

令和元年5月18日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06832

研究課題名(和文) 低分化型胃がん幹細胞とがん関連線維芽細胞を用いてスキルス胃がん形成機構を解析する

研究課題名(英文) Mechanism how scirrhous-type gastric cancer is formed

研究代表者

深町 博史 (Fukamachi, Hiroshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：70134450

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)：がん関連線維芽細胞(CAF)非存在下でスキルス型腫瘍を形成するPDXを樹立した。そこで胃がん幹細胞とCAFとの相互作用を調べる実験は中止した。このPDXを用いて、スキルス胃がん幹細胞の増殖を抑制する薬剤を検討し、mTOR阻害剤が細胞増殖を特異的に抑制することを見出した。クラスター解析の結果、スキルス胃がんは、正常胃上皮から形成される群と、分化型胃がんから形成される群に分けられること、後者には、突然変異が多く、免疫チェックポイント阻害剤に反応する胃がんが多数含まれることが示された。よって一部のスキルス胃がんは、mTOR阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の両方に反応すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で我々は、mTOR阻害剤がスキルス胃がん幹細胞の増殖を特異的に抑制すること、スキルス胃がんの一部は分化型胃がんから派生し、多くの突然変異を持つことを明らかにした。これまで、スキルス胃がんは正常胃上皮細胞から形成され、突然変異は少ないと考えられてきた。突然変異が少ない腫瘍細胞は免疫チェックポイント阻害剤に反応しないので、スキルス胃がんの治療には免疫チェックポイント阻害剤は使われていない。我々の研究は、スキルス胃がんの一部は免疫チェックポイント阻害剤に反応性が高いことを示唆している。本研究で同定された薬剤が、スキルス胃がんの治療に著効を示すか否かは今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：We established patient-derived xenograft (PDX) lines from diffuse-type gastric cancer (GC), and searched for drugs that suppressed their growth. We found that mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibitor strongly suppressed the growth of PDX-derived diffuse-type GC-initiating cells. Diffuse-type GCs could be classified into two clusters, and we found that genomically stable subtype was major in cluster I while CIN and MSI subtypes were predominant in cluster II where PDX-derived cells were included. Further analysis showed that diffuse-type GCs in cluster II developed from intestinal-type GCs while those in cluster I from normal gastric epithelial cells. We estimated that about 9% and 55% of the diffuse-type GCs in cluster II were responders to mTOR inhibitors and checkpoint inhibitors, respectively. We thus conclude that mTOR inhibitors and checkpoint inhibitors might be useful for the treatment of a subset of diffuse-type GCs which may develop from intestinal-type GCs.

研究分野：分子腫瘍医学

キーワード：スキルス胃がん 胃がん幹細胞 mTOR阻害剤 免疫チェックポイント阻害剤 初代培養 PDX 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

我々は患者由来腫瘍の移植系 (PDX; patient-derived tumor xenografts) を樹立し、(a) CD49f が胃癌幹細胞のマーカーであること、(b) 初代培養系では CD49f 陽性細胞が Sphere を形成して増殖し、(c) この細胞は高い造腫瘍性と多分化能を持つこと、(d) よって、初代培養系では胃癌幹細胞が選択的に増殖する、と結論した (Fukamachi et al. PLoS ONE, 2013)。上記の結果は分化型胃癌についての結果で、低分化型胃癌に関しては不明であった。研究開始時までに低分化型胃癌についての解析を進め、低分化型胃癌細胞の初代培養に成功した。本研究では、この系を用いて解析を進めた。

2. 研究の目的

胃癌は日本人のがん死亡原因の第2位で、その治療法の開発は緊急の課題である。胃癌は分化型と低分化型に分けられるが、低分化型胃癌細胞がつくるスキルス胃癌は、発見が困難で予後が悪いことが知られている。我々はこれまでに、低分化型胃癌幹細胞の初代培養系を確立した。この培養系で増殖する細胞は、がん幹細胞のマーカーを発現すると共に、高い造腫瘍性と印環細胞への分化能を持つ。一方で、がんの増殖・分化・浸潤には、がん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts; CAF) が重要な機能を果たすことが知られており、スキルス胃癌形成にも CAF が重要な機能を果たすと考えられる。本研究は、低分化型胃癌幹細胞の初代培養系を利用して、低分化型胃癌幹細胞と CAF の相互作用によるスキルス胃癌形成機構を解析し、スキルス胃癌の新規治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

- (1) 低分化型胃癌幹細胞と CAF を組み合わせて培養・移植することにより、スキルス胃癌が形成されるモデル系を構築する。
- (2) 低分化型胃癌幹細胞を免疫不全マウス胃間質内に移植して、胃癌幹細胞と胃間質細胞との相互作用を検討する。
- (3) アレイ解析により、スキルス胃癌で、低分化型胃癌幹細胞と CAF との間の情報伝達に働く分子を同定し、スキルス胃癌治療に有用な分子標的薬を明らかにする。
- (4) 低分化型胃癌幹細胞と CAF との間の情報伝達を抑制する低分子化合物を検索・同定する。
- (5) 上記の実験で同定された分子標的薬や低分子化合物がスキルス胃癌の発症・浸潤・転移を抑制するか、マウスモデル系とスキルス胃癌組織の移植系を用いて検討する。

4. 研究成果

- (1) 研究費申請後に HGC-20 というスキルス胃癌患者由来の PDX を樹立した。この HGC-20 細胞は、マウス皮下に移植するとコラーゲン線維に富むスキルス型の腫瘍を形成する。従って、スキルス胃癌形成にはがん関連線維芽細胞 (CAF) は必ずしも重要ではないことが明らかになった。
- (2) そこで、胃癌幹細胞と CAF との相互作用を解析する実験は中止し、HGC-20 細胞から得られるがん幹細胞を用いて、スキルス胃癌幹細胞の治療に有効な薬剤を検討した。その結果、Temsirrolimus という TOR 阻害剤がスキルス胃癌幹細胞の増殖を特異的に抑制することが明らかになった。これまでに、Everolimus という mTOR 阻害剤は胃癌の治療に使われ、一部の胃癌患者には有効であるが、全般的には有効ではないという結果が得られている。しかし Temsirrolimus は胃癌の治療には使用されていない。PDX を用いたマウス成体系では、Temsirrolimus は Everolimus よりも胃癌の増殖抑制効果は高かった。従って、Temsirrolimus が胃癌の治療に有効である可能性は高い。
- (3) 初代培養した HGC-20 細胞は、胃癌由来の MKN45 細胞や NUHC-4 細胞株よりも抗がん剤に強い抵抗性を示した。これは初代培養した HGC-20 細胞が胃癌幹細胞の性質を保持しているためであろうと考えられる。胃癌幹細胞の性質を解析するために、初代培養した HGC-20 細胞で特異的に発現している 1000 余りの薬剤抵抗関連遺伝子を用いて、胃癌をクラスター解析した。その結果、スキルス胃癌は二つのクラスターに分かれることが示された。突然変異数解析などの結果、クラスター I の低分化型胃癌は正常胃上皮から形成されるが、クラスター II の低分化型胃癌は分化型胃癌から形成されることが示された。クラスター II には、突然変異が多い MSI-H 型の低分化型胃癌が多数含まれていた。
- (4) 突然変異が多い腫瘍は免疫チェックポイント阻害剤に反応することが報告されている。よってクラスター II に含まれる MSI-H 型の低分化型胃癌は、mTOR 阻害剤だけでなく、免疫チェックポイント阻害剤にも反応すると考えられる。これまで、スキルス胃癌は突然変異が少ないと報告され、免疫チェックポイント阻害剤は治療に有効ではないと考えられてきた。我々の研究により、分化型胃癌から形成されるスキルス胃癌は多くの突然変異を含むこと、その治療には mTOR 阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤が有効であることが示された。これらの結果は、難治性のスキルス胃癌の治療に大きく貢献すると考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- Fukamachi H., Kim SK, Koh J, Lee HS, Sasaki Y, Yamashita K, Nishikawaji T, Shimada S, Akiyama Y, Byeon SJ, Bae DH, Okuno K, Nakagawa M, Tanioka T, Inokuchi M, Kawachi H, Tsuchiya K, Kojima K, Tokino T, Eishi Y, Kim YS, Kim WH, Yuasa Y, Tanaka S. A subset of diffuse-type gastric cancer is susceptible to mTOR inhibitors and checkpoint inhibitors. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Mar 12;38(1):127. 査読あり、doi: 10.1186/s13046-019-1121-3.
- Ojima F, Saito Y, Tsuchiya Y, Ogoshi M, Fukamachi H., Inagaki K, Otsuka F, Takeuchi S, Takahashi S. (2019) Runx3 regulates folliculogenesis and steroidogenesis in granulosa cells of immature mice. *Cell Tissue Res.*, 2019 Mar;375(3):743-754. 査読あり、doi: 10.1007/s00441-018-2947-2. Epub 2018 Oct 30.
- Shimada S, Akiyama Y, Mogushi K, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Nagasaki H, Fukamachi H., Yuasa Y, Tanaka S. (2018) Identification of selective inhibitors for diffuse-type gastric cancer cells by screening of annotated compounds in preclinical models. *Br J Cancer.* 2018 Apr;118(7):972-984. 査読あり、doi: 10.1038/s41416-018-0008-y. Epub 2018 Mar 12.
- Ojima, F., Saito, Y., Tsuchiya, Y., Kayo, D., Taniuchi, S., Ogoshi, M., Fukamachi, H., Takeuchi, S., Takahashi, S. (2016) Runx3 transcription factor regulates ovarian functions and ovulation in female mice. *J. Reprod. Develop.*, Oct 18;62(5):479-486. 査読あり、Epub 2016 Jun 13. PMID: 27301496 PMID: PMC5081735 DOI: 10.1262/jrd.2016-005
- Katsuta, E., Tanaka, S., Mogushi, K., Shimada, S., Akiyama, Y., Aihara, A., Matsumura, S., Mitsunori, Y., Ban, D., Ochiai, T., Kudo, A., Fukamachi, H., Tanaka, H., Nakayama, K., Arii, S., Tanabe, M. (2016) CD73 as a therapeutic target for pancreatic neuroendocrine tumor stem cells. *Int. J. Oncol.*, 48, 657-669. 査読あり、doi: 10.3892/ijo.2015.3299.
- Furuyama, T., Tanaka, S., Shimada, S., Akiyama, Y., Matsumura, S., Mitsunori, Y., Aihara, A., Ban, D., Ochiai, T., Kudo, A., Fukamachi, H., Arii, S., Kawaguchi, Y., Tanabe, M. (2016) Proteasome activity is required for the initiation of precancerous pancreatic lesions. *Sci. Rep.*, 6, 27044. 査読あり、Doi: 10.1038/srep27044.

[学会発表] (計 7 件)

- Fukamachi, H., Kim, S.-K., Koh, J., Lee, H. S., Nishikawaji T., Shimada, S., Akiyama, Y., Kim, Y. S., Kim, W. H., Yuasa, Y., Tanaka, S. (2018) Diffuse-type gastric cancers are classified into two clusters, which may be formed via different carcinogenic pathways. INTERNATIONAL SYMPOSIUM Post-A3 Meeting 2018 Epigenetic Regulation of Cellular Stress Response.
- Fukamachi, H., Nishikawaji, T., Shimada, S., Akiyama, Y., Yuasa, Y., Tsuchiya, K., Tanaka, S. (2018) Diffuse-type gastric cancers are classified into two clusters, which may be formed via different carcinogenic pathways. 第77回日本癌学会学術総会。The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.
- Fukamachi, H., Nishikawaji, T., Shimada, S., Akiyama, Y., Yuasa, Y., Tsuchiya, K., Tanaka, S. (2017) Identification of signal transduction pathway in PDX-derived diffuse-type gastric tumor-initiating cells. 第76回日本癌学会学術総会。The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.
- Fukamachi, H., Nishikawaji, T., Shimada, S., Akiyama, Y., Yuasa, Y., Tsuchiya, Kim, W. H., K., Tanaka, S. (2017) Identification of a signal transduction pathway working in the genesis and progression of diffuse type gastric cancers. Post-A3 Meeting 2017 Epigenetic Signature of Carcinogenesis.
- Shimada S, Akiyama Y, Fukamachi H., Yuasa Y, Tanaka S. Identification of selective inhibitors of diffuse-type gastric cancer cells by screening of annotated compounds. 第75回日本癌学会総会。The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
- Fukamachi, H., Nishikawaji, T., Shimada, S., Akiyama, Y., Yuasa, Y., Tsuchiya, K., Tanaka, S. (2016) Identification of MTDs that suppress the growth of PDX-derived diffuse-type gastric tumor-initiating cells. 第75回日本癌学会学術総会。The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.
- Fukamachi, H., Nishikawaji, T., Shimada, S., Akiyama, Y., Yuasa, Y., Tsuchiya, K., Tanaka, S. (2016) Characteristics of diffuse-type gastric cancer stem cells. 26th Seoul Int. Cancer Symposium. -Epigenetic Signature of Carcinogenesis.

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。