

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10588

研究課題名(和文) 胃癌腹膜転移メカニズムの解明：新たな診断治療法開発を目指して

研究課題名(英文) Molecular mechanism in early establishment of peritoneal metastasis from gastric cancer.

研究代表者

藤原 義之 (FUJIWARA, Yoshiyuki)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：40314330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1、進行胃癌に対する5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた微小転移検出に関しては多施設臨床試験を施行し、結果は、微小転移検出における有用性を証明することはできなかった。一方、5-ALAにより消化器癌においてフェロトーシス関連分子が変化する(GPX-4が低下し、HMOX1が上昇する)ことを明らかにした。又、消化器癌組織においてGPX4高発現およびHMOX1低発現は予後不良因子であった。

2、胃癌局所においては、Tリンパ球の免疫寛容が起こっているが、我々は、新たに制御性Bリンパ球やPD-1陽性マクロファージも胃癌局所に有意に集積し、免疫寛容を引き起こし癌の予後不良に関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1、消化器癌に対する5-ALAの抗腫瘍効果のメカニズムが、フェロトーシスの誘導であることを明らかにした。フェロトーシスは、薬剤耐性のメカニズムにも関与していることが知られており、抗癌剤に5-ALAを併用することで感受性増強効果が期待される。

2、現在癌局所の微小環境が注目されているが、我々の研究により癌局所においてTリンパ球以外の制御性Bリンパ球や、PD-1陽性マクロファージが集積し、免疫寛容状態を作り出していることが示唆された。今後、癌の免疫治療が開発されていく上で重要な知見となると考える。

研究成果の概要(英文)：1, Photodynamic diagnosis with 5-aminolevulinic acid (5-ALA) could not improve the detection sensitivity for invisible peritoneal metastasis of gastric cancer by multicenter clinical trials in Japan. However, we demonstrated that 5-ALA itself had anti-tumor activity through gene regulation of ferroptosis-associated proteins such as down-regulation of GPX4 and up-regulation of HMOX. We also confirmed that overexpression of GPX4 and lower expression of HMOX1 had been poorer prognostic factors in human cancer.

2, We also demonstrated that accumulation of regulatory B cells and PD-1 positive macrophages were observed in human gastric cancer, which were worse prognostic factors in patients with gastric cancer. Regulatory B cells and PD-1-positive macrophages may have a potential function of immune evasion in gastric cancer microenvironment.

研究分野：胃癌 腹膜播種

キーワード：胃癌 腹膜播種 癌局所免疫 フェロトーシス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、我が国において胃癌は、罹患率は減少傾向にあるものの人口の高齢化に伴い罹患数は横ばいであり大腸癌に次ぐ2番目に多い悪性腫瘍である。胃癌における死亡原因のトップは腹膜転移であり、これを制御することは胃癌克服に大きく貢献する。我々はアミノレプリン酸を用いた微小腹膜転移検出法を開発し、その臨床応用を目指している。この手法により従来では検出できない微小腹膜転移を検出可能となる。この腹膜微小転移の分子機構を解明するために、採取した微小腹膜転移巣を組織培養し、腹膜転移に関与する分子機構の解明を行う。我々はすでに微小サンプルより組織培養を行い十分なサンプル量を確保できる方法を確立しており、これを用いて腹膜転移初期病態のメカニズムを解明し、転移抑制治療法を開発することを目的とする。

#### (1) 腹膜微小転移検出法の開発

進行胃癌においては、根治的外科手術後の再発が問題であり、再発した場合治癒は見込めないのが現状である。この再発形式の約6割を占めるのが腹膜転移である。このことは手術時すでに微小な腹膜転移が形成されていることを示しており微小転移検出法の開発が望まれている。われわれは5-アミノレプリン酸(5-ALA)の癌特異的代謝に着目した蛍光診断法を胃癌の腹膜播種診断法として用いられる審査腹腔鏡に応用した。5-ALAは生体内ではミトコンドリアで合成され代謝されへムとなる。しかし癌細胞においては、癌特異的なWarburg効果によりへムへの変換ができず、その前駆体であるプロトポルフィリンIX(PPIX)が特異的に蓄積する。このPPIXは光感受性を有し、青色光(410nm)で励起され赤色蛍光(636nmと705nm)を発するこの性質を利用して微小転移を検出する。我々は、ヒト胃癌細胞株を用いたマウス腹膜播種モデルを作成し、5-ALA投与により腹膜転移にPPIXが集積し微小腹膜転移が赤色に発色することを確認した(Kishi et al, J Surg Oncol, 2012)。さらに、進行胃癌患者の審査腹腔鏡検査時に5-ALAを投与し蛍光観察したところ通常観察では検出できない微小腹膜転移を(13/64名)に認め腹膜再発危険群の抽出が可能となった(Kishi et al, Oncology, 2014, Ushimaru et al, Ann Surg Oncol, 2016)。この蛍光観察で検出される微小腹膜転移を有する患者は、腹膜転移なしと腹膜転移あり群の中間の生存率を示し、腹膜播種初期段階であることが示唆された。

#### (2) 微小腹膜転移組織の初代培養法の確立

我々は、これまでに切除標本より癌細胞を抽出し、これを特殊なフィルターを通し細胞のclusterを取り出し、無血清のchemically defined mediumで安定して培養できる技術を構築した。この方法で樹立した細胞集塊(isolated tumor derived cells, iTC)を免疫不全マウスに移植して、組織像について患者の癌組織と比較をおこなったところ、in vitroで樹立した細胞集塊は非常に類似した形態像を示していた。この手法を腹膜微小転移生検組織に応用する。臨床検体から癌細胞を樹立する「初代培養」については、これまでもいくつか報告されているが、コンタミネーションの問題、低い樹立効率などの問題があり、未だ安定した手法はないのが現状である。本手法は、患者の癌の性質を保持した癌細胞clusterを臨床検体から安定して樹立する方法であり微量なサンプルより種々の解析をするための十分な検体を獲得するのに有益な方法である。

### 2. 研究の目的

本研究は、我々が独自に開発した胃癌微小腹膜転移診断法を用いて得られた微小転移巣を、我々が開発した組織培養法を用いて増殖させ種々の解析を行う研究でありほかに類はない。腹膜転移の初期病態をとらえることは困難であり、進行した腹膜転移巣では癌細胞は線維芽細胞を誘導し癌細胞は間質組織の中に散在した病態となるため転移初期の病態解明は困難となる。この手法により、癌細胞がEMT化し腹腔内に遊離し、再びMET化し腹膜に着床し浸潤転移していくメカニズムの解明が可能になり、腹膜播種の早期診断と治療に役立つバイオマーカーの単離が可能となるという点で非常に有意義な研究である。また、微量検体から細胞バンクを構築する手技が安定的に確立できれば、今後個々の患者の微小生研組織を用いた解析が可能となり個別化治療への道が開ける。

研究施行中に、5-ALAを用いた蛍光微小転移検出法の多施設研究の結果が判明し、この方法により検出される微小腹膜結節に偽陽性が多いことにより5-ALA蛍光腹膜微小転移検出法の有用性が否定された。ただし、我々の基礎的研究により5-ALAの抗腫瘍メカニズムに新知見が出たことに関して研究を進めることとした。具体的には5-ALA投与によるフェロトーシスの促進を確認しており、この詳細なメカニズムを明らかにする。

さらに、近年、癌局所の免疫寛容が癌の進展に関与していることと、それをブロックする免疫チェックポイント阻害剤の胃癌を含めた各種癌における有用性を示し、保険適応となっているのが現状である。したがって、胃癌局所の微小免疫環境を明らかにすることは、胃癌治療上非常に重要である。これまで、Tリンパ球に関する研究は多数あるが、我々は、Bリンパ球、マクロファージ、NK細胞に関して局所免疫機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 5-ALAを用いた新たな治療法の開発

5-ALA単独投与により胃癌・食道癌を含めた消化器癌細胞株は増殖抑制を示す。このメカニズムを明らかにするために、5-ALA投与による遺伝子発現の変化を網羅的に解析する。この解析に

より、5-ALA 投与によりフェロトーシス経路が活性化されていることを突き止めた。したがって、この詳細なメカニズムを細胞株・動物モデルを用いて明らかにする。

(2) 胃癌患者の癌組織、正常胃粘膜、そして血中を FACS により解析し、それぞれにおける制御性 B 細胞の出現頻度を調べる。この出現細胞の CD4+T 細胞の胞障害活性への影響を調べる。胃癌局所における CD19+IL-10 陽性細胞の臨床的意義を検証する。

(3) 胃癌組織におけるマクロファージの機能について検討した。PD-1 はマクロファージ上にも発現していることが知られているが、この PD-1 陽性マクロファージの分布を胃癌患者の癌組織、正常胃粘膜、血液中で FACS を用いて検討した。PD-1 陽性マクロファージの浸潤と胃癌の予後について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 消化器癌細胞株に対し 5-ALA を投与することでヘムオキシゲナーゼ I (HMOX1) が発現増強され、グルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) が抑制された。これによりフェロトーシスが誘導されたことが示唆された。この効果はフェロトーシス阻害剤により打ち消され、アポトーシス阻害剤では変化は認めなかった。この GPX4 高発現と HMOX1 低発現は消化器癌において予後不良因子であることを、免疫染色法を用いて明らかにした。マウス癌モデルを作成し、5-ALA 経口投与による腫瘍促成効果とフェロトーシス誘導を確認した。

以下の作用経路を明らかにした。(論文作成中)

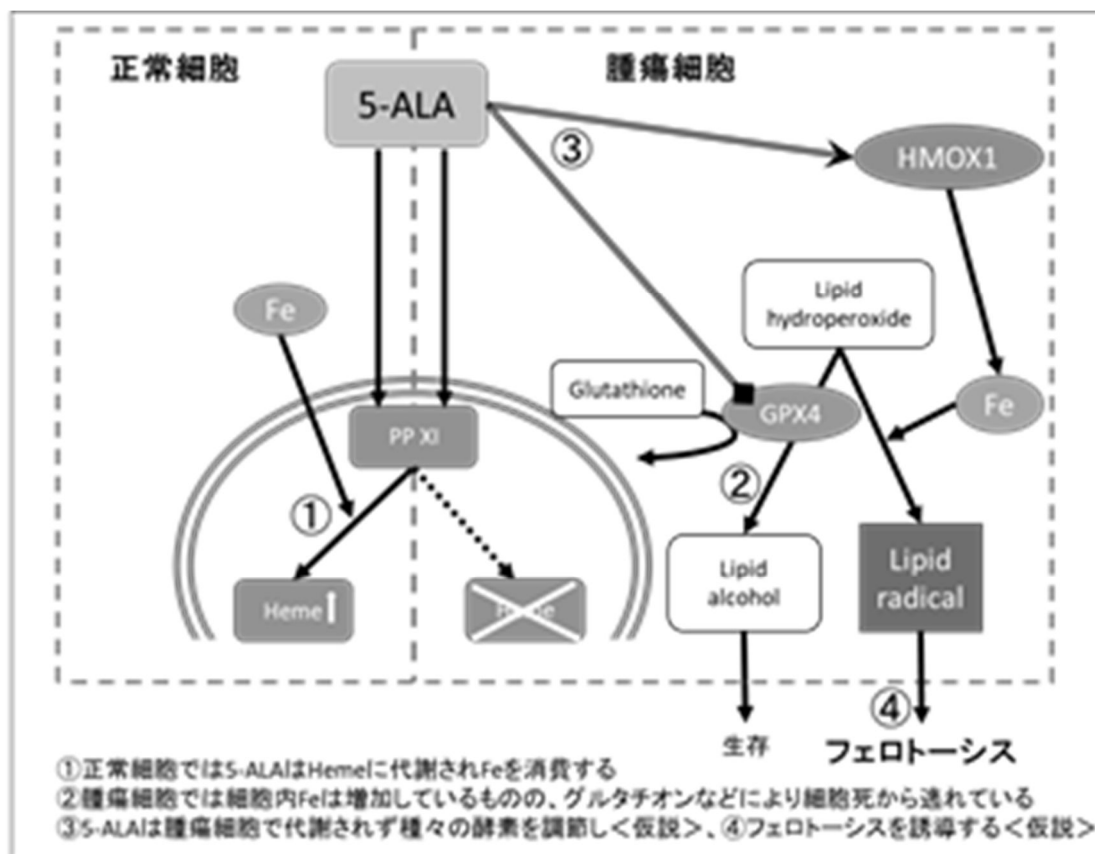


図1、5 - A L Aがフェロトーシスを誘導すると考えられる経路

(2) F A C S により制御性 B 細胞のマーカーである CD19+CD24highCD27+細胞は胃癌局所に有意に浸潤していた。さらにこの分画は、CD4+の増殖を阻害し、インターフェロンガンマの分泌を低下させた。そして、この制御性 B 細胞 (CD19+ IL-10 共染色細胞) の多い胃癌は予後不良であった。(Murakami, Sci Rep, 2019)

(3) PD-1 陽性マクロファージは有意に胃癌局所に浸潤しており、このマクロファージの貪食作用が著しく抑制されていた。さらに、PD-1+CD68+細胞が多く浸潤している胃癌の予後は、有意に予後不良であった。

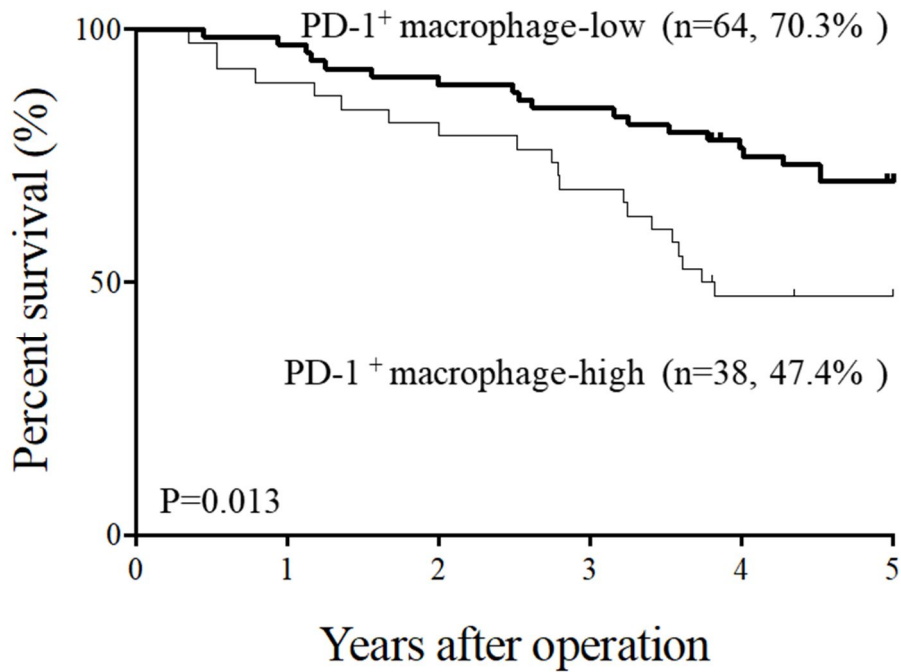


図2、胃癌局所のPD-1陽性マクロファージ浸潤度と予後

以上、本研究により、天然アミノ酸である5-ALAは抗癌剤耐性機構と関係があるフェロトキシスを抑制することで抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。今後抗癌剤耐性腫瘍の治療薬として、抗癌剤との併用薬としても期待が持てる。

さらに、新たな胃癌局所の免疫寛容機構として制御性Bリンパ球やPD-1陽性マクロファージの重要性を明らかにした。今後免疫療法のサロゲートマーカーとしてこれらの分子は臨床応用される可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito H, Shimizu S, Kono Y, Murakami Y, Shishido Y, Miyatani K, Matsunaga T, Fukumoto Y, Ashida K, Fujiwara Y.	4. 巻 39
2. 論文標題 PD-1 Expression on Circulating CD8+ T-Cells as a Prognostic Marker for Patients With Gastric Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 443-448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13132.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Amisaki M, Tsuchiya H, Sakabe T, Fujiwara Y, Shiota G.	4. 巻 110
2. 論文標題 Identification of genes involved in the regulation of TERT in hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 550-560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/cas.13884.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurumi Hiroki, Kanda Tsutomu, Kawaguchi Koichiro, Yashima Kazuo, Koda Hiroki, Ogihara Kumi, Matsushima Kayoko, Nakao Kazuhiko, Saito Hiroaki, Fujiwara Yoshiyuki, Osaki Mitsuhiko, Okada Futoshi, Isomoto Hajime	4. 巻 S1572-1000(17)
2. 論文標題 Protoporphyrinogen oxidase is involved in the fluorescence intensity of 5-aminolevulinic acid-mediated laser-based photodynamic endoscopic diagnosis for early gastric cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Photodiagnosis Photodyn Ther	6. 最初と最後の頁 1 - 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdpdt.2018.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito H, Kono Y, Murakami Y, Shishido Y, Kuroda H, Matsunaga T, Fukumoto Y, Osaki T, Ashida K, Fujiwara Y.	4. 巻 38
2. 論文標題 Highly Activated PD-1/PD-L1 Pathway in Gastric Cancer with PD-L1 Expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 30522-30527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kono Y, Saito H, Miyauchi W, Shimizu S, Murakami Y, Shishido Y, Miyatani K, Matsunaga T, Fukumoto Y, Nakayama Y, Sakurai C, Hatsuzawa K, Fujiwara Y.	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 Increased PD-1-positive Macrophages in the Tissue of Gastric Cancer Are Closely Associated With Poor Prognosis in Gastric Cancer Patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-020-6629-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto M, Horikoshi Y, Nakaso K, Kurashiki T, Kitagawa Y, Hanaki T, Sakamoto T, Honjo S, Umekita Y, Fujiwara Y, Matura T.	4. 巻 470
2. 論文標題 Oncogenic Role of TYRO3 Receptor Tyrosine Kinase in the Progression of Pancreatic Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Lett.	6. 最初と最後の頁 149-160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.11.028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Y, Saito H, Shimizu S, Kono Y, Shishido Y, Miyatani K, Matsunaga T, Fukumoto Y, Ashida K, Sakabe T, Nakayama Y, Fujiwara Y.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Increased Regulatory B Cells Are Involved in Immune Evasion in Patients With Gastric Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49581-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	尾崎 知博  (OSAKI Tomohiro)  (10457161)	鳥取大学・医学部附属病院・助教    (15101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齊藤 博昭  (SAITO Hiroaki)  (20335532)	鳥取大学・医学部・准教授    (15101)	
研究分担者	三吉 範克  (MIYOSHI Norikatsu)  (20528624)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター (研究所)・その他部局等・特命プロジェクトリーダー    (84409)	
研究分担者	黒田 博彦  (KURODA Hirohiko)  (30743273)	鳥取大学・医学部附属病院・助教    (15101)	
研究分担者	福本 陽二  (FUKUMOTO Yoji)  (40623947)	鳥取大学・医学部附属病院・助教    (15101)	
研究分担者	松永 知之  (MATSUNAGA Tomoyuki)  (40743274)	鳥取大学・医学部附属病院・助教    (15101)	
研究分担者	宮谷 幸造  (MIYATANI Kozo)  (30758173)	鳥取大学・医学部附属病院・助教    (15101)	