

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591946

研究課題名(和文) がん幹細胞・ニッチに注目した胃癌の抗癌剤感受性に関する検討

研究課題名(英文) The study of the sensitivity for gastric cancer neoadjuvant chemotherapy relating to cancer stem cells

研究代表者

吉永 敬士 (Yoshinaga, keiji)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90507790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： 進行胃癌に対して術前化学療法を行い、その効果に関してがん幹細胞や腫瘍間質環境(ニッチ)がどのように関与しているかという観点で、進行胃癌手術施行症例の切除組織標本を用いて、がん幹細胞やニッチに関連する遺伝子発現の検索とその発現の臨床病理学的意義の検討を行った。そのうちSNAIL、E-Cadherin、SIP1、CXCR4遺伝子発現については予後との関連を認めため詳細をAnn Surg Oncol誌とAnticancer Res誌に報告した。さらに術前化学療法と予後との関連について検討し、日本胃癌学会総会(第85、86回)、日本外科学会定期学術集会(第113、114回)に結果を報告した。

研究成果の概要(英文)： The efficiency of neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer patients was assessed focused on cancer stem cell and a niche by using clinical samples of gastric cancer patients who performed gastrectomy. And we studied the association for the effect of neoadjuvant chemotherapy with the cancer stem cell, niche and epithelial-mesenchymal transformation. We found that the gene expression of SNAIL and E-Cadherin had inverse correlation with each other, and that of SIP1 and E-cadherin also had inverse correlation. The expression of CXCR4, one of the niche marker, was assessed and studied the association with clinico-pathological factors. The results were reported to Ann Surg Oncol and Anticancer Res. The relation between neoadjuvant chemotherapy and the prognosis of advanced gastric cancer patients was analyzed, and the results were reported at annual meeting of Japanese stomach cancer association (85th and 86th) and annual meeting of Japan Surgical Society (113th and 114th).

研究分野：腫瘍外科、消化器外科

キーワード：胃癌 がん幹細胞 ニッチ 術前化学療法

1. 研究開始当初の背景

胃癌は罹患率では男性で1位、女性で2位、死亡率では男女ともに2位と依然として**早急に克服されるべき疾患**である。近年の検診の普及に伴い、内視鏡的粘膜切除症例の増加、ピロリ菌の除菌が進められ、今後罹患率、死亡率の減少が見込まれる可能性がある一方で、発症時から**高度進行で手術療法施行が不可能もしくは手術療法 + 術後化学療法では根治が困難な症例も認め、予後も極めて不良**であるのが現状である。

近年、このような高度進行症例に対し**術前化学療法**が行われるようになり、当科においても九州消化器化学療法研究会 (KSCC) の臨床試験に参加し、術前診査腹腔鏡検査にて正確な進行度診断を行い、**術前化学療法**施行後に胃切除術を施行してきた。本臨床試験の primary end point である病理組織学的奏効割合の検討を行っていく中で、**grade 0(無効)から grade 3 (完全奏効) の症例や切除標本内に奏効部位、非奏効部位が混在する症例を多く経験し、**今後はこれらの症例の術後経過を観察し、**病理組織学的奏効割合と予後との関連が明らかになることが見込まれている。**

また、化学療法に対する耐性や奏効後の再燃をきたす原因として、**がん幹細胞とニッチ形成**さらに上皮間葉移行 (EMT) が注目されている。invitro の検討では**がん幹細胞**の性質をもった side population はそうでない population よりも抗癌剤の感受性が低いことがわかっており、抗癌剤投与後に細胞形態が間葉細胞様に変化し、細胞死を逃れていることも想定され、その細胞の環境として**ニッチ**が注目されている。しかし、この仮説を検証するための in vivo での検討報告は依然として少なく、**術前化学療法**施行例に注目した臨床検体における検討の報告もない。

2. 研究の目的

1) 胃癌手術症例の病理標本におけるがん幹細胞マーカー発現の検索と臨床病理学的解

析。

2) 術前化学療法施行例の治療前生検標本、術前化学療法施行後の手術標本における検討。

3) 新規同定されたマーカーの解析と検証および治療効果および予後予測マーカーの検索。

3. 研究の方法

1) 新規がん幹細胞マーカーの検索として、当科が保有している胃癌培養細胞株 6 株(必要であれば追加で購入)について、培養細胞株それぞれを side population とそれ以外の population にセルソーターを用いて分離し、それぞれの DNA、mRNA、マイクロ RNA を抽出しゲノムの変異や遺伝子発現の比較検討を行い新規のがん幹細胞に特異的なマーカーの検索を行う。

2) 上記で同定されたがん幹細胞マーカーおよび既知の胃癌におけるがん幹細胞マーカー、ニッチのマーカーについては、免疫組織化学染色法を用いて、化学療法前後の胃癌組織標本の解析を行い、化学療法の奏効度 (画像診断、病理組織診断を含む) の関連を検討する

3) 抗癌剤耐性に関与すると判断されるがん幹細胞やニッチ形成部位について、がん幹細胞の遺伝子変異、染色体異常の他、遺伝子発現変化、エピジェネティックな変化やニッチ自体の形態変化や関与する細胞集団の変化が想定されるため、胃癌組織標本よりレーザーマイクロダイセクション法を用いてがん幹細胞やニッチ形成部位を収集し、DNA や mRNA の抽出を行い、化学療法前後でのジェネティック、エピジェネティックな変化、遺伝子発現変化を検索し、抗癌剤耐性に関与する新規分子マーカーの同定を行う。

4) 上記の検討で成果が得られれば、乳癌、

食道癌、大腸癌肝転移でも同様の解析を行う。

4. 研究成果

新規がん幹細胞マーカーの検索として胃癌培養細胞株の FACS を用いた胃癌がん幹細胞のソーティングの予定であったが、依頼予定の複数の業者のサービス中止、研究内容の他施設との競合から、施行することができなかったため、既知のがん幹細胞マーカーのスクリーニング、ニッチや上皮・間葉移行(EMT)マーカーの発現検索とその発現の臨床病理学的意義の検討を行うと共に、本研究の前提となる進行胃癌患者における術前化学療法により予後の改善が得られるのか、臨床データの解析を行うこととした。

既知のがん幹細胞マーカーのスクリーニング、ニッチや上皮・間葉移行(EMT)マーカーの発現検索として本研究期間内に検索を行った分子は、CD44、CD133、ALDH1A、SALL4、SNAIL、E-カドヘリン、SIP1、TGF- β 、アクチピン A、LTBP1、LTBP2、LTBP4、CXCR4 で、このうち CD44、CD133、ALDH1A については胃癌培養細胞株での発現検索で低分化型胃癌の細胞株において発現が高く、分化型細胞株ではほとんど発現を認めないことが判明した。しかし、臨床検体での発現を検討すると分化度に応じた発現の変化は認めなかった。また、胃癌培養細胞株で EMT マーカーであるアクチピン A と LTBP2 および SNAIL と E-カドヘリンの遺伝子発現解析では両者の発現は逆相関を認め、SNAIL と E-カドヘリンについては臨床検体においても遺伝子発現の逆相関を認めた。SIP1 と E-カドヘリンの解析も行い、遺伝子発現の逆相関を認め、その発現と食道癌症例で臨床病理学的因子との関連を検討した。結果については Ann Surg Oncol, 2015 年に報告し採用された。さらにニッチマーカーの1つである CXCR4 の胃癌臨床検体組織での発現と臨床病理学的因子と

の関連を検討した結果については Anticancer Res, 2014 年に報告し採用された。

また、術前化学療法の予後に対する効果を評価するため、化学療法施行後に切除可能となった症例の予後に関する検討を行い、日本胃癌学会総会(第85、86回)、日本外科学会定期学術集会(第113、114回)に結果を報告した。化学療法レジメン別の予後、副作用についての解析結果は臨床と研究に採用された。

上記の中の知見として術前化学療法が奏効し、根治術施行後に術後補助療法を行うのか化学療法を継続すべきなのかという観点で解析を行っているが、術後補助療法施行よりも化学療法施行の方が長期生存を得られる可能性が示唆されており、このことは術前化学療法が奏効したとしてもがん幹細胞の遺残やニッチによりがん細胞が残っている可能性があること、さらには術後化学療法によってそれらによる再発が予防でき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8件)

1. Yamamoto M, Matsuyama A, Yoshinaga K, Iwasa T, Tsutsui S, Ishida T. Preliminary trial of surgery after chemotherapy for advanced gastric cancer with peritoneal dissemination. Oncol Lett, 3: 662-666, 2012.
2. Yamamoto M, Taguchi K, Yamanaka T, Matsuyama A, Yoshinaga K, Tsutsui S, Ishida T. Outcome and status of microsatellite stability Japanese atomic bomb survivors with early gastric carcinoma. Ann Surg Oncol, 20: 798-803, 2013.
3. Yoshinaga K, Saeki H, Oki E, Morita M, Ikeda T, Sugimachi K, Yamashita Y, Ikegami T, Uchiyama H, Yoshizumi T, Kawanaka H, Mimori K, Watanabe M, Maehara Y. prognostic markers for immunochemotherapy using tegafur-uracil (UFT) and protein-bound polysaccharide K (PSK).

- Fukuoka Igaku Zasshi, 104: 549-558, 2013.
4. Yamamoto M, Yoshinaga K, Matsuyama A, Tsutsui S, Ishida T. CEA/CA72-4 levels in peritoneal lavage fluid are predictive factors in patients with gastric carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol, 140: 607-612, 2013.
 5. Yamamoto M, Sakaguchi Y, Matsuyama A Yoshinaga K, Tsutsui S, Ishida T. Surgery after chemotherapy for patients with unresectable advanced gastric cancer. Oncology, 85: 241-247, 2013.
 6. Masuda T, Nakashima Y, Ando, Yoshinaga K, Saeki H, Oki E, Morita M, Oda Y, Maehara Y. Nuclear expression of chemokine receptor CXCR4 indicates poorer prognosis in gastric cancer. Anticancer Res, 34: 6397-6403, 2014.
 7. Oki E, Emi Y, Kusumoto T, Sakaguchi Y, Yamamoto M, Sadanaga N, Shimokawa M, Yamanaka T, Saeki H, Morita M, Takahashi I, Hirabayashi N, Sakai K, Orita H, Aishima S, Takeji Y, Yamaguchi K, Yoshida K, Baba H, Maehara Y. Phase II study of docetaxel and S-1 (DS) as neoadjuvant chemotherapy for clinical stage III resectable gastric cancer. Ann Surg Oncol. 21: 2340-2346, 2014.
 8. Yoshida R, Morita M, Shoji F, Nakashima Y, Miura N, Yoshinaga K, Koga T, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Oda Y, Maehara Y. Clinical significance of SIP1 and E-cadherin in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Ann Surg. Oncol, epub ahead of print, 2015.
 9. Zaito Y, Oki E, Ando K, Ida S, Kimura Y, Saeki H, Morita M, Hirahashi M, Oda Y, Maehara Y. Loss of heterozygosity of PTEN (encoding phosphatase and tensin homolog) associated with elevated HER2 expression is adverse prognostic indicator in gastric cancer. Oncology. 88, 189-194, 2015.
 10. 吉永敬士, 中島雄一郎, 松山歩, 武石一樹, 郡谷篤史, 辻田英司, 濱武基陽, 前田貴司, 筒井信一, 松田裕之, 石田照佳 進行再発胃癌における S-1 併用化学療法に関する検討 臨床と研究 91: 69-73, 2014.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 吉永敬士, 松山歩, 中島雄一郎, 武石一樹, 郡谷篤史, 辻田英司, 濱武基陽, 前田貴司, 筒井信一, 松田裕之, 石田照佳 腹膜播種合併進行胃癌に対し S-1+ 療法を施行した 50 例の検討 第 85 回日本胃癌学会総会 大阪国際会議場 2013 年 2 月 27 日-3 月 1 日.
2. 吉永敬士, 松山歩, 中島雄一郎, 武石一樹, 郡谷篤史, 辻田英司, 濱武基陽, 前田貴司, 筒井信一, 松田裕之, 石田照佳 進行胃癌に対し S-1+ 療法を施行した 100 例の検討 第 113 回日本外科学会定期学術集会 マリンメッセ福岡 2013 年 4 月 11 日-4 月 13 日.
3. 吉永敬士, 松山歩, 中島雄一郎, 武石一樹, 郡谷篤史, 辻田英司, 濱武基陽, 前田貴司, 筒井信一, 松田裕之, 石田照佳 腹膜播種陰性, CY 陽性の進行胃癌に対し胃切除術を施行した 11 症例の検討 第 86 回日本胃癌学会総会 パシフィコ横浜 2014 年 3 月 20 日-3 月 22 日.
4. 吉永敬士, 松山歩, 中島雄一郎, 武石一樹, 郡谷篤史, 辻田英司, 濱武基陽, 前田貴司, 筒井信一, 松田裕之, 石田照佳 進行胃癌に対し化学療法施行され R0-1 手術が施行された症例の検討 第 114 回日本外科学会定期学術集会 国立京都国際会館 2014 年 4 月 3 日-4 月 5 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔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

吉永 敬士 (YOSHINAGA KEIJI)

九州大学・大学病院：共同研究員

研究者番号：90507790

(2) 研究分担者

掛地 吉弘 (KAKEJI YOSHIHIRO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)教授

研究者番号：802844882

沖 英次 (OKI EIJI)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：70380392

佐伯 浩司 (SAEKI HIROSHI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：80325448

(3) 連携研究者

なし