

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08679

研究課題名(和文) 胃癌腹膜播種へ及ぼす腹腔内癌微小環境の影響と細胞外小胞体の関与

研究課題名(英文) Impact of intraperitoneal tumor microenvironment on peritoneal dissemination of gastric cancer via involvement of extracellular vesicles

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜播種を有する胃癌患者の腹腔では腫瘍進行を促進するマクロファージが存在している。本研究ではマクロファージが腫瘍促進型に分化する機序に関して、胃癌由来細胞外小胞(EV)の影響を検討した。胃癌患者の腹水、胃癌細胞の培養上清からEVが抽出された。それらの精製したEVは、末梢血単核細胞に作用させると、腫瘍促進型マクロファージへの分化を誘導した。そして胃癌由来のEVで分化させたマクロファージは胃癌細胞の遊走能を促進し、それらのEVはSTAT3蛋白を保有していた。これらの結果から胃癌由来EVはマクロファージ分化に影響を及ぼしうること、腫瘍を促進させる腹腔内環境を形成する因子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

治療法の進歩にもかかわらず、胃癌の腹膜播種は今なお極めて難治である。新たな治療戦略の開発のために新たな病態の解明が求められている。その病態の新たな側面を解明するため、本研究では腹腔内環境に着目して解析した。我々の研究では胃癌患者の腹腔内に存在している細胞外小胞体が、マクロファージに作用し、腫瘍を促進する腹腔内環境の形成に加担していることを示すことができ、胃癌腹膜播種の病態解明につながる新しい知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Macrophages promoting tumor progression are present in the peritoneal cavity of gastric cancer patients with peritoneal dissemination. In this study, we investigated the effect of gastric cancer-derived extracellular vesicles (EVs) on the mechanism by which macrophages differentiate into tumor-promoting forms. EV was extracted from ascites of the gastric cancer patient and culture supernatant of the gastric cancer cell. Their purified EVs induced differentiation into tumor-promoting macrophages when applied to peripheral blood mononuclear cells. Macrophages differentiated with gastric cancer-derived EVs promoted the migration of gastric cancer cells, and these EVs possessed STAT3 protein. These results suggest that gastric carcinoma-derived EVs can affect macrophage differentiation and are factors that form the peritoneal environment to promote tumors.

研究分野：消化器癌の新規治療開発

キーワード：胃癌 腹膜播種 細胞外小胞体 腫瘍微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌において腹膜播種はもっとも多い転移形式であるが、既存の治療には抵抗性であり、胃癌が難治である一つの原因である。新たな治療戦略が求められる中で、その病態のさらなる解明が求められている。

(2) 胃癌患者の腹腔内の環境を解析した結果では、担癌の腹腔内ではマクロファージが優勢で、しかも M2 型マクロファージの占める割合が高い。胃癌において腹腔内での微小環境がいかに腹膜播種形成に影響しているかは不明であった。

(3) EV はあらゆる細胞から分泌され、癌細胞から分泌される EV は癌微小環境に影響しうることが報告されていたが、胃癌由来の EV がいかに腹腔内の癌微小環境に影響を及ぼすかは不明であった。

2. 研究の目的

(1) 胃癌腹膜播種形成へ腹腔内 M2 型マクロファージが如何に関与しているか解明する。

(2) 腹腔内での胃癌細胞とマクロファージとの相互作用とその間に介在するものが何かを解明する。その中で EV が可能性に注目し、EV の関与について解析する。

3. 研究の方法

(1) 胃癌患者の腹水あるいは腹腔洗浄液の細胞成分を蛍光免疫染色、フローサイトメトリーによって解析する。

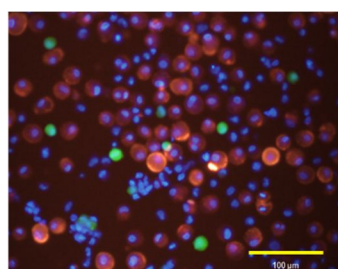
(2) 胃癌細胞の培養上清、あるいは胃癌患者の腹水、腹腔洗浄液から超遠心法で EV を抽出し、その蛋白質発現や粒子径、形状、更には EV に内包される蛋白質について解析する

(3) ヒト単球を末梢血から分離しマクロファージへの分化を誘導し、その過程で胃癌細胞由来の EV を作用させることでマクロファージの分化がいかに影響されるかを解析する。

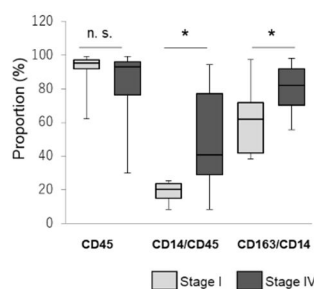
4. 研究成果

(1) 胃癌患者の腹腔内の解析。

胃癌患者の腹水あるいは腹腔洗浄液の細胞成分を蛍光免疫染色、フローサイトメトリーによって解析したところ、Stage 4 胃癌患者からの検体では、CD14+細胞中の 163+細胞の割合が有意に高く、M2 型マクロファージが腹腔内には優勢であることが確認された。

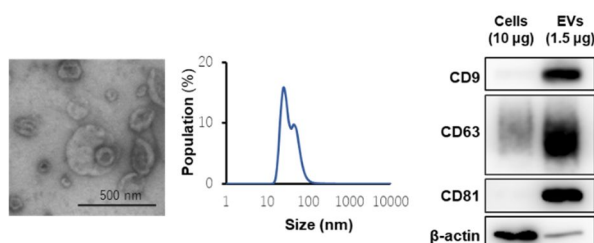


DNA (DAPI)/Cancer (GFP)
CD163+ macrophage



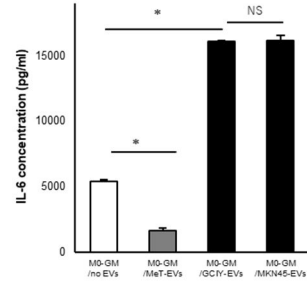
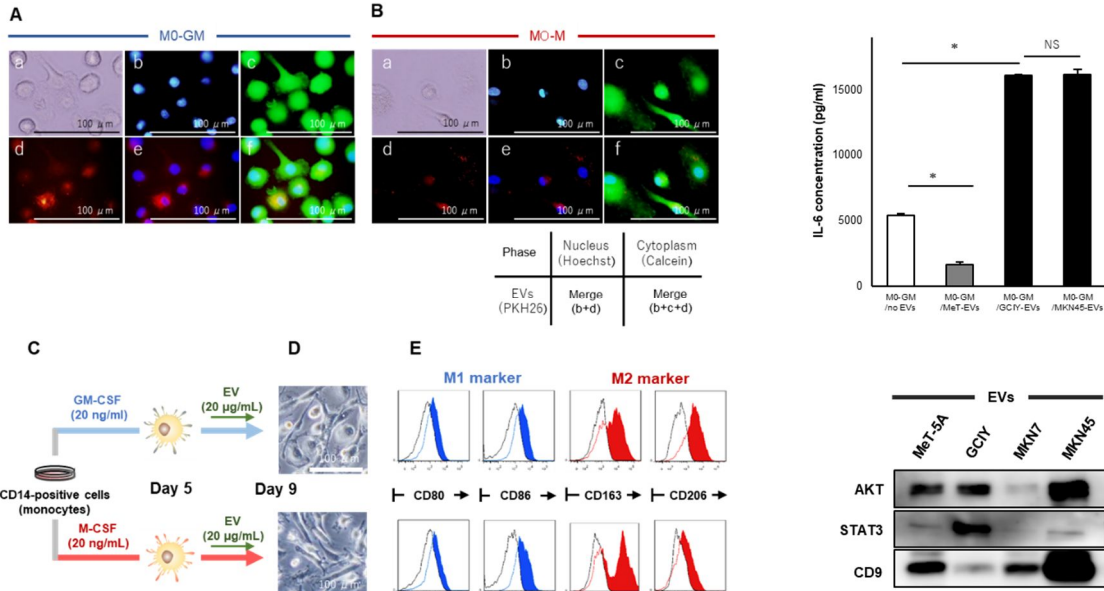
(2) 胃癌由来の EV の抽出とその確認。

胃癌細胞の培養上清並びに胃癌患者の腹水、腹腔洗浄液からは EV が抽出されることが電顕と粒子径、さらには Exosome マーカーである CD9, CD63, CD81 タンパク質発現から確認された。



(3) 胃癌由来の EV のマクロファージ分化への作用

胃癌細胞の培養上清から抽出された EV を胃癌細胞由来の EV として、末梢血由来の CD14+ 単球細胞の培養上清に加えたところ、48 時間以内に 50% 以上の単球が EV を細胞内に取り込んでいた。その結果単球の生存率が上昇し、M2 マクロファージのマーカである CD163 の発現が確認され、単球の分化に EV が影響していることが示唆された。さらに末梢血由来の CD14+ 単球を GM-CSF あるいは M-CSF で分化させた未成熟マクロファージに胃癌細胞由来の EV を作用させたところ、M2 マーカーである CD163、CD206 の発現が観察されたことから、胃癌細胞由来の EV はマクロファージの分化過程に作用しうること、さらに M2 型への分化を誘導することが示唆された。胃癌由来 EV によって分化誘導を受けたマクロファージは IL-6 をより分泌するようになることが確認され、マクロファージの胃癌悪性形質への影響が示唆された。また、胃癌由来の EV 内には STAT3 タンパク質が確認され、マクロファージ分化は STAT3 を介している可能性が示唆された。



(4) 結語

胃癌患者の腹腔内には胃癌由来の EV が存在し、マクロファージの分化に影響を及ぼしうることから、EV が胃癌患者の腹腔内癌微小環境の形成に関与していることが示唆された。

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 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kuwada K, Kuroda S, Kikuchi S, Yoshida R, Nishizaki M, Kagawa S, Fujiwara T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Clinical Impact of Sarcopenia on Gastric Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2241-2249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13340.	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 Kikuchi S, Kubota T, Kuroda S, Nishizaki M, Kagawa S, Kato H, Okada H, Fujiwara T.	4. 巻 52
2. 論文標題 Endoscopic Ultrasound-Guided Transgastric Drainage of an IntraAbdominal Abscess following Gastrectomy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical endoscopy	6. 最初と最後の頁 373-376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5946/ce.2018.134	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 Kikuchi S, Kuroda S, Nishizaki M, Matsusaki T, Kuwada K, Kimura Y, Kagawa S, Morimatsu H, Fujiwara T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Comparison of the Effects of Epidural Analgesia and Patient-controlled Intravenous Analgesia on Postoperative Pain Relief and Recovery After Laparoscopic Gastrectomy for Gastric Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgical laparoscopy, endoscopy & percutaneous techniques	6. 最初と最後の頁 405-408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SLE.0000000000000605	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 Sakamoto S, Kagawa S, Kuwada K, Ito A, Kajioka H, Kakiuchi Y, Watanabe M, Kagawa T, Yoshida R, Kikuchi S, Kuroda S, Tazawa H, Fujiwara T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Intraperitoneal cancer-immune microenvironment promotes peritoneal dissemination of gastric cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncoimmunology	6. 最初と最後の頁 e1671760
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/2162402X.2019.1671760.	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 Ieda Takeshi, Tazawa Hiroshi, Okabayashi Hiroki, Yano Shuya, Shigeyasu Kunitoshi, Kuroda Shinji, Ohara Toshiaki, Noma Kazuhiro, Kishimoto Hiroyuki, Nishizaki Masahiko, Kagawa Shunsuke, Shirakawa Yasuhiro, Saitou Takashi, Imamura Takeshi, Fujiwara Toshiyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Visualization of epithelial-mesenchymal transition in an inflammatory microenvironment? colorectal cancer network	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52816-z	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 Kuwada Kazuya, Kagawa Shunsuke, Yoshida Ryuichi, Sakamoto Shuichi, Ito Atene, Watanabe Megumi, Ieda Takeshi, Kuroda Shinji, Kikuchi Satoru, Tazawa Hiroshi, Fujiwara Toshiyoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 The epithelial-to-mesenchymal transition induced by tumor-associated macrophages confers chemoresistance in peritoneally disseminated pancreatic cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-018-0981-2	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 Watanabe Megumi, Kagawa Shunsuke, Kuwada Kazuya, Hashimoto Yuuri, Shigeyasu Kunitoshi, Ishida Michihiro, Sakamoto Shuichi, Ito Atene, Kikuchi Satoru, Kuroda Shinji, Kishimoto Hiroyuki, Tomida Shuta, Yoshida Ryuichi, Tazawa Hiroshi, Urata Yasuo, Fujiwara Toshiyoshi	4. 巻 109
2. 論文標題 Integrated fluorescent cytology with nano-biologics in peritoneally disseminated gastric cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3263 ~ 3271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13760	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 Ito Atene, Kagawa Shunsuke, Sakamoto Shuichi, Kuwada Kazuya, Kajioka Hiroki, Yoshimoto Masashi, Kikuchi Satoru, Kuroda Shinji, Yoshida Ryuichi, Tazawa Hiroshi, Fujiwara Toshiyoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Extracellular vesicles shed from gastric cancer mediate protumor macrophage differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-021-07816-6	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 Kajioka Hiroki, Kagawa Shunsuke, Ito Atene, Yoshimoto Masashi, Sakamoto Shuichi, Kikuchi Satoru, Kuroda Shinji, Yoshida Ryuichi, Umeda Yuzo, Noma Kazuhiro, Tazawa Hiroshi, Fujiwara Toshiyoshi	4. 巻 497
2. 論文標題 Targeting neutrophil extracellular traps with thrombomodulin prevents pancreatic cancer metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2020.10.015	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 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 H. Kajioka, S. Kagawa, A. Ito, K. Kuwada, S. Kikuchi, S. Kuroda, R. Yoshida, H. Tazawa, T. Fujiwara
2. 発表標題 The reciprocal interaction between neutrophil extracellular traps and cancer cells impact on their malignant potentials
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Kajioka, S. Kagawa, A. Ito, K. Kuwada, S. Kikuchi, S. Kuroda, R. Yoshida, H. Tazawa, T. Fujiwara
2. 発表標題 Neutrophil extracellular traps promote liver metastasis of gastrointestinal cancer through the induction of EMT.
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 Atene Ito, shunsuke kagawa, Shuichi Sakamoto, Kazuya Kuwada, Satoru Kikuchi, Shinji Kuroda, Ryuichi Yoshida, Hiroshi Tazawa and Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 Extracellular vesicles in the ascites from gastric cancer patients play critical roles to promote peritoneal dissemination in the intraperitoneal cancer microenvironment
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunsuke Kagawa, Shuichi Sakamoto, Kazuya Kuwada, Atene Ito, Hiroki Kajioka, Shinji Kuroda, Satoru Kikuchi, Ryuichi Yoshida, Hiroshi Tazawa, Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 IL6 derived from intraperitoneal macrophages is involved in peritoneal dissemination of gastric cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atene Ito, Shunsuke Kagawa, Hiroki Kajioka, Shuichi Sakamoto, Kazuya Kuwada, Satoru Kikuchi, Shinji Kuroda, Masahiko Nishizaki, Ryuichi Yoshida, Hiroshi Tazawa, Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 Extracellular vesicles from gastric cancer promote peritoneal dissemination via M2 differentiation of macrophages.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔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	吉田 龍一 (Yoshida Ryuichi) (80534768)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	

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
---------	---------