

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18591482

研究課題名(和文) コラーゲン合成制御によるスキルス胃癌間質の繊維化、
硬化抑制に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Study on stroma of scirrhous gastric carcinoma
Down regulation of collagen synthesis by siRNA in tumor tissue

研究代表者

菊池 史郎 (KIKUCHI SHIRO)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：30161417

研究成果の概要：

本研究では、スキルス胃癌組織の実験モデルを開発し、コラーゲン産生の抑制が新たな治療戦略となりうるかについて検討することを目的とした。

標的分子としてコラーゲン産生特異的分子シャペロン蛋白である heat shock protein 47 (HSP47) を選択し、この標的蛋白質に対する発現抑制を行うため small interfering RNA (siRNA) 導入癌細胞株を作成した。スキルス胃癌モデルにおける移植癌細胞の増殖状況を、ウイルス導入前後で比較した。結果、数例でウイルス導入株に癌細胞の増殖抑制を認めたものの、大部分の移植片では増殖に明らかな違いは認められず、癌細胞自身から産生するコラーゲン産生の関与があまり大きくないことが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,000,000	0	2,000,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学，消化器外科学

キーワード：胃癌，スキルス，コラーゲン，HSP47

1. 研究開始当初の背景

胃壁にびまん性癌浸潤を伴うスキルス胃癌の予後は極めて不良である。これは癌細胞の広範な浸潤に伴う癌間質の著しい繊維化、硬化を特徴とし、その結果胃壁のみならず遠隔転移臓器にも同様に重篤な間質変化を生じ致命的な臓器障害を喚起することが原因と考えられる。この間質誘導のメカニズムは依然十分に解明されていないが、間質の線維芽細胞（コラーゲン産生細胞）がこの過程に重要な役割を担っていることが知られている。この間質誘導（過剰な繊維化、コラーゲンの増生）の抑制、制御は新しいスキルス胃癌治療法の開発、その臨床応用への糸口となることが期待される。

一方、現在まで腹膜や腎などの繊維化疾患に対しコラーゲン合成を阻害し、ヒドロキシプロリンの産生を抑えるような様々な薬物の開発が試みられてきたが十分な効果は得られていないのが現状である。最近、熱ショック蛋白（HSP 47；細胞内小器官である小胞体内に局在し、コラーゲン産生に特異的な分子シャペロン）が臓器繊維化の抑制に重要な意義をもつことが判明し、Antisense oligonucleotides (ODNs)等を用いて HSP 47 の制御を行い、繊維性疾患における過剰コラーゲンの産生を実験的に阻止できることが報告され、その臨床応用が期待されている。

2. 研究の目的

本研究はこの HSP 47 に注目し、スキルス胃癌間質誘導を抑制することの意義を明らかにし、また間質の誘導と癌の増殖との相互関係について、基礎的に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験モデルの開発

過去の実験結果ではヌードマウス皮下に移植を行った際、スキルス胃癌樹立細胞株（Kato III）とヒト樹立線維芽細胞株（TIG101）を1型コラーゲンと伴に移植した場合のみに生着したが、腫瘍の増殖はそれぞれの細胞数とコラーゲン濃度により大きな差異がみられた。そこで、KATO IIIとTIG101、1型コラーゲンの三者を用いてヌードマウスを用いたスキルス胃癌皮下移植モデルの確立を目指し、至適な条件（細胞数、コラーゲン濃度）を検討した。

(2) 癌間質（コラーゲン産生）の誘導抑制に関する検討

HSP 47 の発現を安定的に抑制するため、

レトロウイルスを用いて siRNA を導入した細胞株を作成した。この細胞株を用いて、間質の誘導がどの程度制御が可能であるかどうかを抗 HSP 47 抗体を用いた免疫組織学的検討とリアルタイムPCRによる mRNA の定量を行うことにより明らかにした。

この HSP 47 発現抑制株と抑制前野生株を用いて、実験モデルで比較することにより両者の増殖状況を形態的に観察した。

4. 研究成果

(1) 実験モデルの開発

スキルス胃癌細胞株（Kato III）は、ヒト線維芽細胞（TIG101）をコラーゲンと伴に移植した場合のみにヌードマウス（4週齢雌 BALB/c nude mice (CLEA Japan, Inc.)) 皮下に生着したが、その腫瘍の増殖はそれぞれの細胞数により大きな差異がみられ、コラーゲン0.1ml内に各細胞 5.0×10^5 個を混合した場合であった。また、生着率が低く、実験モデルとして十分な再現性を得ることが困難なモデルであった。

移植細胞の生着率

高密度なコラーゲン密度環境を得る事が出来る閉鎖式循環培養装置（BKR-05, ABLE Biott）によるコラーゲン高密度培養組織は、線維芽細胞と共培養することにより、ヌードマウス皮下に最高2日間豊富な間質性分を保ちつつ、100%の割合で癌細胞を移植さ

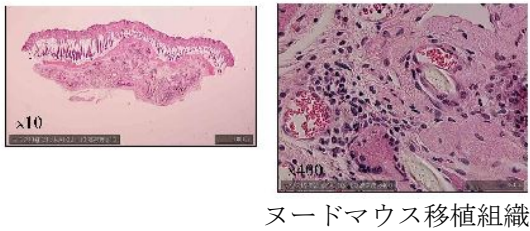
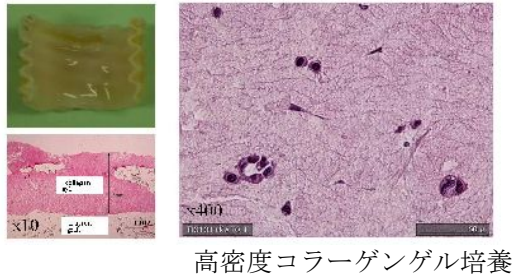
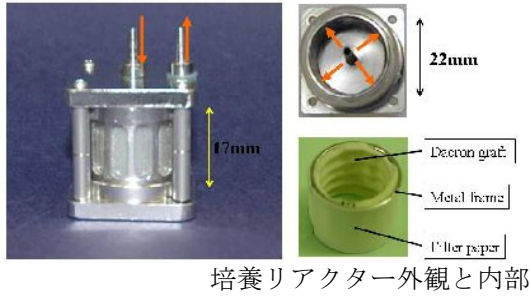
KATO III/TIG101	day 4	day 7	day14	day21
A: 1.0×10^4 (0.1ml)	75% (6/8)	67% (2/3)	33% (1/3)	37.5% (3/8)
B: 5.0×10^4	67% (2/3)	67% (2/3)	33% (1/3)	40% (2/5)
C: 1.0×10^5	100% (8/8)	67% (2/3)	67% (2/3)	37.5% (3/8)
D: 5.0×10^5	100% (3/3)	100% (3/3)	33% (1/3)	60% (3/5)
E: 1.0×10^6	62.5% (5/8)	67% (2/3)	67% (2/3)	25% (2/8)
F: 5.0×10^6	100% (3/3)	67% (2/3)	67% (2/3)	40% (2/5)
KATO III				
G: 1.0×10^5	60% (3/5)			0% (0/5)
collagen (-)				
H: 1.0×10^5				0% (0/5)

せることが可能であり、実験モデルとして使



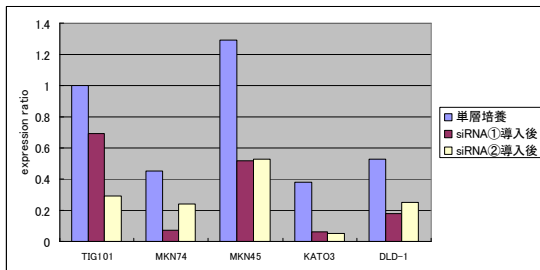
用することとなった。

閉鎖式循環培養装置（BKR-05, ABLE Biott）



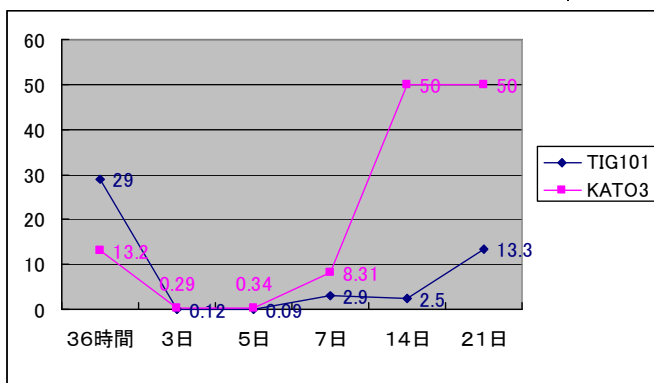
(2) 癌間質 (コラーゲン産生) の誘導抑制に関する検討

HSP47codeする遺伝子 (SERPINH1) を target として siRNA 2 種類 (Hs_SERPINH1_1 HP) (Hs_SERPINH1_2 HP) をデザインし、リアルタイム PCR (Light Cycler 2, Roche) による mRNA の発現抑制を確認した。



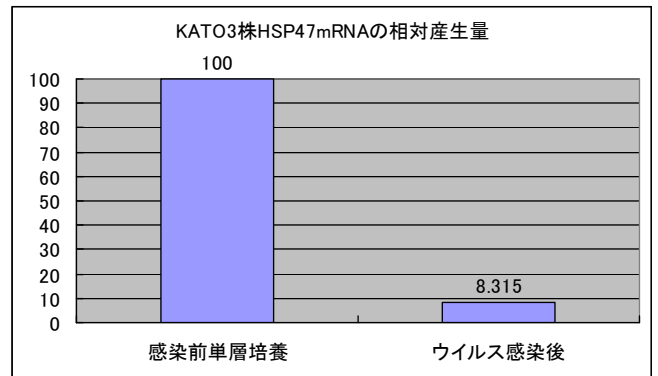
siRNA① : Hs_SERPINH1_1 HP
siRNA② : Hs_SERPINH1_2 HP

抑制効果の高かった Hs_SERPINH1_2 HP を使用し、実験モデルにて抗腫瘍効果を確認するも、明らかな形態的な変化を認めなかった。7日目には mRNA 量が増加し始めており、

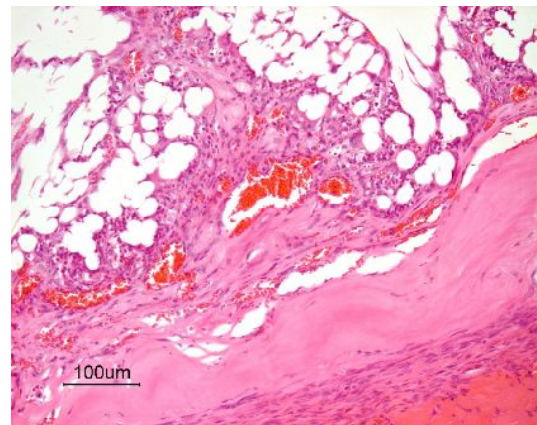


抑制効果が持続しないことが示唆された。

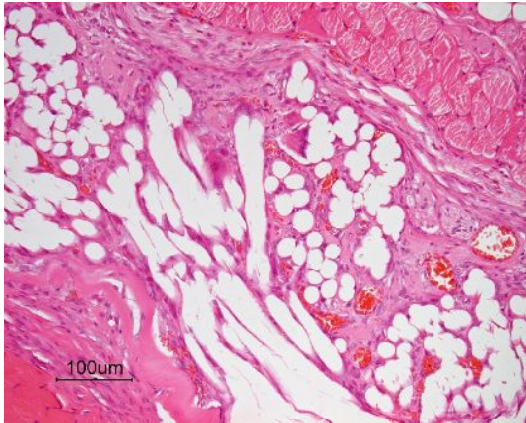
持続的な siRNA の抑制効果を得るために、実験で使用した siRNA の配列を持つプラスミドベクターをレトロウイルスに導入した。(タカガバ 氏 Co. に受託) このウイルスを細胞株に感染させた後 3 継代を経た細胞は、感染前の細胞株と比較し相対的に mRNA の発現量が 8% にまで抑制されていた。また、線維芽細胞 (TIG101) にはウイルスを導入することが出来なかったため、以降の実験は KATO3 株のコラーゲン産生抑制に対してのみ評価することとなった。



スキルス胃癌モデルにおける移植癌細胞の増殖状況を、ウイルス導入前後で光学顕微鏡下に組織学的に比較した。結果、数例でウイルス導入株に癌細胞の増殖抑制を認めたものの、大部分の移植片では増殖に明らかな違いは認められず、スキルス胃癌細胞の生着、増殖には癌細胞、線維芽細胞、コラーゲン線維の 3 者が重要であることは既報告の通りではあるが、癌細胞自身から産生するコラーゲン産生の関与があまり大きくないことが示された。



siRNA ウイルス導入前細胞株移植組織片



siRNA ウイルス導入後細胞株移植組織片

今後、癌細胞周囲に存在する線維芽細胞より産生供給されるコラーゲン線維及び移植時に直接添加されるコラーゲンの関与に関しても、siRNA 導入線維芽細胞株を作成することによる検討を要すると考えられた。

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 9 件)

1. Kawashima S, Imamura Y, Ediriweera P. S. C, Noda T, Takahashi R, Adachi E, Takahashi C and Noda M: Localization of the membrane-anchored MMP-regulator RECK at the neuromuscular junctions. *J Neurochem* **104(2)**, 376-385 (2008). 査読有
2. Jung Stephanie M, Takemura, Y, Imamura Y, Hayashi T, Adachi E, Moroi M: Collagen-type specificity of glycoprotein VI as a determinant of platelet adhesion. *Platelets Feb* **19(1)** 32-42 (2008) 査読有
3. Kihara T, Imamura Y, Takemura Y, Mizuno K, Adachi E, and Hayashi T: Intercellular accumulation of type V collagen fibrils in accordance with cell aggregation. *J. Biochem.* **144(5)** 625-633 (2008) 査読有
4. Fujisaki H, Adachi E and Hattori Shunji: Keratinocyte Differentiation and proliferation are regulated by adhesion to the three-dimensional meshwork structure of type IV collagen. *Connective Tissue Research*, **49(6)** 426-436 (2008) 査読有
5. Iwashita, S., Kobayashi, M., Kubo, Y., Hinohara, Y., Sezaki, M., Nakamura, K., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Sato, S., Fukuda, M., Ohba, M., Kato, C., Adachi, E. and Song, S.Y.: Versatile roles of R-Ras GAP in neurite formation of PC12 cells and embryonic vascular development. *J. Biol. Chem.* **282(6)**, 3413-3417 (2007) 査読有
6. Fujisaki H, Ebihara T, Irie S, Kobayashi T, Adachi E, Mochitate K, and Hattori S: Keratinocyte apoptosis on type I collagen fibrils is prevented by Erk1/2 activation under high calcium conditions *Connect. Tissue Res.* **48(3)** 159-169 (2007) 査読有
7. Song Si-Young, Kato C, Adachi E, Moriya-Sato A, Inagawa-Ogashiwa M, Umeda R, Hashimoto N: Expression of an acyl-CoA synthetase, lipidosin, in astrocytes of the murine brain and its up-regulation during remyelination following cuprizone-induced demyelination. *J. Neurosci. Res.* **85(16)**, 3586-3597 (2007) 査読有
8. Hirai K, Kikuchi S, et al, Immunohistochemical Distribution of Heat Shock Protein 47 (HSP47) in Scirrhus Carcinoma of the Stomach *Anticancer Research.* **26**, 71-78 (2006) 査読有

9. Goto Mizuki, Sumiyoshi Hideaki, Sakai Takao, Fössler R, Ohashi S, Adachi E, Yoshioka H, Fujiwara S: Elimination of epiplakin by gene targeting results in acceleration of keratinocyte migration in mice. *Molecular & Cellular Biology*. **26(2)**. 548-558 (2006) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. Eijiro Adachi, Takashi Aihara, Satoshi Hosoya and Hironobu Iwashiro: Restoration to a contractile phenotype from dedifferentiated status of smooth muscle cells in layered vascular constructs. Gordon Research Conference 2007 , アメリカ
2. 平井 和弥、菊池 史郎、栗田 敦、安達 栄治郎、渡邊 昌彦: スキルス胃癌微小環境の再生と線維化制御の意義について. 第 7 8 回日本胃癌学会, 2006, 横浜
3. 安達 栄治郎: 細胞外マトリックスの生物学とバイオマテリアル足場. 第 9 回日本組織工学会 2006, 京都 (抄録集 p. 80).

[図書] (計 1 件)

1. 安達 栄治郎、相原 孝至、大橋 しほ花、浅野 仁美、水野 一乗 “細胞外マトリックスの生物学” ティッシュエンジニアリング, 日本医学館, 東京, 2006, 3-12 頁.

[産業財産権]

○取得状況 (計 2 件)

1. 名称: 高密度培養組織の製造方法及び高密度培養組織
発明者: 安達栄治郎、大橋しほ花、
他 1 名
権利者: 学校法人北里学園
種類: 特許権
番号: WO2006/088029
取得年月日: 2006年8月24日
国内外の別: 国外
2. 名称: コラーゲン特異的分子シャペロン H S P 4 7 の測定方法
発明者: 渡邊 昌彦, 菊池 史郎

他4名

権利者: 学校法人北里学園
種類: 特許権
番号: 特開 2008-122276
取得年月日: 2008年05月29日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 史郎 (KIKUCHI SHIRO)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号: 30161417

(2) 研究分担者

安達 栄治郎 (ADACHI EIJIRO)
北里大学・医療系研究科・教授
研究者番号: 30110430

二渡 信江 (FUTAWATARI NOBUE)
北里大学・医学部・助教
研究者番号: 40306600

永田 和宏 (NAGATA KAZUHIRO)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号: 50127114

黒山 信一 (KUROYAMA SHINCHI)
北里大学・医学部・助教
研究者番号: 10286297