発例の多くが浸潤硬化型であり、結節散布型が少ないこともあり効果は高くない。そのため、術前に繰り返し腹腔内投与を行う方法が理想とされ、「胃癌腹膜播種に対するS-1併用ドセタキセルの腹腔内化学療法の多施設共同第I/II相臨床試験」も開始されたところである。

先に述べたように、腹膜播種の主体は線維化であり、終末像は尿管狭窄に伴う腎不全や腸管狭窄に伴う①嘔吐および誤嚥製肺炎、②腸閉塞およびBacterial translocation、③閉塞性黄疸および肝不全であり、癌細胞のみをターゲットにする治療法には限界がある。よって、腹膜播種に対する治療戦略として、抗癌剤の腫瘍へのデリバリーを向上させることと同時に線維化を制御する新しい治療法の開発が必要との着想に至った。

2. 研究の目的

腹膜播種モデルの多くはほとんどが髄様性の播種であったが、今回使用するOCUM-2MD3(大阪市大 平川弘聖教授より提供)はヒトスキルス胃癌の腹膜播種と類似した播種巣を形成するため、より臨床に近いモデルによる実験が可能である。腹膜再発巣は線維芽細胞やコラーゲン線維に包まれた状態で癌細胞が散在するため抗癌剤のデリバ

リーが不良であるだけでなく、線維化を制御しなければ腸閉塞や水腎症といった症状は改善しない。近年、肝線維化に中心的に働く伊藤細胞が炎症細胞などから分泌される TGF- β により活性化され細胞外マトリックス成分を増生する一方、伊藤細胞はアンギオテンシン II 1 型 (AT-1) 受容体を発現しており、アンギオテンシン II が TGF- β を介してコラーゲン産生を促進することが明らかとなった。現在、動物実験において AT1 受容体拮抗薬が肝の線維化を抑制する可能性が示唆されており、癌の増殖・血管新生もアンギオテンシン II が関与している事が明らかとなり、AT1 受容体拮抗薬による分子標的治療の可能性が期待されている。われわれは AT1 受容体拮抗薬である Candesartan をもちいた腹膜播種モデルにおいて腫瘍の増殖を抑制することに成功したが、その効果は十分でなかった。

腹膜播種は癌細胞と多量の間質から構成されているが、traniLAST は線維芽細胞からの TGF- β の分泌やコラーゲン線維の合成を抑制するだけでなく、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の増殖も抑制し、肥満細胞による腫瘍局所におけるアンギオテンシン II の生成をも阻害することが知られているが、胃癌においては十分明らかにされていない。前回、アンギオテンシン II 1 型 (AT-1) 受容体拮抗薬である candesartan により腹膜播種巣を縮小することに成功したが、その効果は十分では

なかった。今回、traniLAST による腹膜播種の縮小効果の有無を検討するにあたり、癌細胞・線維芽細胞への直接効果を *in vitro* および *in vivo* で明らかにする。また、マウス腹膜転移モデルにおいては traniLAST と candesartan の併用効果による TGF- β - アンギオテンシン II を介した腹膜線維化機構の抑制および腫瘍全体の増殖抑制の増強効果を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

①胃癌におけるアンギオテンシン II (AT-II) と AT-1 受容体 (AT1R) の発現について

胃癌組織と同一症例の非癌部組織における AT II 濃度を測定する。また、胃癌組織中における AT1R の発現の有無を免疫組織学的に検討する。さらに、AT II の局所における生成のメカニズム明らかにするため、癌局所における肥満細胞浸潤の程度と mast cell tryptase 発現の有無についても検討する。

②胃癌腹膜播種細胞株 OCUM-2MD3 における AT1R 阻害薬 (candesartan) および traniLAST の増殖抑制効果についての検討 (*in vitro*)

OCUM-2MD3 を candesartan および traniLAST 存在下に培養し、増殖に及ぼす影響を MTT assay にて検討する。また、その際の増殖抑制のメカニズムを western blot にて細胞周期関連遺伝子を中心に検討する。

③tranilast, candesartanによる腹膜播種形成の抑制

高度腹膜転移株であるOCUM-2MD3を 1×10^7 個ノードマウス腹腔内投与し、腹膜転移が100%形成される4週間後からtranilast（リザベン）を投与し、コントロール群と生存日数を比較する。また、CAの投与開始時期をOCUM-2MD3腹腔内投与直後、1, 2, 3週間後と変化させることによる腹膜播種形成率の低下や腹膜の肥厚線維化がどの程度抑制できるのか否か検討する。

マウスは代謝動態が早く、AUC等からヒトの臨床用量に相当するとされる100mg/kgを毎日経口投与することとし、コントロール群にはtranilast投与時に懸濁液にもちいるメチルセルロース液を経口投与する。

同様に、Candesartan（プロプレス）投与における播種形成の抑制およびtranilast併用による播種形成抑制の増強効果を検討する。candesartanの投与量は8mg/kgにて行った。

4. 研究成果

胃癌組織中のアンギオテンシンⅡ濃度は正常胃組織と比較して有意に高濃度であり、腫瘍周囲に浸潤した肥満細胞から発現されるmast cell tryptaseによって生成されることが明らかとなった。また、アンギオテンシンⅡの受容体であるAT1は胃癌原発巣や腹膜播種巣に高率に発現していた。肥満細胞の機能を抑制し、かつ腫瘍細胞および線維芽細胞からのTGFβの放出を抑制するtranilastおよび

AT1アンタゴニストのcandesartanによりヒト高度腹膜播種細胞株OCUM2MD3の増殖はそれぞれ抑制され、併用によりさらに強い増殖抑制効果を認めた。そしてその増殖抑制には、p21WAF1の発現増強と抗アポトーシスタンパクであるsurvivin発現低下によるアポトーシスによるものであること（Cleaved caspase 3の発現増強）が明らかとなった。さらに、OCUM2MD3によるマウス腹膜播種モデルにおいてCandesartanおよびtranilast投与によって播種が抑制されることを解明した。

これにより一連の腹膜播種の増殖および線維化のメカニズムが明らかとなり、その治療の可能性を第81回日本胃癌学会総会で発表し、大きな反響を得られた。

tranilastは抗アレルギー剤やケロイド予防薬として、candesartanは高血圧治療薬として既に日常臨床で広く使用され、その安全性も確立されているため、これらの薬剤を用いた臨床試験の結果が期待される。

今後は、癌性腹水に対する更なる分子標的治療の可能性について明らかにしたい。

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 3 件）

① Kinoshita J, Fushida S et al.: Local angiotensin II-generation in human gastric cancer: Correlation with tumor progression

through the activation of ERK1/2, NF-κB and survivin. Int J Oncol, in press. (査読有)

② Yagi Y, Fushida S et al.: Anti-VEGF therapy for peritoneal dissemination model of gastric cancer considering of pharmacokinetics. Jpn J Cancer Chemothe 35: 2005-2008, 2008 (査読無)

③ Fushida S, Kinoshita J et al.: Dual anti-cancer effects of weekly intraperitoneal docetaxel in treatment of advanced gastric cancer patients with peritoneal carcinomatosis: a feasibility and pharmacokinetic study. Oncol Rep 19: 1305-1310, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 八木康道、伏田幸夫 他：胃癌腹膜播種細胞株における tranilast および candesartan の抑制効果、第 8 1 回日本胃癌学会総会、2009, 3, 6. 東京

[図書] (計 1 件)

- ① 伏田幸夫共著：消化器がん化学療法—腹腔内化学療法. 日本メディカルセンター pp276-282, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伏田 幸夫 (FUSHIDA SACHIO)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：10301194

(2) 研究分担者

原田 真市 (HARADA SHINICHI)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：90272955