

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2017～2019  
 課題番号：17K10610  
 研究課題名(和文) HGF/MET axisの本質的制御によるスキルス胃癌の革新的標的治療法の開発  
  
 研究課題名(英文) Development of innovative targeted therapies by essential control of HGF/MET axis in scirrhous gastric cancer treatment  
  
 研究代表者  
 安本 和生 (YASUMOTO, Kazuo)  
  
 金沢医科大学・医学部・教授  
  
 研究者番号：90262592  
 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)：スキルス胃癌の新たな治療法開発は重要課題である。本研究では、本病態の急速な癌細胞ならびに線維芽細胞増殖の詳細な解明から新たな分子標的を見出し治療法開発につなげることを目指した。本研究期間において、スキルス胃癌特有の細胞増殖機構の解析からスキルス胃癌特異的な増殖活性化経路が判明し、それら経路の阻害によるスキルス胃癌特異的な細胞増殖抑制を発見(2018年特許申請、2019年同PCT出願)し、論文化、特許化、さらに企業への導出を図る予定である。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌診療において進行癌患者の1割を占めるスキルス胃癌は、食欲低下や生命の期間を規定する腹水を伴うがん性腹膜炎を高頻度に発症する。そのため治療法の開発は喫緊の重要課題である。本研究では、スキルス胃癌特有の急速進展に深く関わる癌細胞の増殖機構にスポットを当て新たな治療法開発を目指した。

本研究で、新たな治療標的となる細胞内増殖経路の2経路の同時阻害が、非常に強い抑制効果をもたらすことを見出した。腹水の貯留する進行癌症例において新たな治療法となりうる可能性が高く、今後新規治療法の確立を視野に進める方針である。

研究成果の概要(英文)： We need to address high-priority issue for the development of new target therapies of peritoneal carcinomatosis from scirrhous gastric cancer. Our results in this study strongly suggest that HGF- and amphiregulin-induced activation of MET- and/or EGFR-mediated signaling pathways, MEK and mTOR, play important roles in the pathogenesis of peritoneal carcinomatosis in scirrhous gastric cancer. Thus, MEK and mTOR signaling pathways may be potential therapeutic targets for peritoneal carcinomatosis of scirrhous gastric cancer.

We succeeded in development of new targeted therapy for scirrhous gastric cancer, which inhibited effectively reduced ascitic fluid formation and prolonged their survival of nude mice bearing established tumors by scirrhous gastric cancer cells. We applied for a patent for this invention.

研究分野：臨床腫瘍学、胃癌、癌性腹膜炎、分子標的治療

キーワード：スキルス胃癌 癌性腹膜炎 分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

スキルス胃癌は、胃癌全体の 10%を占め、スキルス胃癌細胞からなるいわゆる硬癌とも称され、高度癌間質増生による急速進展壁硬化所見を特徴とするびまん性発育浸潤胃癌である。殊に悪性腹水を伴う癌性腹膜炎を高頻度に発症することで知られ、その予後は極めて不良である (Duarte I, et al. *Human Pathol* 1981;12:237-42)。しかしながら、本病態形成の成因ならびに高頻度に合併する悪性腹水を伴う癌性腹膜炎の形成機序はいまだ十分に明らかにされていない。また、早期診断は非常に困難で、ほとんどの患者は病態が完成して初めて医療機関を受診するのが実状である。さらに根治術の適応はなく、合併する癌性腹膜炎に対する治療に止まるが、効果的な治療法は見出されておらずいまだ治療効果においても限界がある。近年、胃癌領域においてわが国主導による新たな標準療法 (TS-1+CDDP 療法) の確立・導入や HER2 分子を標的とした分子標的治療の臨床導入がなされ、一定の効果が得られているものの、スキルス胃癌では HER2 発現頻度は低く効果は期待できない。

胃癌転移には臓器選択性があり、スキルス胃癌は腹膜転移を発症しやすい。実験的臓器選択性転移にケモカインの関与が報告され (Muller A, et al. *Nature* 2001; 410:50-6)、我々は、胃癌性腹膜炎形成におけるケモカインの役割について検討を開始した。興味深いことに、スキルス胃癌は選択的に CXCR4 を高発現し、転移臓器である腹膜 (中皮細胞にリガンド CXCL12 が高発現し、癌性腹水中にも高濃度に存在) に選択的に転移増殖するという CXCR4/CXCL12 axis の胃癌臓器選択性腹膜転移への重要な関与を臨床的にも動物モデルを用いた治療実験でも明らかにした (Yasumoto K, et al. *Cancer Res* 2006; 66:2181-7)。

さらに、悪性腹水貯留が急速な病態進展をもたらすことから、腹水中増殖因子に着目した解析を行った結果、EGFR リガンドの Amphiregulin, HB-EGF が腹水中には多量に存在し、オートクリン誘導 Amphiregulin は癌細胞自身を、パラクリン誘導 HB-EGF は線維芽細胞を、運動能・増殖能ともに著明に活性化すること、さらに HB-EGF は、Amphiregulin の相乗的産生、CXCR4 発現誘導など CXCR4/CXCL12 axis とも相互促進作用を発揮する事を明らかにした。EGFR リガンド Amphiregulin, HB-EGF は癌性腹膜炎の急速進展増悪に深く関与し、有効なバイオマーカーとなることを報告した (Yasumoto K, et al. *Clin Cancer Res* 2011“Highlightsで紹介”)。

さらには、MET 増幅のないスキルス胃癌細胞のみが腹水を伴う癌性腹膜炎を形成することをマウスへの移植実験から見出し、HGF/MET axis の悪性腹水産生を伴うスキルス胃癌癌性腹膜炎形成への関与を明らかにした。すなわち、スキルス胃癌特異的に、癌間質 HGF 産生誘導 (パラクリン機序) ならびに HGF による強力な増殖活性誘導を確認し、さらに MET 経路阻害は、実験的腹水貯留癌性腹膜炎病態を著明に改善し大幅な予後延長をもたらし、手術不能進

行スキルス胃癌に対する MET 阻害の臨床応用への可能性を報告した (Yasumoto K, et al. *Cancer Sci* 2013 “Highlights で紹介” )。

以上のように我々は初めて、CXCR4/CXCL12 axis、EGFR/EGFR リガンド ( amphiregulin・HB-EGF ) axis、さらには MET/HGF axis の 3 axes が、本病態の形成・増悪進展に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。とりわけ、癌間質誘導性 HGF による細胞増殖賦活作用は本病態を高頻度に発症するスキルス胃癌細胞特異的に認められ、悪性腹水を伴う癌性腹膜炎形成と密接に関係し、さらに siRNA による MET 遺伝子発現抑制もまたこれらスキルス胃癌細胞に強力な増殖誘導をもたらす。パラクリン HGF 誘導性ならびに MET 発現抑制誘導性細胞増殖機構の解明から、癌性腹膜炎高頻度発症スキルス胃癌に対する革新的胃癌標的治療法開発を目指す。

## 2 . 研究の目的

スキルス胃癌は高頻度に難治性の癌性腹膜炎を発症させ、しかも急速な病態進展からいまだに有効な治療法が見出されていない。悪性腹水合併機序の解明から、本病態形成進展における HGF/MET axis の重要性が明らかとなった。しかし近年、海外において進行胃癌を対象に MET を標的とした臨床試験がいくつか施行されたが十分な奏効は示せていない。本病態への HGF/MET axis の重要性に鑑み、スキルス胃癌細胞における MET の生物学的意義を再検討するため、siRNA を用いて MET 遺伝子発現を抑制した結果、siMET (遺伝子発現抑制) は、悪性腹水合併癌性腹膜炎指向性スキルス胃癌細胞に強力な細胞増殖を誘導することが判明した。スキルス胃癌特異的パラクリン HGF 誘導性ならびに MET 発現抑制誘導性細胞増殖機構の解明から、癌性腹膜炎高頻度発症スキルス胃癌に対する革新的胃癌標的治療法開発を目指すことを目的とした。

## 3 . 研究の方法

いまだ効果的な治療法の見出せていないスキルス胃癌高頻度合併悪性腹水を伴う胃癌性腹膜炎に対する革新的治療法開発のために、発症進展機序ならびに MET 標的治療効果発現への根幹をなす、( 1 ) パラクリン HGF 誘導性細胞増殖賦活機構、( 2 ) siMET (siRNA による遺伝子発現抑制) 誘導性細胞増殖機構を、未処理群と処理群との phospho-kinase array 法を用いて詳細に検討し、新規介在性因子の解明から in vivo 治療実験を通して、スキルス胃癌指向性癌性腹膜炎発症進展病態を特異的・本質的に制御しうる革新的胃癌標的治療法の開発を目指す。また、スキルス胃癌の間質線維芽細胞特異的に観察される HGF 産生誘導機序を非スキルス胃癌群との対比を通して、免疫組織学的ならびに分子生物学的手法を用いて解明する。

#### 4. 研究成果

スキルス胃癌に特異的に観察されるパラクリン HGF 刺激細胞増殖機序の解明を目的に、まず細胞内活性化因子の同定を目的に phospho-kinase array 法を用いて詳細に検討した。誘導される細胞内リン酸化蛋白 43 種の発現について、非スキルス胃癌細胞株（誘導増殖活性なし）と対比する形で検討。リン酸化蛋白群の中で、とくに JNK1/2/3, Akt-mTOR 系 PRAS40, P70S6 kinase や STAT3 は両群に、WNK-1 および STAT5 a/b は非スキルス胃癌細胞のみにリン酸化誘導が確認された。本結果を踏まえ、JNK 阻害薬 2 種を用いての増殖抑制効果の検証、siRNA を用いた STAT3 ノックダウンでの増殖抑制実験では抑制効果を認めなかった。そこで、増殖経路としてよく知られる RAS/RAF/MEK/ERK 系と PI3K/Akt/mTOR 系について、各種阻害薬を用いて HGF 誘導性スキルス胃癌誘導性活性化経路の特定を試みた。その結果、スキルス胃癌細胞や Met 遺伝子増幅胃癌細胞では、MAPK/ERK 経路の活性化が強く、MEK 阻害薬に対する感受性が非常に高いことが判明した。さらに、MEK 阻害薬に PI3K/Akt/mTOR 系の mTOR 阻害薬を併用することで、さらに相乗的抑制効果を発揮することが判明した。これら阻害薬併用は、スキルス胃癌細胞のベースライン増殖も低濃度から抑制することも判明した。

「MEK 阻害薬 + mTOR 阻害薬併用」による HGF 誘導性増殖抑制効果の汎用性を検証すべく MEK 阻害薬ならびに mTOR 阻害薬それぞれ数種ずつ検討した結果、同様の抑制効果を認めた。一方、非スキルス胃癌細胞では本効果は認めずスキルス胃癌特有と考えられた。これら in vitro での検討結果をもとに、当科保有の癌性腹膜炎発症ヌードマウスモデルを用いて、

「MEK 阻害薬 + mTOR 阻害薬併用」による癌性腹膜炎抑制効果の検証を行った。単剤投与群に比して、併用群により腹水の減少ならびに生存期間の著明な延長効果が確認され、臨床応用への可能性が強く示唆された。

さらに、スキルス胃癌特有の癌間質 HGF 高産生誘導機構について検討を加えた。癌間質線維芽細胞は HB-EGF の刺激により著明に細胞増殖する (Yasumoto K, et al. Clin Cancer Res 2011) が、HB-EGF はマクロファージより amphiregulin 刺激により産生誘導されることが判明した。Amphiregulin はオートクリンに胃癌細胞より産生されるが、HGF 刺激でコントロールに比して 10 倍強産生誘導されることも新たに見出した。またスキルス胃癌腫瘍局所にはマクロファージが豊富に集積するが（この局所への遊走集積には、癌間質線維芽細胞が発現する豊富な CCL2 が関与することも本研究で明らかとなった。

以上の研究結果から、本病態特異的本質的 HGF/MET axis の活性化は、CXCR4 発現スキルス胃癌細胞周囲に CXCL12 発現線維芽細胞が集積し、線維芽細胞から豊富に CCL2 が産生され、局所にマクロファージを豊富に集積させ、癌細胞由来 amphiregulin によりマクロファージから HB-EGF が産生誘導され、この HB-EGF は線維芽細胞から豊富な HGF 産生を通して

本病態特有のびまん性癌浸潤と高度な線維増生をもたらすことが示唆された。HGF/MET axis 細胞内活性化経路遮断の検討から、MEK/MAPK 経路と mTOR 経路の同時阻害が本質的に制御するものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 葛西 傑、安本 和生、川島 篤弘、松本 邦夫、矢野 聖二、元雄 良治
2. 発表標題 Distinctive cancer-associated fibroblasts are involved in scirrhous gastric cancer progression
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葛西 傑、安本 和生、川島 篤弘、元雄 良治
2. 発表標題 The role and biology of tumor-associated stroma progressing in scirrhous gastric cancer
3. 学会等名 第91回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葛西 傑、安本 和生、川島 篤弘、松本 邦夫、元雄 良治
2. 発表標題 スキルス胃癌進展における癌間質の役割とその意義
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 特許権	発明者 安本 和生	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、101086	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 特許権	発明者 安本 和生	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/020689	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 特許権	発明者 安本 和生	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、213496	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 特許権	発明者 安本 和生	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/044662	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	石垣 靖人  (ISHIGAKI Yasuhito)  (20232275)	金沢医科大学・総合医学研究所・教授    (33303)	