

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293307

研究課題名(和文) スキルス胃癌の難治性克服：癌幹細胞のオートファジーと分子標的治療開発

研究課題名(英文) CONQUEST OF THE SCIRRHUS GASTRIC CANCER: AUTOPHAGY OF CANCER STEM CELLS AND DEVELOPMENT OF MOLECULAR TARGET

研究代表者

平川 弘聖 (Hirakawa, Kosei)

大阪市立大学・大学院医学研究科・医学部附属病院長

研究者番号：40188652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：スキルス胃癌は難治性の癌である。スキルス胃癌難治性の病態を癌幹細胞のオートファジーの観点から解明することを目的とした。スキルス胃癌幹細胞は、LC3A、LC3Bの発現が高く、オートファジーが亢進していた。また、酸化ストレスによりオートファジーが誘導された。クロロキンをを用いてオートファジーを抑制することにより癌幹細胞増殖が有意に抑制された。また、胃癌組織のLC-3、beclin-1、p62の発現を評価した結果、オートファジーは、スキルスや転移と相関していた。以上から、スキルス胃癌癌幹細胞はオートファジーが関連しており、オートファジー抑制により癌幹細胞の増殖や転移が抑制されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Scirrhous gastric cancer is a refractory cancer. The aim of this study was to elucidate the intractable mechanisms of the scirrhous gastric cancer intractable from the viewpoint of autophagy of cancer stem cells. The expression of LC3A and LC3B was high in cancer stem cells of scirrhous gastric cancer. Autophagy was induced by oxidative stress. The proliferation of cancer stem cells was significantly inhibited by chloroquine. The expression of p62, LC-3, beclin-1 of the gastric cancer tissue was correlated with skills and metastasis. These findings suggested that autophagy was associated with the cancer stem cells of scirrhous gastric cancer, and suggested that autophagy inhibitor, chloroquine, might be useful for the inhibition of cancer stem cells.

研究分野：腫瘍外科

キーワード：スキルス胃癌 難治癌 オートファジー 癌幹細胞 クロロキン

1. 研究開始当初の背景

スキルス胃癌は急速広範に増殖浸潤し、診断時にはすでに進行癌でかつ高頻度に腹膜転移やリンパ節転移を伴うことが多い。したがってスキルス胃癌は根治手術不可能であることが多く、また抗癌剤の有効性も低いため、他型の胃癌に比し極めて予後不良である。このことから、スキルス胃癌の病態解明と治療法開発は胃癌診療の重要課題となっている。最近、癌組織は幹細胞能力と腫瘍形成能力をあわせもつ少数の癌幹細胞により形成・維持されていることが明らかにされ、癌治療開発の重要な視点に癌幹細胞の解析が重要視されている。癌幹細胞は、腫瘍細胞供給の中心的役割を担うのみならず、抗癌剤や放射線に対する抵抗性、癌転移にも重要な役割を果たす(Nature, 2001)。すなわち抗癌剤や低酸素、低栄養状態によって多くの癌細胞は消退しても癌幹細胞は残存し、再発や転移などの難治性の原因となる。申請者は、スキルス胃癌の腹膜転移や抗癌剤耐性、低酸素耐性などの難治性の病態に、癌幹細胞が深く関与していることを明らかにしてきた(Cancer Science, 2009, Br J Cancer, 2010, Br J Cancer, 2013)。また従来の研究から、スキルス胃癌の増殖進展には周囲微小環境(ニッチ)との相互作用が重要で、ニッチ細胞の一つである線維芽細胞の産生するTGF- β が胃癌の悪性化や幹細胞性維持に関与することを明らかにした(Int J Cancer 2013, J Natl Cancer Inst 2009)。これらの研究成果から、スキルス胃癌難治性には癌幹細胞が深く関与し、その病態解明と治療開発にはスキルス胃癌幹細胞の解析が必要であるという着想に至った。

オートファジー(Autophagy; 自食作用)は正常細胞恒常性に作用する一方、癌の発生進展にも関与する。種々の固形癌で、オートファジーの関与が報告されており、癌初期では抑制的に作用し、癌進行期には促進的に作用すると報告されている。癌の増殖進展において、癌幹細胞はアポトーシスがおこらず、オートファジーの誘導が生存機構として働き治療抵抗性に関与することが報告されている。低酸素、低栄養状態での癌幹細胞維持メカニズムは、癌悪性度と密接に関連しているが、その機構にオートファジーが関与していることが推察される(Science, 2011)。事実、我々の検討で、癌幹細胞様SP細胞のオートファジーを検討したところ、SP細胞はLC3-IIで示されるオートファジーが亢進していること、一方低酸素状態ではオートファジーが抑制されている知見が得られ、癌幹細胞のオートファジーが難治性癌に関与しその制御が治療対象となることが推察された。

2. 研究の目的

スキルス胃癌難治性の病態を癌幹細胞オートファジーの観点から解明し、スキルス胃癌の転移や抗癌剤耐性に対する治療を開発することを目的とする。

癌幹細胞は、自己複製能と多分化能を持ち、癌の増殖や浸潤だけでなく、転移再発にも大きな役割を担っていると報告されている。近年、オートファジーが癌細胞の生存に大きくかわることが報告されているが、癌幹細胞

におけるオートファジーの意義に関する報告は少ない。今回、我々は胃癌細胞株を用いて、癌幹細胞が多く存在する Side Population (SP)分画を分離し、癌幹細胞におけるオートファジーの意義を検討した。

3. 研究の方法

材料: スキルス胃癌細胞株(OCUM-2M, OCUM-2D3, OCUM-12)およびそれぞれの癌幹細胞様 SP 細胞(OCUM-2M/SP, OCUM-2D3/SP, OCUM-12/SP)を用いる。

(1) スキルス胃癌の癌幹細胞様 Side Population (SP)細胞に発現・低下するオートファジー分子の解析

スキルス胃癌の癌幹細胞のオートファジーについて Side Population (SP)細胞を用いて明らかにする。申請者は、スキルス胃癌細胞の SP 細胞を分離・同定する方法を既に確立している(Cancer Science, 2009)。すなわち Hoechst33342 添加後セルソーターの BD-LSR もしくは FACS-Vantage (Becton Dickinson)を用いペラパミルの有無によるゲーティングのもとソーティングし分離された SP 分画の細胞集団に癌幹細胞の性格を有する細胞が多く含まれていることを明らかにしている。今回 SP 細胞濃縮を行い、SP 細胞と non-SP 細胞を分離し、LC3、Beclin-1、p62/SQSTM1 発現を蛍光染色、RT-PCR および western blot にて解析を行い、癌幹細胞に特異的に発現・低下するオートファジー関連分子を比較解析する。

(2) 低酸素、低栄養、酸化ストレス環境におけるスキルス胃癌幹細胞のオートファジーの検討

癌環境には様々な環境因子が介在している。急性と慢性の低酸素状態や、飢餓状態、酸化ストレスなどが癌細胞に対して異なった影響をおよぼしている可能性がある。従って、種々の環境因子がスキルス胃癌幹細胞のオートファジーにおよぼす影響を下記の如く検討する。

低酸素環境における検討: 胃癌細胞株を 1%O₂ の急性低酸素状態に 5 日間培養し、癌細胞のオートファジーを検討する。オートファジーに誘導される LC3、Beclin-1、およびオートファジーで消費消失する p62/SQSTM1 を蛍光染色、RT-PCR および western blot にて確認する。また、慢性低酸素環境における影響として、低酸素耐性胃癌細胞株を樹立しその性状が癌幹細胞に類似していることが明らかになったため、低酸素耐性株のオートファジーを同様に、LC3、Beclin-1、p62/SQSTM1 発現を検討する。

低栄養、酸化ストレス環境: 低栄養として無グルコース培養、酸化ストレスとして H₂O₂(1.5 mM)投与培養をそれぞれ行い LC3、Beclin-1、p62 発現を検討する。

(3) 胃癌標本を用いたオートファジーの臨床病理学的意義

オートファジーで誘導あるいは分解され

る分子 LC3、Beclin-1 や p62/SQSTM1 を指標に、胃癌組織のオートファジーとその臨床病理学的意義について検討する。胃癌 600 例の手術標本パラフィン包埋切片を用い、抗 LC3 抗体、抗 Beclin-1 抗体、抗 p62/SQSTM1 抗体による免疫組織学的染色を行い、オートファジーの臨床病理学的意義を検討する。

(4) 癌幹細胞のオートファジーを標的とした治療薬の開発

癌幹細胞の生存維持が、オートファジーに依存していることから、癌幹細胞のオートファジー制御が治療標的となりうることを示唆している。オートファジー阻害剤(ヒドロキシクロロキン)を使用する。

増殖に及ぼす影響:癌幹細胞増殖能を MTT assay や細胞数算定、Thymidine up-take assay により行う。

オートファジーに及ぼす影響: LC3、Beclin-1、p62 の発現を検討する。

4. 研究成果

(1) 胃癌細胞株 OCUM-2MD3 および OCUM-12 を用いて、FACSscan にて SP 分画をソーティングし、OCUM-2MD3/SP および OCUM12/SP とした。オートファジー関連分子 LC3A、LC3B、mTOR、ULK1 発現を RT-PCR により親株と比較検討した。癌細胞のオートファジー-Lysotracker を用いた蛍光顕微鏡により評価した。また、癌細胞の酸化ストレス(ROS)状態を評価した。オートファジー抑制剤(クロロキン)による細胞増殖抑制効果についても検討した。その結果、SP は親株に比し造腫瘍性や転移能が高く、癌幹細胞が多く含まれていることが示された。この SP は、オートファジー関連分子 LC3A、LC3B の発現が高く、オートファジーが亢進していた。また、SP は ROS 産生が抑制されており、酸化ストレスによりオートファジーが誘導された。クロロキンを用いてオートファジーを抑制することにより SP の増殖が有意に抑制された。SP 細胞は通常細胞株と比較し、ストレス環境(グルコース欠乏、アミノ酸欠乏、血清欠乏)に有意に高い生存率を示した。オートファジー阻害剤により SP 分画は減少し有意に増殖能が抑制された。

(2) 胃癌手術症例を用いて免疫組織学的染色により LC-3、beclin-1 の発現を評価し、臨床病理学的背景、予後について検討した。また胃癌細胞株 2MD3 を用いてストレス環境における LC3A、LC3B、beclin-1 発現についてリアルタイム rt-PCR 法で検討した。その結果 LC-3 陽性は 79 例(%)、beclin-1 強陽性は 130 例(%)であり、そのうちオートファジー陽性は 38 例(%)であった。LC3 陽性例、beclin1 陽性例とそれぞれ陰性群の間で臨床病理因子に関して比較を行ったところ、分化型、高深達度、浸潤増殖様式、リンパ管侵襲、静脈侵襲に関して有意に相関が認められた。5 年生存率に関しては、LC3 陽性例、beclin1 陽性例ともに陰性例と比較すると有意に生存率の低下を認めた。また、LC3 陽性例、beclin1 陽性例の生存に関する単変量解析では有意差

を認めたが、多変量解析においては、独立予後因子とはならなかった。リアルタイム rtPCR 法ではストレス暴露 24 時間後において、栄養飢餓(グルコース欠乏もしくはアミノ酸欠乏)条件で LC3A、LC3B、beclin-1 発現が亢進していた。

(3) p62/SQSTM1 (以下 p62) はオートファジーにより選択的に分解される蛋白である。胃癌における p62 発現について検討を行った。その結果、p62 陽性は 123 例、陰性 419 例であった。両群間で臨床病理因子に関して比較を行ったところ、スキルス型、低分化型、T2 以深、リンパ節転移、腹膜転移、腹水細胞診陽性、浸潤増殖様式、リンパ管侵襲、脈管侵襲、腫瘍径 5cm 以上に関しては相関関係が認められた。5 年生存率に関しては、陽性例は陰性例と比較すると有意(69.8% : 53.9%、 $P=0.0012$)に生存率の低下を認めた。また胃癌症例全体の多変量解析においては独立予後因子とはならなかったが、リンパ節転移陽性ステージ II/III 症例においてはスキルス型、脈管侵襲に加え p62 陽性が独立した予後因子となった。リアルタイム rtPCR での胃癌細胞株における p62 の mRNA 発現の解析では ocum12 が他の細胞株と比較し有意に高かった。また、グルコース飢餓における p62 の蛋白発現を ocum12 を用いてウェスタンブロットにて解析すると、グルコース飢餓 24 時間後において p62 の発現は低下していた。以上から、癌幹細胞の増殖にはストレスやオートファジーが関連しており、オートファジーを抑制することにより癌幹細胞の増殖や転移が抑制されることが示唆された。

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 19 件)

1. Miki Y, Yashiro M, Okuno T, Kitayama K, Masuda G, Hirakawa K, Ohira M. CD9-positive exosomes from cancer-associated fibroblasts stimulate the migration ability of scirrhous-type of gastric cancer cells. *BJC*, 2018, 118(6), 867-877. 査読あり
2. Ishimoto T, Miyake K, Nandi T, Yashiro M, Onishi N, Huang KK, Lin SJ, Kalpana R, Tay ST, Suzuki Y, Cho BC, Kuroda D, Arima K, Izumi D, Iwatsuki M, Baba Y, Oki E, Saya H, Hirakawa K, Baba H, Tan P: Activation of transforming growth factor beta 1 signaling in gastric cancer-associated fibroblasts increases their motility, via expression of rhomboid 5 homolog 2, and ability to induce invasiveness of gastric cancer cells. *Gastroenterology*, 153(1): 191-204 e116. 2017. 査読あり
3. Itoh G, Chida S, Yanagihara K, Yashiro M, Tanaka M: Cancer-associated fibroblasts induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumours. *Oncogene* 2017;36:4434-44. 査読あり

4. Tanaka M, Kuriyama S, Itoh G, Maeda D, Goto A, Tamiya Y, Yanagihara K, Yashiro M, Aiba N: Mesothelial cells create a novel tissue niche that facilitates gastric cancer invasion. *Cancer Res* 2017, 77(3):684-695. 査読あり
5. Kitayama K, Yashiro M, Morisaki T, Miki Y, Okuno T, Kinoshita H, Fukuoka T, Kasashima H, Masuda G, Hasegawa T, Sakurai K, Kubo N, Hirakawa K, Ohira M. Pyruvate kinase isozyme M2 and glutaminase might be promising molecular targets for the treatment of gastric cancer. *Cancer Sci*. 2017 Dec;108(12):2462-2469. 査読あり
6. Miki Y, Yashiro M, Ando K, Okuno T, Kitayama K, Masuda G, Tamura T, Sakurai K, Toyokawa T, Kubo N, Tanaka H, Muguruma K, Osawa M, Hirakawa K, Ohira M. Examination of cancer cells exposed to gastric serosa by serosal stamp cytology plus RT-PCR is useful for the identification of gastric cancer patients at high risk of peritoneal recurrence. *Surg Oncol*. 2017 Dec;26(4):352-358. 査読あり
7. Kasashima H, Yashiro M, Nakamae H, Masuda G, Kinoshita H, Morisaki T, Fukuoka T, Hasegawa T, Nakane T, Hino M, Hirakawa K, Ohira M: Clinicopathologic significance of the CXCL1-CXCR2 axis in the tumor microenvironment of gastric carcinoma. *PLoS One* 2017, 12(6):e0178635. 査読あり
8. Kasashima H, Yashiro M, Kinoshita H, Fukuoka T, Morisaki T, Masuda G, Sakurai K, Kubo N, Ohira M, Hirakawa K: Lysyl oxidase is associated with the epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells in hypoxia. *Gastric Cancer*, 19(2):431-442. 2016. 査読あり
9. Kasashima H, Yashiro M, Nakamae H, Kitayama K, Masuda G, Kinoshita H, Fukuoka T, Hasegawa T, Nakane T, Hino M, Hirakawa K, Ohira M: CXCL1-Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 2 Signaling Stimulates the Recruitment of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells into Diffuse-Type Gastric Cancer Stroma. *Am J Pathol*, 186(11):3028-3039. 2016. 査読あり
10. Takahashi K, Tanaka M, Yashiro M, Matsumoto M, Ohtsuka A, Nakayama KI, Izumi Y, Nagayama K, Miura K, Iwao H, Shiota M: Protection of stromal cell-derived factor 2 by heat shock protein 72 prevents oxaliplatin-induced cell death in oxaliplatin-resistant human gastric cancer cells. *Cancer Lett*, 378(1):8-15. 2016. 査読あり
11. Tanaka M, Kuriyama S, Itoh G, Iwabuchi Y, Shibata H, Yashiro M: Identification of anti-cancer chemical compounds using *Xenopus* embryos. *Cancer Sci*, 107(6):803-811. 2016 査読あり
12. Kasashima H, Yashiro M, Kinoshita H, Fukuoka T, Morisaki T, Masuda G, Sakurai K, Kubo N, Ohira M, Hirakawa K. Lysyl oxidase is associated with the epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells in hypoxia. *Gastric Cancer*. 2016. 19:431-42. 査読あり
13. Murakami T, Zhang Y, Wang X, Hiroshima Y, Kasashima H, Yashiro M, Hirakawa K, Miwa A, Kiyuna T, Matsuyama R, Tanaka K, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM. Orthotopic Implantation of Intact Tumor Tissue Leads to Metastasis of OCUM-2MD3 Human Gastric Cancer in Nude Mice Visualized in Real Time by Intravital Fluorescence Imaging. *Anticancer Res*. 2016 May;36:2125-30. 査読あり
14. Go M, Yashiro M, Kitayama K, Miki Y, Kasashima H, Kinoshita H, Morisaki T, Fukuoka T, Hasegawa T, Sakurai K, Toyokawa T, Kubo N, Tanaka H, Muguruma K, Masaichi O, Hirakawa K. Clinicopathological Correlations of Autophagy-related Proteins LC3, Beclin 1 and p62 in Gastric Cancer. *Anticancer Res*. 2016 36(1):129-36. 査読あり
15. Kinoshita H, Yashiro M, Fukuoka T, Hasegawa T, Morisaki T, Kasashima H, Masuda G, Noda S, Hirakawa K. Diffuse-type gastric cancer cells switch their driver pathways from FGFR2 signaling to SDF1/CXCR4 axis in hypoxic tumor microenvironments. *Carcinogenesis*. 2015 36(12):1511-20. 査読あり
16. Kasashima H, Yashiro M, Nakamae H, Masuda G, Kinoshita H, Morisaki T, Fukuoka T, Hasegawa T, Sakurai K, Toyokawa T, Kubo N, Tanaka H, Muguruma K, Ohira M, Nakane T, Hino M, Hirakawa K. Bone marrow-derived stromal cells are associated with gastric cancer progression. *Br J Cancer*. 28;113(3):443-52, 2015. 査読あり
17. Kasashima H, Yashiro M, Kinoshita H, Fukuoka T, Morisaki T, Masuda G, Sakurai K, Kubo N, Ohira M, Hirakawa K. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) from stromal fibroblasts stimulates the progression of gastric cancer. *Cancer Lett*. 28;354:438-46, 2014. 査読あり
18. Hasegawa T, Yashiro M, Nishii T, Matsuoka J, Fuyuhiko Y, Morisaki T, Fukuoka T, Shimizu K, Shimizu T, Miwa A, Hirakawa K. Cancer-associated fibroblasts might sustain the stemness of scirrhous gastric cancer cells via transforming growth factor β signaling. *Int J Cancer*. 134:1785-95.2014. 査読あり
19. Kikuchi Y, Kunita A, Iwata C, Komura D, Nishiyama T, Shimazu K, Takeshita K, Shibahara J, Kii I, Morishita Y, Yashiro M, Hirakawa K, Miyazono K, Kudo A, Fukayama M, Kashima TG. The niche component periostin is produced by cancer-associated fibroblasts, supporting growth of gastric cancer through ERK activation. *Am J Pathol*. 184:859-70.2014. 査

読あり

〔学会発表〕(計 3件)

1. Masakazu Yashiro, Tomohisa Okuno, Hiroaki Kasashima, Yuichiro Miki, Hirohisa Nakamae, Kisyu Kitayama, Tsuyoshi Hasegawa, Takahiko Nakane, Masayuki Hino, Kosei Hirakawa. CXCL1-CXCR2 Signalling Might Recruit the Bone Marrow-derived Mesenchymal Cells to the Carcinoma-associated Fibroblastsof Gastric Cancer. American Association for Cancer Research 107th Annual Meeting. 2017年04月 (Washington DC, USA)
2. Go Masuda, Masakazu Yashiro, Kishu Kitayama, Yuichiro Miki, Hiroaki Kasashima, Tamami Morisaki, Tatsunari Fukuoka, Tsuyoshi Hasegawa, Masaichi Ohira, Kosei Hirakawa. Cancer Stem Cells Might Sustain Stemness by the Induction of Autophagy in Starvation Stress. AACR Annual Meeting. 2016年04月 (New Orleans, USA)
3. G Masuda, M Yashiro, Hiroaki Kasashima, Haruhito Kinoshita, TatsunariFukuoka, Tamami Morisaki, Tsuyoshi Hasegawa, Katsunobu Sakurai, Takahiro Toyokawa, Naoshi Kubo, Hiroaki Tanaka, Kazuya Muguruma, Masaichi Ohira, Hirakawa K. Significance of an autophagy protein, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), in gastric cancer. American Association for Cancer Research 106th Annual Meeting. 2015年04月. Philadelphia, PA, (USA)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3件)

1. 名称：癌患者の腹膜播種転移の可能性を判定するための検査方法、及び検査キット
発明者：八代正和、大平雅一、三木友一朗
権利者：大阪市立大学
番号：特願 2016-182130
種類：発明
出願年月日：2016年9月16日
国内外の別：国内
2. 名称：癌の罹患の有無の判別方法並びに癌の治療及び/又は予防のための医薬組成物
発明者：間野博行、上野敏秀、崔永林、八代正和
権利者：東京大学
番号：特願 2015-168169
種類：発明
出願年月日：2015年8月27日
国内外の別：国内
3. 名称：スキルス性胃癌の治療剤、及び胃癌の予後の予測方法

発明者：八代正和、平川弘聖、笠島裕明、日野雅之、中前博久、中根孝彦
権利者：大阪市立大学
番号：特願 2016-182130
種類：発明
出願年月日：2015年5月14日
国内外の別：国内

○取得状況(計 1件)

1. 名称：プロスタグランジン D2 合成酵素を利用した消化器癌治療剤
発明者：八代正和、平川弘聖、福岡達成
権利者：大阪市立大学
番号：特許第 6278391号
種類：発明
出願日：2013年12月26日
取得年月日：2018年1月26日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/surgical-oncology>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平川 弘聖 (HIRAKAWA, Kosei)
大阪市立大学・大学院医学研究科・医学部付
属病院長
研究者番号：40188652

(2)研究分担者

八代 正和 (YASHIRO, Masakazu)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：60305638

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

福岡達成 (大学院生)
森崎珠実 (大学院生)
木下春人 (大学院生)
増田剛 (大学院生)
笠島裕明 (大学院生)