

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15193

研究課題名(和文) 消化器癌腹膜転移機構解明に向けての腹腔内遊離癌細胞解析技術の開発

研究課題名(英文) Analysis for intraperitoneal cancer microenvironment to elucidate the biological mechanism of peritoneal metastasis of gastrointestinal cancer

研究代表者

香川 俊輔 (Shunsuke, Kagawa)

岡山大学・大学病院・准教授

研究者番号：00362971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治である消化器癌の消化器癌腹膜播種克服のため腹腔内癌細胞と癌微小環境の解析を行った。胃癌、膵癌患者から得られた腹腔洗浄液において癌特異的GFP発現ウイルスTelomeScanを用いた癌細胞標識と免疫染色により腹腔内微小環境を構成する細胞を解析したところ、腫瘍関連マクロファージ(TAM)の存在が確認された。胃癌、膵癌細胞とTAMとの共培養下では、癌細胞の間葉系形質への変化、浸潤、遊走等の悪性形質の亢進、さらに化学療法剤への抵抗性の獲得が観察された。以上より、消化器癌腹膜播種の難治性と腹腔内微小環境、中でもTAMとの関連性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gastrointestinal cancer develops peritoneal dissemination, which is known to be refractory to current therapy. To overcome it, cancer microenvironment is needed to be analyzed. For analysis of cells constituting the intraperitoneal microenvironment, we obtained peritoneal lavage fluid from patients with stomach cancer and pancreatic cancer and employed cancer-specific GFP expression virus TelomeScan to label cancer cell and immunostaining, which revealed the prevalence of tumor-associated macrophages (TAM) in the peritoneal cavity. Under the co-culture of stomach cancer or pancreatic cancer cells with TAM, the epithelial to mesenchymal transition of cancer cells, the enhancement of malignant phenotypes such as infiltration, migration, and acquired resistance to the chemotherapeutic agents were observed. These results suggested that intraperitoneal microenvironment, especially TAM, may contribute to the refractoriness of gastrointestinal tumor peritoneal dissemination.

研究分野：消化器外科

キーワード：消化器癌 腹膜播種 癌微小環境 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

消化器癌の中で特に胃癌、膵癌は病勢の進行の末に腹膜播種へ進展する傾向があるが、腹膜播種は有効な治療手段が確立されておらず難治であり、腹膜播種転移機構の解明による新たな治療戦略の開発が求められている。近年癌の転移進展への癌組織における微小環境の関与が明らかとなり、腹膜播種転移においても腹腔内の遊離癌細胞とともに正常細胞を含めた腹腔内微小環境の関与が推察される。一方で腹腔内に存在する少数の癌細胞を検出し、捕捉するには技術的な困難があるが、我々が開発した癌細胞可視化ウイルス TelomeScan を用いることで、腹腔内の癌細胞を明瞭に可視化でき、腹腔内微小環境の解析が可能と考えられる。

2. 研究の目的

手術時に得られる胃癌、膵癌患者からの腹腔洗浄液中の癌細胞を TelomeScan を用いて捉える技術確立し、さらに癌細胞と微小環境との関係性を研究する。

3. 研究の方法

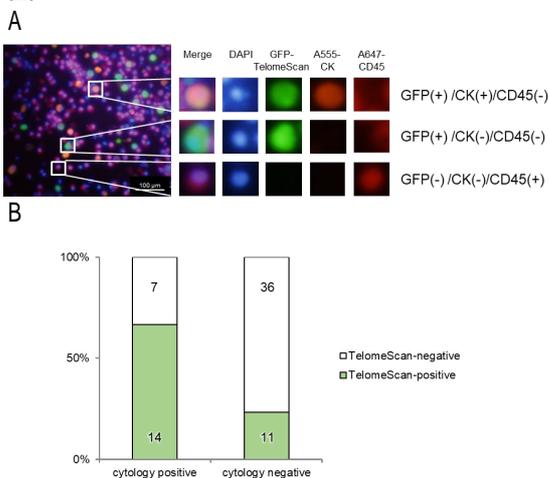
研究参加の同意が得られた患者より、腹腔洗浄液を採取し、TelomeScan により腹腔内遊離癌細胞を検出する。細胞免疫染色を加え、腹腔内微小環境の解析を行う。腹腔内に優勢に存在するマクロファージとの関係性に注目し、マクロファージの分化、さらに癌細胞への影響についても検討を行った。

4. 研究成果

腹腔洗浄液中の胃癌細胞の検出

腹腔洗浄液中の細胞に TelomeScan を 1 MOI で感染させたところ、24 時間後に蛍光顕微鏡下に胃癌細胞が明瞭な GFP 陽性細胞として検出された。免疫細胞染色により GFP 陽性細胞が CD45 陰性でサイトケラチン陽性の癌細胞であることを検証した。68 例中 TelomeScan 陽性症例は 21 例 (30.9%) で通常の腹腔洗浄液細胞診との比較においては、陽性の cut off 値を GFP 陽性細胞 100 個と設定したところ、正診率が 73.5% であった。(図 1 A, B)

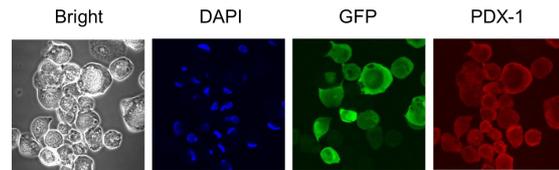
図 1



腹腔洗浄液中の膵癌細胞の検出

膵癌患者 40 名より腹腔洗浄液を回収し、TelomeScan での癌細胞検出を行ったところ、40 例中 10 例に GFP 陽性細胞が検出された。細胞診陰性症例においても GFP 陽性細胞に膵細胞マーカー (PDX-1) の発現を確認し、細胞診より高い診断能が示唆された。(図 2)

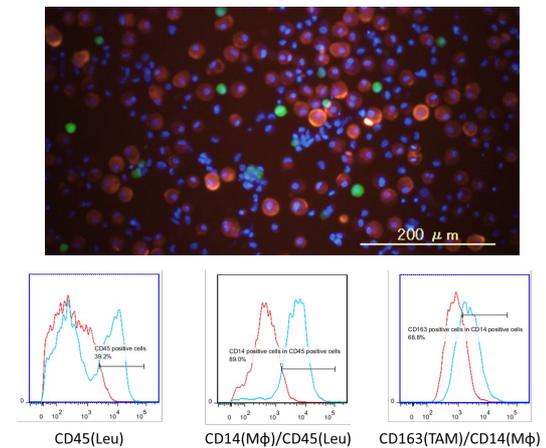
図 2



腹腔内におけるマクロファージの存在

腹腔洗浄液中の癌細胞を TelomeScan で可視化し、さらに細胞免疫染色で併存する細胞の解析を行ったところ、CD45 陽性の血球系細胞、中でもマクロファージが優勢に存在していた。さらにそれらのマクロファージは CD163 陽性の M2 タイプへの分化を示し、所謂 Tumor associated macrophages (TAMs) であることが示された。(図 3)

図 3 緑:癌細胞 オレンジ:TAMs



癌細胞への間接的 TAMs の影響

腹腔内の TAMs が胃癌細胞へ及ぼす影響について検討するため、THP-1 単球系細胞を M2 マクロファージへ分化誘導し、胃癌と間接的共培養を行ったところ、胃癌細胞の遊走能、浸潤能が亢進し(図 4)、化学療法薬のパクリタキセルに対する感受性が低下するなど、悪形形質の亢進が確認された。(図 5)

図 4

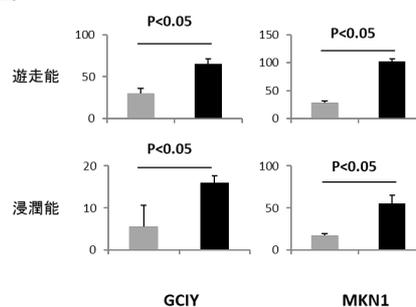
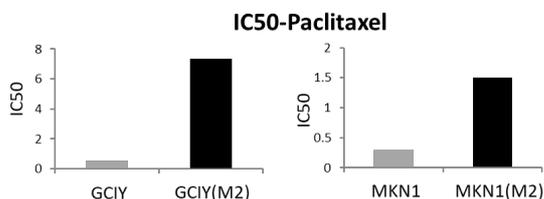


図 5



腹腔内胃癌細胞の捕捉と次世代シーケンサー（NGS）による遺伝子解析

胃癌腹腔洗浄液 4 検体中の癌細胞を TelomeScan による標識後にソーティングで捕捉後、NGS による遺伝子解析を行った。腹腔内癌細胞では Single Nucleotide Variants などが多数検出された。その意義については今後のさらなる解析が必要である。

結語

腹腔洗浄液における胃癌、膵癌細胞の検出に TelomeScan が有効であること示唆された。また、腹腔内では癌細胞と併存するマクロファージが TAMs への分化を示し、TAMs が癌細胞の悪性形質や抗癌剤感受性へ影響を及ぼすことから、腹腔内の微小環境が腹膜播種形成と治療抵抗性へ関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 7 件)

桑田 和也、香川 俊輔、坂本 修一、渡邊 めぐみ、香川 哲也、菊地 覚次、黒田 新土、吉田 龍一、浦田 泰生、田澤 大、藤原 俊義、蛍光ウイルスによる腹腔内の腫瘍関連マクロファージと膵癌細胞の関連性の解析、第 75 回日本癌学会学術総会、平成 28 年 10 月 6 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Kazuya Kuwada, Shunsuke Kagawa, Shuichi Sakamoto, Megumi Watanabe, Tetsuya Kagawa, Satoru Kikuchi, Shinji Kuroda, Ryuichi Yoshida, Yasuo Urata, Hiroshi Tazawa, Toshiyoshi Fujiwara, Virus-guided fluorescent imaging of pancreatic cancer cells in the peritoneal cavity for an insight into roles of tumor-associated macrophage, 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、平成 28 年 7 月 29 日、虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都・港区)

渡邊 めぐみ、香川 俊輔、桑田 和也、坂本 修一、菊地 覚次、黒田 新土、岸本 浩行、西崎 正彦、田澤 大、藤原 俊義、胃癌個別化治療に向けた腹腔内遊離癌細胞イメージング技術の応用、第 71 回日本消化器外科学会総会、平成 28 年 7 月 14 日あわぎんホール(徳島県・徳島

市)

Shunsuke Kagawa, Megumi Watanabe, Kazuya Kuwata, Shuichi Sakamoto, Kunitoshi Shigeyasu, Hiroshi Tazawa, Shinji Kuroda, Satoru Kikuchi, Masahiko Nishizaki, Toshiyoshi Fujiwara, Clinical implications of fluorescence-emitting virus guided peritoneal cytology in gastrointestinal cancer. the 19th International Congress of Cytology, 平成 28 年 5 月 30 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Kazuya Kuwada, Shunsuke Kagawa, Megumi Watanabe, Shuichi Sakamoto, Satoru Kikuchi, Shinji Kuroda, Ryuichi Yoshida, Hiroshi Tazawa, Tetuya Kagawa, Toshiyoshi Fujiwara, Functional analysis of tumor-associated macrophage utilizing virus-guided fluorescent imaging of pancreatic cancer cells in the peritoneal cavity, The 107th American Association for Cancer Research Annual Meeting, 平成 28 年 4 月 19 日, New Orleans(米国)

香川 俊輔、渡邊 めぐみ、桑田 和也、菊地 覚次、黒田 新土、坂本 修一、西崎 正彦、田澤 大、藤原 俊義、胃癌腹膜播種機構解明のための腹腔内遊離癌細胞イメージング研究、第 88 回日本胃癌学会総会、平成 28 年 3 月 19 日、B-C on Plaza 別府国際コンベンションセンター(大分県・別府市)

渡邊 めぐみ、香川 俊輔、桑田 和也、橋本 悠里、堀 直人、菊地 覚次、黒田 新土、岸本 浩行、西崎 正彦、田澤 大、浦田 泰生、藤原 俊義、胃癌個別化治療に向けた、蛍光ウイルスによる腹腔内遊離胃癌細胞の検出技術の開発、第 74 回日本癌学会学術総会、平成 27 年 10 月 10 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香川 俊輔 (KAGAWA, Shunsuke)
岡山大学・大学病院・准教授
研究者番号：00362971

(2) 研究分担者

吉田 隆一 (Yoshida, Ryuichi)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：80534768

(3) 連携研究者

黒田 新士 (KURODA, Shinji)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：60633758

永坂 岳司 (NAGASAKA, Takeshi)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：30452569

田澤 大 (TAZAWA, Hiroshi)
岡山大学・大学病院・准教授
研究者番号：90415513

藤原 俊義 (FUJIWARA, Toshiyoshi)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00304303