

令和 4 年 9 月 1 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02883

研究課題名(和文) スキルス胃癌組織構築機序の解明と治療開発：骨髄細胞と癌幹細胞による間質形成の解析

研究課題名(英文) Mechanisms for the stromal construction of the scirrhous gastric cancer: role of myeloid cells and cancer stem cells on the formation of tumor stroma

研究代表者

八代 正和 (Yashiro, Masakazu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60305638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,700,000円

研究成果の概要(和文)：スキルス胃癌は癌関連線維芽細胞(CAF)の増生を伴いながら増殖進展し、このCAFが難治性に関与している。本研究は、スキルス胃癌におけるCAF形成メカニズムを明らかにし、その機序に基づくCAF抑制法によるスキルス胃癌の治療薬開発を目的とした。本研究により、スキルス胃癌のCAF形成は骨髄由来細胞が関与していること、また、スキルス胃癌細胞が産生するCXCL1が骨髄細胞のCXCR2に作用することでCAFが増生することを明らかにした。事実、CXCR2阻害剤がスキルス胃癌マウスの増殖進展を抑制した。この成果により、CXCL1-CXCR2シグナル抑制が、スキルス胃癌治療法開発に有望であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
スキルス胃癌細胞の産生するCXCL1が間葉系幹細胞のCXCR2に作用してCAF増生を招来するメカニズムを世界に先駆けて明らかにした。この成果に基づき、CXCR2阻害あるいはスキルス胃癌細胞産生のCXCL1を阻害してCAF増生を抑制するスキルス胃癌治療法が開発されれば、比較的若年に発症する難治癌であるスキルス胃癌の予後が改善されるため、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Tumor stromal cells play a critical role in the progression of scirrhous gastric cancer (SGC). The aim of this study was to clarify where tumor stromal cells originate from and which factor(s) recruits them into the tumor stroma. The influences of CXCR2 inhibitor on the migration of bone marrow-derived mesenchymal cells (BM-MCs) were examined both in vitro and in vivo. BM-MCs frequently migrated into stroma of DGC in vivo. CXCL1 from DGC cells stimulated the chemoattractant ability of BM-MCs. CXCR2 inhibitor decreased the migration of BM-MCs, stimulated by SGC cells. A CXCR2 inhibitor reduced the recruitment of BM-MCs into the tumor in vivo, decreasing tumor size and lymph node metastasis, and prolonging the survival of gastric tumor-bearing mice. These findings suggested that CXCL1 from SGC cells stimulates the recruitment of BM-MCs into tumor stroma via CXCR2 signaling of BM-MCs. Inhibition of BM-MC recruitment via the CXCL1-CXCR2 axis appears a promising therapy for SGC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：スキルス胃癌 CXCL1 CXCR2 線維芽細胞 骨髄由来細胞

1. 研究開始当初の背景

癌の増殖進展は、癌細胞のみならず癌細胞周囲の微小環境が影響していることが明らかになってきた。申請者は、胃癌細胞と癌間質線維芽細胞との相互作用の観点から、胃癌の増殖進展機序を検討してきた。これらの研究により、胃癌の増殖・転移過程は、癌細胞のみならず癌微小環境に存在する癌関連線維芽細胞(CAF; Cancer-associate fibroblasts)が関与することを明らかにしてきた(Carcinogenesis 2015, Oncogene 2014, Int J Cancer 2014, Nature Commun 2014, PNAS 2007, Gastroenterology 2006)。しかし、癌微小環境には、CAFのみならず、血管やリンパ管を構成する脈管系細胞、免疫細胞、脂肪細胞など、種々の細胞が存在する。これらの間質細胞が癌細胞の増殖進展に影響し、転移・再発や治療抵抗性などの癌悪性度を促進していると考えられる。癌微小環境に存在する間質組織は癌細胞が育ついわば“土壌”の役割を果たしており(Cancer Microenvironment 2010, *Nat Rev Cancer*. 2009)、間質の制御は癌治療のkeyとなることが推察される。しかしながら、この間質細胞の起源や増生機序が解明されていないため、癌間質制御が未だ困難である。最近、癌間質を構成する細胞には骨髄を起源とする細胞が存在することが示唆されている(Nat Med. 2013 19:1423-37)。正常組織では、骨髄由来の前駆細胞が末梢血中を循環し体組織で種々の間質細胞に分化転換することが明らかにされている(Nature. 2010;463:1035)。癌組織においても骨髄細胞が、骨髄から末梢血を介して癌病巣に到達し種々の間質細胞に分化し、癌細胞の増殖進展に好都合な癌微小環境組織を構築することが推察される(Cancer Cell. 2012 21:309, Cancer Metastasis Rev 2010 29:249)。癌細胞は骨髄細胞の誘導分化をコントロールしている可能性が高い。事実、申請者はスキルス胃癌マウスを用いた検討により、骨髄起源細胞が癌微小環境に動員され、癌間質組織に誘導分化していることを確認した。つまり、GFP陽性骨髄移植マウスの胃壁に胃癌細胞を移植し、形成された胃腫瘍組織内にGFP陽性骨髄細胞が多く存在することを確認した。また、蛍光顕微鏡により、GFP陽性細胞が腫瘍間質に多く存在し、 α -SMA陽性のCAFに分化した細胞や、 α -SMA陰性細胞、血管内皮細胞などに分化していることを確認した。また胃癌細胞の産生する因子が、ヒト骨髄由来間葉系細胞の運動能を促進させ、さらにマトリゲル3次元培養内で骨髄細胞を血管やリンパ管に分化させることを確認した。

以上の結果から、骨髄起源細胞が胃癌組織内に誘導され様々な間質細胞に分化し癌組織を構築していることを確認した。これらの結果は、癌細胞の産生する因子が、骨髄細胞の走化性や、CAFあるいは脈管細胞等への分化を促進していることを示唆する。この病態において、癌細胞の産生する骨髄細胞誘導因子の同定および、CAFや脈管細胞への分化因子の同定は、微小環境を構成する癌間質組織の病態解明や癌治療開発にきわめて有用であると考えた。そこで今回、「胃癌微小環境における骨髄由来細胞の誘導分化の機序解析と新規治療法の開発」という着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、スキルス胃癌における癌間質形成メカニズムを明らかにし、その機序に基づいてスキルス胃癌の治療薬を開発することである。従って本研究の目的は、癌細胞の産生する骨髄由来細胞誘導因子の同定や癌間質細胞の分化促進因子の同定および骨髄起源細胞の分化細胞の機能解析により癌間質組織構築の病態を明らかにすること、さらにこれらの知見に基づいて骨髄由来細胞を標的にして癌組織構築を抑制する新規癌治療法を開発することである。

現在、国内・国外において癌微小環境の研究が注目され、癌細胞と間質細胞との相互作用研究が相次いで報告されている。最近、癌間質における骨髄細胞の関与が注目されてきたが、癌細胞から産生される骨髄細胞誘導促進因子や分化転換促進因子は明らかにされておらず、またそれらの因子や骨髄由来細胞を標的とした癌治療法も開発されていない。本研究は、骨髄由来細胞による癌組織構築の機序解明、癌細胞の産生する骨髄由来細胞誘導分化因子の同定、および骨髄細胞を標的とした癌間質抑制による癌治療とする点において、国内外にない新規性がある。また前述の如く、申請者は誘導因子や分化転換因子を解析するために独自の *in vivo*, *in vitro* アッセイモデル作成に成功している。癌細胞は種々の増殖因子やサイトカインを産生しており、我々の開発したアッセイモデルを用いることで、目的とする骨髄細胞誘導因子や分化因子の同定が可能と考える。さらに、その分子の阻害剤による骨髄細胞誘導抑制が確認できれば間質組織を標的としたユニークな作用機序をもつ創薬が期待できる。

3. 研究の方法

GFP標識した骨髄細胞を移植したマウスにスキルス胃癌を作成し、6週間後マウススキルス胃癌組織における骨髄由来細胞の同在を、各種抗体(GFP抗体、CD271抗体)を用いて免疫組織化学的染色法で検討した。

胃癌細胞株とBM-SCの増殖能および遊走能に関する検討

*In vivo*の検討でも、GFP陽性骨髄を移植・定着させたヌードマウスに、当科で樹立した胃癌細胞株OCUM-2MLNを胃へ移植した同所移植モデルを作成した。作成されたマウス胃癌組織を間質細胞のマーカーである α -SMAを用いて染色を行った。

臨床胃癌組織 279 例を CD271 抗体により免疫組織的に染色し、CD271 陽性間質細胞と臨床病理学的背景との関連性を検討した。

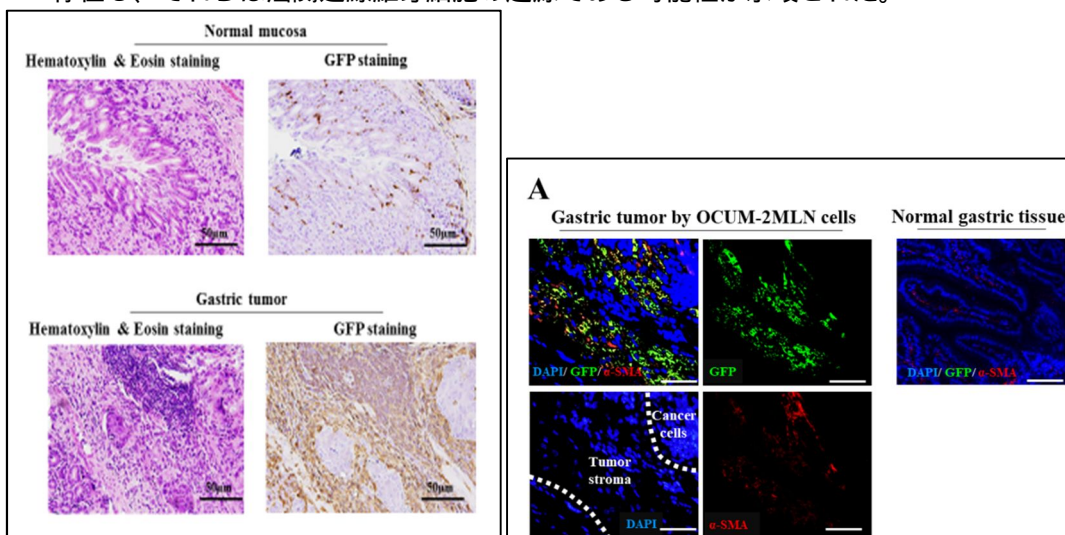
骨髓由来間質細胞の遊走・浸潤能促進因子の検索・同定。Chemotaxis assay を用いた遊走・浸潤能の検討。cytokine array, ELISA を用いた検討。

スキルス胃癌細胞株の同所移植を施行したマウスに CXCR2 阻害剤の週 5 回投与を行い、マウスにおける CXCR2 阻害剤の検討を行った。

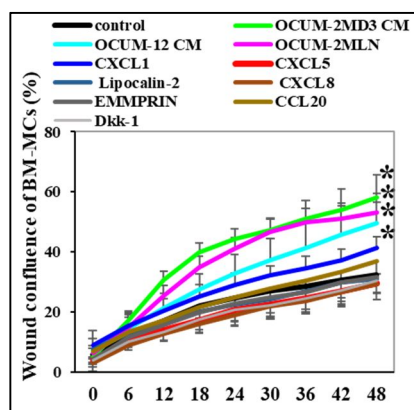
4. 研究成果

上記の検討の結果

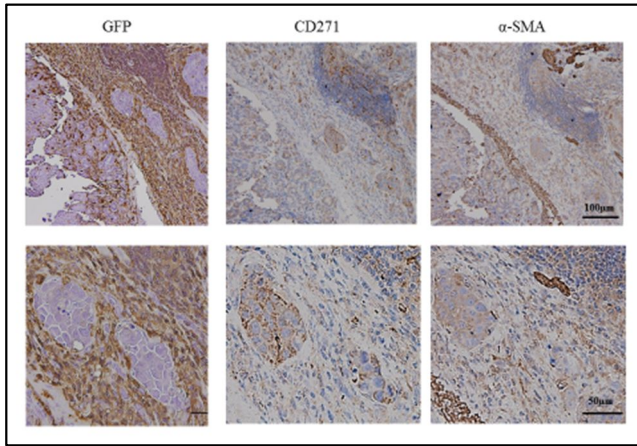
マウススキルス胃癌組織の微小環境において多数の GFP 陽性骨髓由来細胞の浸潤を認め、それらは CD271(骨髓由来間葉系幹細胞のマーカー)、 α -SMA(癌関連線維芽細胞のマーカー) の共発現を認めた。この結果から胃癌間質には骨髓由来細胞、特に骨髓由来間葉系幹細胞が存在し、それらは癌関連線維芽細胞の起源である可能性が示唆された。



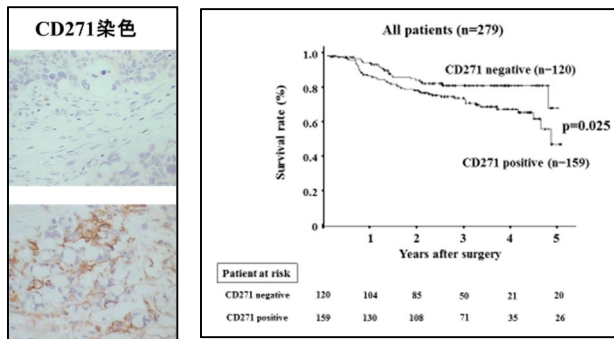
BM-SC の培養上清は胃癌細胞株の増殖能、遊走能を亢進させ、また胃癌細胞株の培養上清は BM-SC の増殖能を亢進させた。この結果から、BM-SC は胃癌の増殖・転移に関与していると考えられた。



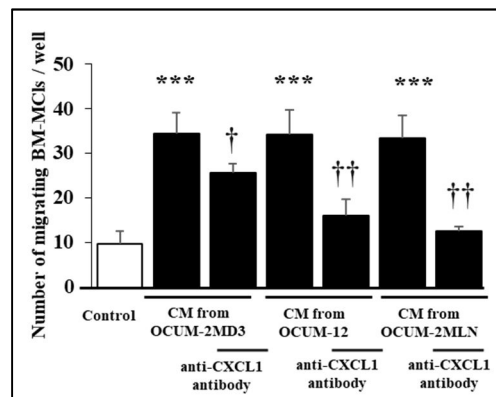
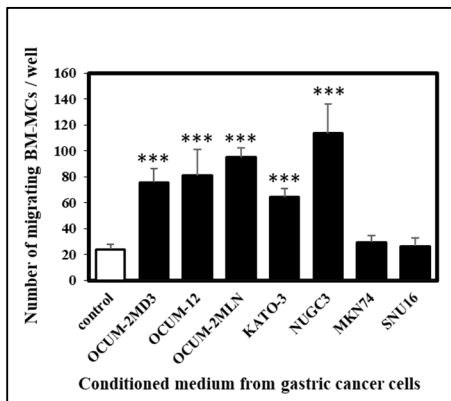
マウス胃癌組織を間質細胞のマーカーである α -SMA を用いて染色を行ったところ、GFP 陽性細胞のなかに α -SMA 陽性細胞が存在することを確認した。従って、癌微小環境に骨髓由来間質細胞が動員されていることが明らかになった。骨髓由来間質細胞は正常部分の胃粘膜にはほとんど動員されていなかった。スキルス胃癌細胞上清は骨髓由来間質細胞の遊走能を亢進させることから、スキルス胃癌の微小環境において、癌細胞の産生する因子が骨髓細胞を癌細胞周囲にリクルート(遊走・分化) し CAF や脈管細胞に分化させ、癌細胞自らの増殖進展に適した環境を構築していることが示唆される。

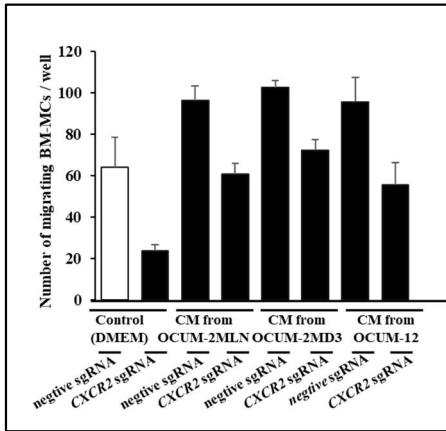


臨床胃癌組織における CD271 発現は T 因子、肉眼型 4 型、未分化型と相関しており、スキルス胃癌に有意に高頻度であった。さらに、CD271 陽性症例は陰性症例に比し、癌細胞の Ki67 指数が有意に高値であった。また、CD271 発現胃癌は、有意に予後不良であった。胃癌組織間質における CD271 発現は T 因子、肉眼型 4 型、未分化型と相関しており、CD271 陽性症例は陰性症例に比較し有意に予後不良であった。この結果から、CD271 陽性 BM-SC は胃癌患者における有用な予後予測因子となることが示唆された。

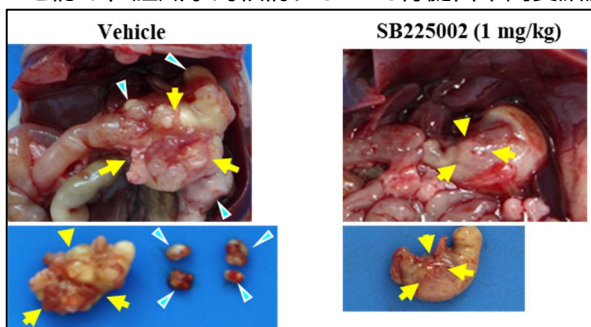


スキルス胃癌細胞株培養上清は骨髄由来間質細胞の遊走・浸潤能を亢進させたが、非スキルス胃癌細胞株培養上清は遊走・浸潤能に影響しなかった。さらに cytokine array, ELISA を用いた検討によって、C-X-C motif ligand 1 (CXCL1) がスキルス胃癌細胞株のみに高発現 (>1000ng/ml) しており、CXCL1 中和抗体、もしくは CXCL1 受容体である C-X-C motif receptor 2 (CXCR2) の CRISPR-Cas9 mediated knock down により骨髄由来間質細胞の遊走・浸潤能促進効果は減弱した。





マウスにおける CXCR2 阻害剤の検討結果、腫瘍の縮小、リンパ節転移の減少、生存率の向上を認め、組織学的検討によって骨髄由来間質細胞の減少を確認した。(特許申請中)



以上の結果より、胃癌の癌間質形成には骨髄由来細胞が関与し、特に骨髄由来間葉系幹細胞が関与し、それらは癌関連線維芽細胞 (CAF) の起源である可能性が示唆された。さらに、この CD271 陽性骨髄由来間質細胞は胃癌患者における有用な予後予測因子であることが明らかになった。このことから、骨髄由来細胞は、胃癌の中でも、特に間質反応が強く認められるスキルス胃癌の増殖進展に関与しており、スキルス胃癌の治療標的となる可能性が示唆された。

スキルス胃癌細胞由来 CXCL1 が骨髄間葉系細胞の CXCR2 を介して、骨髄間葉系細胞の走化性を亢進させることが明らかとなったことから CXCL1/CXCR2 シグナル阻害剤は骨髄細胞誘導を抑制し、新規のスキルス胃癌分子標的治療剤となることが示唆された。

本研究は、スキルス胃癌微小環境における癌間質細胞の起源解析や、癌細胞の産生する骨髄細胞誘導因子の同定および癌間質の供給源である骨髄細胞を治療標的とする点で、国内外から報告の認ない新規性の研究である。

骨髄細胞誘導因子阻害剤 (CXCL1/CXCR2 シグナル阻害剤) を用いて癌間質線維芽細胞の起源である骨髄細胞を阻害する治療法は、スキルス胃癌の増殖・浸潤能に関与する癌関連線維芽細胞を抑制することで、スキルス胃癌の有望な治療となると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Naito Yutaka, Yamamoto Yusuke, Sakamoto Naoya, Shimomura Iwao, Kogure Akiko, Kumazaki Minami, Yokoi Akira, Yashiro Masakazu, Kiyono Tohru, Yanagihara Kazuyoshi, Takahashi Ryou-u, Hirakawa Kosei, Yasui Wataru, Ochiya Takahiro	4. 巻 38
2. 論文標題 Cancer extracellular vesicles contribute to stromal heterogeneity by inducing chemokines in cancer-associated fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5566 ~ 5579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-019-0832-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sai Eirin, Miwa Yoshiyuki, Takeyama Reina, Kojima Shinya, Ueno Toshihide, Yashiro Masakazu, Seto Yasuyuki, Mano Hiroyuki	4. 巻 110
2. 論文標題 Identification of candidates for driver oncogenes in scirrhou s type gastric cancer cell lines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2643-2651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kasurinen Aaro, Gramolelli Silvia, Hagstrm Jaana, Laitinen Alli, Kokkola Arto, Miki Yuichiro, Lehti Kaisa, Yashiro Masakazu, Ojala P?ivi M., B?ckelman Camilla, Haglund Caj	4. 巻 8
2. 論文標題 High tissue MMP14 expression predicts worse survival in gastric cancer, particularly with a low PROX1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 6995 ~ 7005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kuroda Kenji, Yashiro Masakazu, Sera Tomohiro, Yamamoto Yurie, Kushitani Yukako, Sugimoto Atsushi, Kushiyama Syuhei, Nishimura Sadaaki, Togano Shingo, Okuno Tomohisa, Tamura Tatsuro, Toyokawa Takahiro, Tanaka Hiroaki, Muguruma Kazuya, Ohira Masaichi	4. 巻 14
2. 論文標題 The clinicopathological significance of Thrombospondin-4 expression in the tumor microenvironment of gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 224727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0224727	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 YAMAMOTO YURIE, KURODA KENJI, SERA TOMOHIRO, SUGIMOTO ATSUSHI, KUSHIYAMA SHUHEI, NISHIMURA SADAAKI, TOGANO SHINGO, OKUNO TOMOHISA, YOSHII MAMI, TAMURA TATSURO, TOYOKAWA TAKAHIRO, TANAKA HIROAKI, MUGURUMA KAZUYA, OHIRA MASAICHI, YASHIRO MASAKAZU	4. 巻 39
2. 論文標題 The Clinicopathological Significance of the CXCR2 Ligands, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, and CXCL8 in Gastric Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6645 ~ 6652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.13879	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 K Mori, M Hirase, T Morishige, E Takano, H Sunayama, Y Kitayama, S Inubushi, R Sasaki, M Yashiro, and T Takeuchi	4. 巻 58
2. 論文標題 231.A Pretreatment-Free, Polymer-Based Platform Prepared by Molecular Imprinting and Post-Imprinting Modifications for Sensing Intact Exosomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angew Chem Int Ed Engl.	6. 最初と最後の頁 1612-1615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201811142	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 M Umakoshi, S Takahashi, G Itoh, S Kuriyama1, Y Sasaki, K Yanagihara, M Yashiro, D Maeda, A Goto, M Tanaka	4. 巻 38
2. 論文標題 Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells contributes to establishment of a pro-tumor microenvironment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2162-2176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0564-x.	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 Kasashima H, Yashiro M, Okuno T, Masuda G, Kinoshita H, Morisaki T, Fukuoka T, Hasegawa T, Hirakawa K, Ohira M	4. 巻 98
2. 論文標題 Significance of the Lysyl Oxidase Members Lysyl Oxidase Like 1, 3, and 4 in Gastric Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 238-248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000489558	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 Miki Y, Yashiro M, Okuno T, K Kuroda, S Togano, Hirakawa K, Ohira M.	4. 巻 13
2. 論文標題 222.Clinico-pathological significance of exosome marker CD63 expression on cancer cells and stromal cells in gastric cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 1-9.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0202956	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5件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yashiro M.
2. 発表標題 Bone marrow-derived stromal cells in the tumor microenvironment might be associated with the progression of gastric cancer.
3. 学会等名 American Association for Cancer Research 109th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yashiro M.
2. 発表標題 CD9-positive exosomes from cancer-associate fibroblasts (CAFs) stimulate the migration ability of diffuse-type of gastric cancer cells.
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yashiro M.
2. 発表標題 Pyruvate Kinase Isozymes M2 and Glutaminase Might Be Promising Molecular Targets for the Treatment of Gastric Cancer
3. 学会等名 American Association for Cancer Research 108th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yashiro M.
2. 発表標題 6.Targeting tumor microenvironment in gastric cancer treatment.
3. 学会等名 KNGCA week 2018 (Seoul ,Korea) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yashiro M.
2. 発表標題 CD9-positive exosomes from cancer-associate fibroblasts (CAFs) stimulate the migration ability of diffuse-type of gastric cancer cells
3. 学会等名 11th JCA-AACR Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

www.med.osaka-cu.ac.jp/ocum-surgery/research 癌分子病態制御学 http://www.med.osaka-cu.ac.jp/surgical-oncology/cancer/research_expense.html#geriatric04

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	中前 博久 (Nakamae Hirohisa) (30364003)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------