

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08691

研究課題名(和文) スキルス胃癌の浸潤・転移における平滑筋細胞の役割の解明と新規治療戦略への応用

研究課題名(英文) Role of smooth muscle cells in invasion and metastasis of scirrhous gastric cancer

研究代表者

齋藤 心 (Saito, Shin)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60382909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：スキルス胃癌の間質中には多数の平滑筋細胞(SMC)が存在するが、がんの進展におけるSMCの役割は十分に解明されていない。本研究では、(1) In vitroで培養したSMCが、胃癌細胞の増殖を弱く促進すること、(2) PD-L1などの免疫抑制分子を発現し、抗原刺激によるT細胞の増殖、活性化を強く抑制すること、(3) 腹腔内化学療法を施行後に切除した胃癌組織において残存腫瘍の周辺に多量のSMCが存在していることを見出し、SMCが胃癌の進展に促進的な作用を有し、化学療法に対する抵抗性にも関与している可能性が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

微小環境内に存在する平滑筋細胞の生物学的役割やがんの病態や癌に対する全身免疫に及ぼすに及ぼす影響に関する新しい知見が得られた。これらの知見は予後不良のスキルスがん、特に腹膜転移を有する患者に対する新たな治療法の開発に繋がると思われる。

研究成果の概要(英文)：There are many smooth muscle cells (SMC) in the stroma of scirrhous gastric cancer (GC). However, their roles in cancer progression remain unclear. Here, in this study, we found following points. (1) In vitro cultured SMC weakly enhance the proliferation of gastric cancer cells. (2) The SMC express immune checkpoint molecules such as PD-L1 and strongly suppress T cell proliferation stimulated by anti-CD3 mAb. (3) In GC tissues of the patients who received conversion gastrectomy after intraperitoneal chemotherapy, many SMC remain around the remnant tumor nest. From these findings, it is supposed that SMC may promote the progression and contribute the chemoresistance of advanced GC, especially in case with peritoneal metastasis.

研究分野：消化器外科

キーワード：スキルス胃癌 平滑筋細胞 浸潤 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

スキルス胃癌は高頻度に腹膜播種をきたし、その予後は極めて悪い。近年、HER-2 に対する分子標的薬が胃癌にも適応され、良好な成果も報告されているが、スキルス胃癌では HER2 陽性頻度は低く、新たな治療戦略の開発が望まれている。癌は遺伝子異常を原因とする疾患であるが、癌細胞の浸潤、転移には癌細胞を取り巻く微小環境が重要な役割を果たしていることが示唆されている。実際、スキルス胃癌は間質成分が極めて豊富で、腫瘍組織には線維芽細胞をはじめ様々な間質細胞と細胞外基質が介在する。この点に着目し、癌細胞とがん関連線維芽細胞 (Cancer associated Fibroblast;以下 CAF) の相互作用に関する数多くの基礎研究がなされた結果、CAF がスキルス癌の進展に極めて重要な役割を果たしていることが判明し、CAF を標的とした新しい分子標的治療法が世界中で模索されてきた。現在までに、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor: HGF) や線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor: FGF)、その受容体、シグナル伝達分子などを標的とした新たな分子標的薬が開発され、臨床応用が試みられてきた。しかし、その臨床成績を見る限り、期待されたほどの成果は得られておらず、未だに有用性のある治療法の確立には至っていない。一方、腹膜播種を有する進行胃癌に対するタキサン腹腔内投与の有用性が指摘されてきている。申請者らの施設においても、S1+Oxaliplatin (SOX 療法) にパクリタキセル (PTX) の腹腔内投与を併用した複合化学療法を施行し、良好な成績を得ている。

がんの間質中に存在するもう一つの間質細胞は平滑筋細胞 (SMC) である。SMC は消化管の壁内の粘膜筋層、固有筋層に豊富に存在し、アクチン-ミオシン系の運動関連分子が強く発達し、極めて強い運動能力を有していること、非常に活発なエネルギー代謝を行っていることなど、転移現象と極めて密接に関係する細胞機能を有している細胞である。また、粘膜面に発生した癌細胞は胃壁を浸潤する過程で、二層の平滑筋層 (特に固有筋層は極めて厚い) を必ず通過することになる。しかし、癌細胞と平滑筋細胞の相互作用についてはあまり検討されておらず、それが、スキルス癌の進展や抗癌剤感受性とどう関わっているかについての情報は乏しい。

2. 研究の目的

消化管悪性腫瘍患者の手術検体から消化管の壁内に存在する平滑筋細胞 (SMC) を様々な様式で胃癌細胞と混合培養し、SMC が胃癌細胞の増殖、浸潤、転移にどのような影響を与えているか? を *in vitro* の細胞実験で明らかにする。また、腹膜播種を有するスキルス胃癌患者で PTX の腹腔内投与を受けた患者において、化学療法の奏効と平滑筋細胞の量的変化について形態学的に検討し、薬剤感受性における平滑筋細胞の意義を模索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 平滑筋細胞と癌細胞の相互作用

事前に同意を得た食道癌、胃癌患者の切除検体の正常部位から固有筋層のみを切除、細切、コラゲナーゼ処理を行った後、20%FCS+DMEM 培地で3~4週間培養を試みたが、増殖は不良で、実験に足る量の SMC は得られなかった。そこで、SIEN CELL 社からヒト小腸由来の平滑筋細胞の初代培養株を購入し、3継代したものを SMC として実験に用いた。抗原発現はモノクローナル抗体を用いて染色し、Flow cytometry で測定した。この SMC 5000 個を 96 穴プレートに播種し、TGF- β (10ng/ml), TNF- α (10ng/ml), and IFN- γ (10ng/ml) の共存下で 48 時間培養し、増殖を MTT assay で、抗原発現の変化を Flow cytometry で測定した。

(2) 平滑筋細胞とリンパ球の相互作用

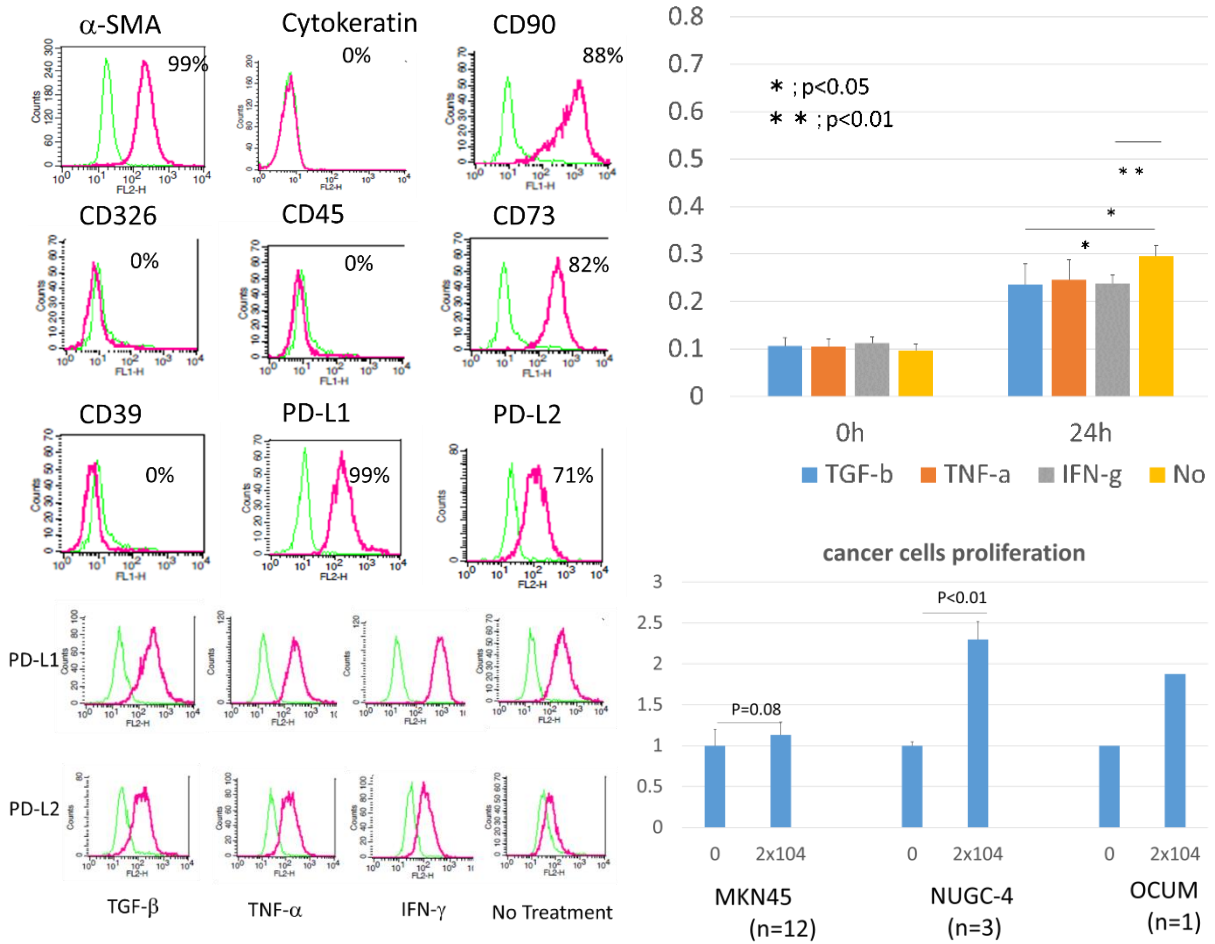
健常マウスの脾細胞を採取、CFSE で染色した後、 2×10^6 個を CD3 抗体と CD28 抗体の存在下で培養し 3 日後に、分裂能を Flow cytometry による CFSE の希釈度で測定した。この実験系に SIEN CELL 社から購入したマウス平滑筋細胞 (SMC) を共存させ、抗原刺激に対する T 細胞の増殖に及ぼす SMC の影響を検討した。

(3) 胃癌腹膜播種にて腹腔内化学療法を施行し、奏効後に胃切除を施行した患者の原発巣における平滑筋細胞の形態、分布を組織学的に検討した。

4. 研究成果

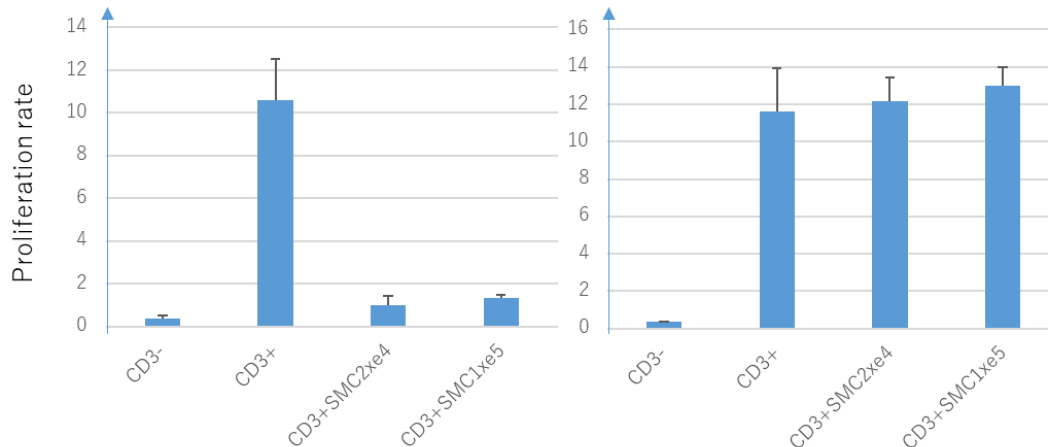
(1) 平滑筋細胞と癌細胞の相互作用

ヒト小腸由来 SMC は上皮マーカーの cytokeratin, EpCAM(CD326) および白血球マーカーの CD45 は表出していなかったが、間葉系細胞のマーカーである α -SMA, CD90 をほぼ 100% 発現していた。また、免疫チェックポイント分子の PD-L1, PD-L2 や adenosin 産生の律速酵素である CD73 も強く発現していた。また、この SMC を TGF- β , TNF- α , IFN- γ の存在下で 24 時間培養すると、形態変化をきたし、増殖能はわずかに増加した。また、PD-L1, L2 の発現は有意に増強した。次に、この SMC をヒト胃癌細胞株、MKN45, NUGC-4, OCUM-1 と共培養すると、NUGC-4, OCUM-1 の増殖は有意に増加したが、MKN-45 の増殖には変化が見られなかった。(下図)



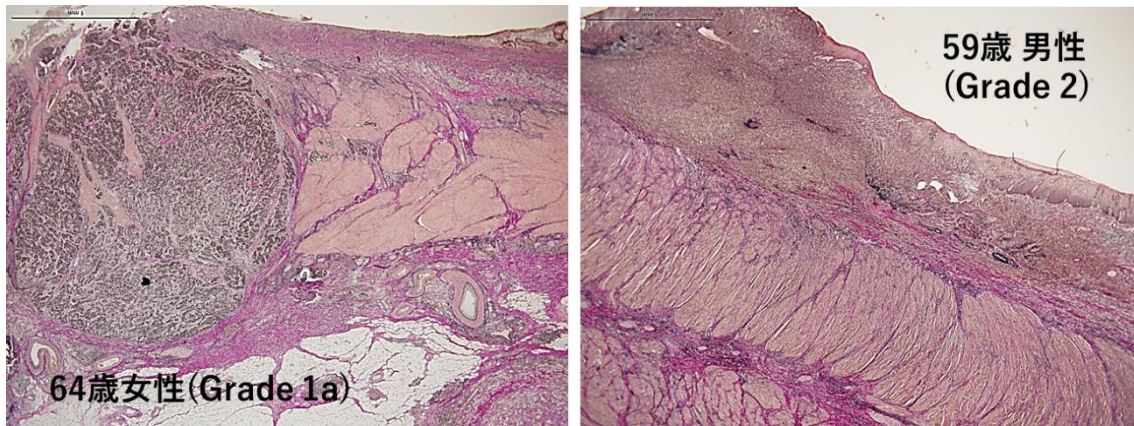
(2) マウス平滑筋細胞と癌細胞の相互作用

抗 CD3+抗 CD28 抗体の刺激により、マウス T 細胞は活発に増殖したが、 2×10^4 個、 1×10^5 個の SMC の共存下では、この増殖は 15~20%程度にまで抑制された。しかし、同数の SMC を double chamber にて非接触下で共存させると、この抑制は全く認められなかった。(下図)



(3) ヒト検体での検討

2020年6月までに58名の腹膜播種患者にSOX+PTX腹腔内投与を施行した。審査腹腔鏡によりP1あるいはCY1が確認された初発胃癌症例において、腹腔ポートを皮下に留置し、S-1 80 mg/m² (Day1-14)+オキサリプラチン経静脈投与(100 mg/m², Day1)・パクリタキセル腹腔内投与(40mg/m², 最大60 mg Day1, 8), 7日間休薬を1コースとした化学療法を行った(UMIN000025501)。その結果、観察期間中央値34か月で全生存期間中央値(MST)は26.1ヵ月、2年全生存率(OS)52%という良好な成績を得た。また、経過中に、1) 腹水細胞診陰性化, 2) 画像診断上明らかな非治癒因子なし, 3) 審査腹腔鏡による腹膜播種の消失あるいは縮小とし、これを満たす25例に対しconversion surgeryとして胃切除術を施行し、そのMSTは40.5か月、1年、2年のOSはそれぞれ100%, 77%で非常に良好であった。これらの切除検体の病理切片を用いて、EVG染色を行い、原発腫瘍の残存部の近傍に一致してSMCが豊富に存在していることが確認された。(下図)



(4)まとめ

平滑筋細胞は癌細胞の増殖を促進する作用を有していたが、その効果は顕著ではなかった。一方、SMCはPD-L1, CD73などの免疫抑制分子を発現し、直接接触を介してTリンパ球の増殖を抑制することで、胃癌の進展を促進し、抗癌剤感受性を減弱させている可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 S. Saito, H. Yamaguchi, H. Ohzawa, H. Miyato, R. Kanamaru, K. Kurashina, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama.	4. 巻 online
2. 論文標題 Intraperitoneal Administration of Paclitaxel Combined with S-1 Plus Oxaliplatin as Induction Therapy for Patients with Advanced Gastric Cancer with Peritoneal Metastases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-09388-4	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 Saito Shin, Yan Chao, Fukuda Hisashi, Hosoya Yoshinori, Matsumoto Shiro, Matsubara Daisuke, Kitayama Joji, Lefor Alan Kawarai, Sata Naohiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Synchronous gastric leiomyoma and intramuscular abdominal wall granular cell tumor with similar imaging features: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Surgery Case Reports	6. 最初と最後の頁 207 ~ 211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijscr.2018.03.001	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 Kitayama Joji, Saito Shin, Yamaguchi Hironori, Lefor Alan Kawarai, Ishigami Hironori, Sata Naohiro	4. 巻 6
2. 論文標題 ASO Author Reflections: Repeated Intraperitoneal Paclitaxel with Systemic Chemotherapy as the First-Line Treatment for Peritoneal Malignancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-09417-2	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 齋藤 心, 山口 博紀, 倉科 憲太郎, 春田 英律, 川平 洋, 佐久間 康成, 堀江 久永, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 IP-PTX+SOX療法に奏功を認めた腹膜播種陽性胃癌症例に対するconversion surgeryの適応と成績
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤 心, 山口 博紀, 細谷 好則, 金丸 理人, 春田 英律, 倉科 憲太郎, 堀江 久永, 佐久間 康成, 佐田 尚宏, 北山 丈二.
2. 発表標題 腹膜播種陽性胃癌に対するSOX+PTX腹腔内投与併用療法.
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 心, 細谷 好則, 松原 大祐, 春田 英律, 倉科 憲太郎, 松本 志郎, 北山 丈二, 山口 博紀, 佐久間 康成, 堀江 久永, 佐田 尚宏.
2. 発表標題 胃管癌8例の臨床病理学的検討.
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin Saito., Hironori Yamaguchi., Shiro Matsumoto., Rihito Kanamaru., Kentaro Kurashina., Hidenori Haruta., Yoshinori Hosoya., Sadatomo. Ai, Hirofumi Fujii., Hideyuki Ohzawa., Alan K Lefor., Naohiro Sata., Joji Kitayama.
2. 発表標題 Intraperitoneal Paclitaxel Treatment Combined with S-1+Oxaliplatin(SOX) for Gastric Cancer with Peritoneal Metastasis.
3. 学会等名 14th International Symposium on Regional Cancer Therapies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mineyuki Tojo, Shin Saito, Yuko Kumagai, Rihito Kanamaru, Hidenori Tsukui, Hideyuki Oozawa, Joji Kitayama.
2. 発表標題 Smooth muscle cells and gastric cancer cells in tumor microenvironment
3. 学会等名 第18回 自治医大シンポジウム
4. 発表年 2019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	北山 丈二 (Kitayama Joji) (20251308)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	春田 英律 (Haruta Hidenori) (20406143)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	
研究分担者	倉科 憲太郎 (Kurashina Kentaro) (70382900)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	
研究分担者	宮戸 秀世 (Miyato Hideyo) (90813163)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	

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