

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08985

研究課題名(和文) 腫瘍間質細胞によって促進される胃癌腹膜播種進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanism underlying peritoneal metastasis progression by tumor stromal cells.

研究代表者

安田 忠仁 (Yasuda, Tadahito)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：00867947

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)：癌組織を構成する細胞群の一つであるCancer associated fibroblasts (CAFs)が全身性の炎症によって細胞老化を起こし、癌の進展を促進する老化関連タンパク質(SASP)を長期間分泌する新たなメカニズムを明らかにした。さらに、がん性腹水を用いた細胞分画の解析を行うことで、腹水中で細胞老化を起こしたCAFsが存在し、胃癌腹膜播種の進展を促進していることが分かった。本研究からスキルス胃癌による腹膜播種患者に対して、播種巣のがん細胞だけでなく、腫瘍間質 に対する新たな治療法の開発の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
スキルス胃癌は転移を起こしやすく、その多くは腹膜播種を引き起こすことで知られ、極めて予後が悪いとされている。また最近の研究からスキルス胃癌などの線維化の強い癌腫ではCancer associated fibroblasts (CAFs)が腫瘍間質で癌を促進する際に重要な働きをしていることが報告されている。本研究からスキルス胃癌による腹膜播種患者に対して、腹膜播種転移巣の腫瘍間質によって活性化するシグナルをターゲットとした分子標的の創出につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Our study has uncovered a novel mechanism underlying cancer progression, which involves cancer-associated fibroblasts (CAFs) found in cancerous tissue. Our findings demonstrate that systemic inflammation can induce cellular senescence in CAFs, leading to the secretion of senescence-associated proteins (SASPs) that promote cancer progression over an extended period of time. Moreover, we have identified the presence of senescent-CAFs in the cellular fractions of malignant ascites, where they play a critical role in promoting the peritoneal dissemination of gastric cancer. These results suggest the possibility of developing new treatments for patients with peritoneal dissemination, targeting not only cancer cells at the site of dissemination but also the tumor stroma.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：腫瘍微小環境 胃癌 CAFs EZH2 腹膜播種 細胞老化 JAK-STAT阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

Cancer-associated Fibroblasts (CAFs)は様々な因子を分泌することで腫瘍の進展に関わることが知られている。これまでに炎症性サイトカインなどの CAFs 由来の分泌因子が癌の進展に寄与するという報告は存在するが、その詳細なメカニズムは解明されていない。申請者は、現在までに 150 症例以上の胃癌切除検体から継続的に CAFs を樹立しており、CAFs の特性と癌進展における役割を明らかにするとともに、胃癌細胞との相互作用についても研究を行い、成果を報告してきた (Ishimoto et al. *Gastroenterology*. 2017)。

## 2. 研究の目的

本研究は進行胃癌の腹膜播種形成における老化 CAFs の存在意義に焦点を当てており、癌細胞のみをターゲットとした従来の研究では見出せない新しい知見を得る可能性を有している。研究成果は腹膜播種転移巣の CAFs によって活性化されるシグナルをターゲットとした分子標的の創出を目的としている。

## 3. 研究の方法

- (1) **In vitro** による検討：炎症性サイトカインで刺激した CAFs の phenotype を評価し、RNA シーケンシングを用いた網羅的解析を行った。
- (2) **エピゲノム変化の検討**：EZH2 を強制発現する CAFs を作成し、炎症性サイトカイン刺激によるエピゲノムの変化と SASP 因子の発現変化を検証した。
- (3) **臨床サンプルを用いた検討**：臨床検体における候補分子および下流シグナルの発現を確認した。さらに進行胃癌患者の癌性腹水サンプルを用いて、シングルセル解析を行い、腹水中の老化 CAFs の存在とその際の SASP 現象を評価した。
- (4) **腹膜播種モデルマウスを用いた検討**：*In vitro* で得られた結果について胃癌細胞株を用いて腹膜播種モデルマウスを作製し腹腔内腫瘍を評価した。さらにその際に活性化される JAK-STAT シグナルをターゲットとして STAT3 inhibitor (WP1066)を用い、治療効果を検証した。

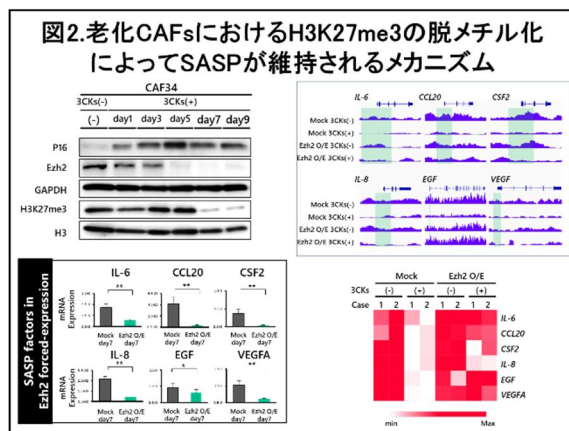
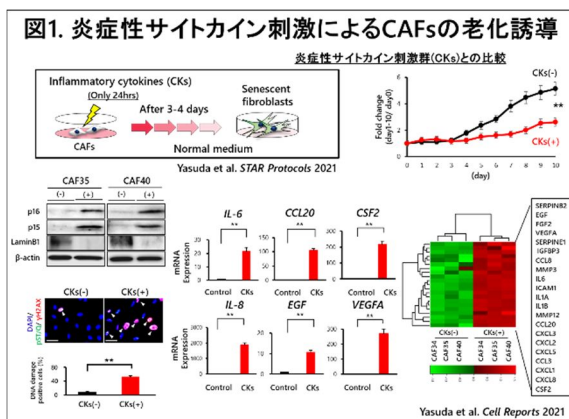
## 4. 研究成果

### (1) In vitro による検討

申請者らの研究室においては切除された胃癌組織から CAFs を樹立している (Yasuda et al. *STAR Protoc.* 2021)。炎症性サイトカイン刺激により CAFs に老化が誘導され、老化関連遺伝子が enrich していることが分かった。さらに RNA シーケンシングを用いた網羅的解析から、老化を起こした CAFs (Senescent-CAFs) が一定期間、SASP の phenotype を維持していることが明らかとなった (図 1)

### (2) エピゲノム変化の検討

Senescent CAFs が SASP を維持するメカニズムとして、CAFs のエピゲノム変化に着目した。炎症刺激によりポリコームタンパク群でメチル化活性を担う EZH2 の発現低下に続き、H3K27me3 の脱メチル化が起こることを同定した。続いて ChIP シーケンシング解析を行うことで、SASP のプロモーター領域で H3K27me3 の脱メチル化が起こることが分かった。さらに炎症性サイトカイン刺激を行っても EZH2 を強制発現する CAFs では SASP が維持されないことを示した。(図 2)。

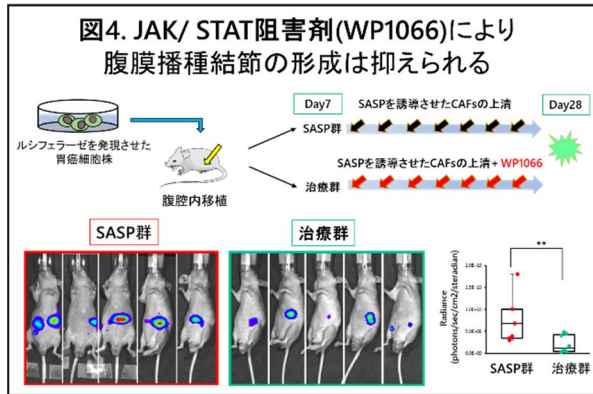
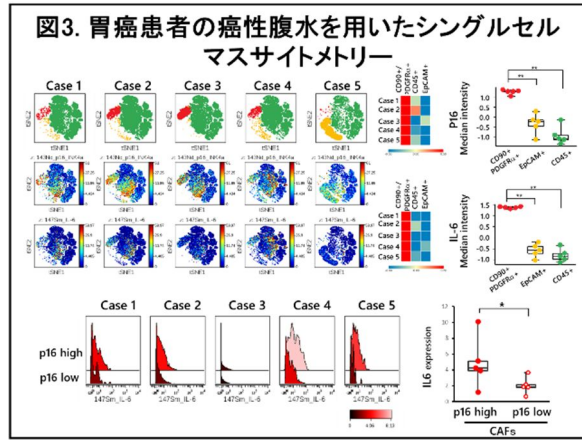


### (3) 臨床サンプルを用いた検討

腹膜播種を起こした患者において全身性炎症が起こっていることに着目した。腹膜播種患者の癌性腹水中の細胞をシングルプロテオミクスにかけ、各細胞分画における活性化シグナルの検討を行うことで、癌性腹水中に老化を呈した CAFs (Senescent CAFs) が存在し、SASP factors の分泌を維持していることを明らかにした (図 3)。

### (4) 腹膜播種モデルマウスを用いた検討

腹膜播種に対する治療戦略として、CAF から SASP factors により癌細胞のシグナルの検討を行うことで、癌性腹水中に老化を呈した CAFs (Senescent CAFs) が存在し、SASP factors の分泌を維持していることを明らかにした。STAT3 リン酸化がおこることから、難治性膠芽腫に対して臨床試験が進行している STAT3 inhibitor (WP1066) を使用し、*in vivo* において、播種巣の増大抑制に成功した (図 4)



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Yasuda Tadahito, Baba Hideo, Ishimoto Takatsugu	4. 巻 290
2. 論文標題 Cellular senescence in the tumor microenvironment and context specific cancer treatment strategies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1290 ~ 1302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16231	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 安田 忠仁、石本 崇胤	4. 巻 32
2. 論文標題 マサイトメトリーを用いた癌性腹水中老化細胞の検出と細胞老化に着目した治療戦略	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 サイトメトリーリサーチ	6. 最初と最後の頁 27 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18947/cytometryresearch.32.1_27	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 Yasuda Tadahito, Koiwa Mayu, Yonemura Atsuko, Akiyama Takahiko, Baba Hideo, Ishimoto Takatsugu	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol to establish cancer-associated fibroblasts from surgically resected tissues and generate senescent fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100553 ~ 100553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100553	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 Yasuda T, Koiwa M, Yonemura A, Miyake K, Kariya R, Kubota S, Yokomizo-Nakano T, Yasuda-Yoshihara N, Uchihara T, Itoyama R, Bu L, Fu L, Arima K, Izumi D, Iwagami S, Eto K, Iwatsuki M, Baba Y, Yoshida N, Ohguchi H, Okada S, Matsusaki K, Sashida G, Takahashi A, Tan P, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 34
2. 論文標題 Inflammation-driven senescence-associated secretory phenotype in cancer-associated fibroblasts enhances peritoneal dissemination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108779 ~ 108779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108779	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 Bu Luke、Baba Hideo、Yasuda Tadahito、Uchihara Tomoyuki、Ishimoto Takatsugu	4. 巻 111
2. 論文標題 Functional diversity of cancer associated fibroblasts in modulating drug resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3468 ~ 3477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14578	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 Uchihara T, Miyake K, Yonemura A, Komohara Y, Itoyama R, Koiwa M, Yasuda T, Arima K, Harada K, Eto K, Hayashi H, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Y, Yoshida N, Yashiro M, Masuda M, Ajani JA, Tan P, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 80
2. 論文標題 Extracellular Vesicles from Cancer-Associated Fibroblasts Containing Annexin A6 Induces FAK-YAP Activation by Stabilizing $\alpha$ 1 Integrin, Enhancing Drug Resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3222 ~ 3235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-3803	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9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 安田 忠仁
2. 発表標題 腹膜播種形成を促進するがん性腹水中老化細胞の意義
3. 学会等名 第81回日本癌学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田 忠仁、小岩麻由、馬場秀夫、石本崇胤
2. 発表標題 がん性腹水中senescent-CAFsによる腹膜播種促進メカニズムの解明
3. 学会等名 第29回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田 忠仁、小岩麻由、馬場秀夫、石本崇胤
2. 発表標題 癌性腹水中Senescent-CAFsによる腹膜播種促進メカニズムの解明
3. 学会等名 第93回日本胃癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田 忠仁、小岩麻由、米村敦子、ブルコ、馬場秀夫、石本崇胤
2. 発表標題 全身性炎症を背景とする病態を制御し、難治癌の克服を目指すトランスレーショナル研究
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田 忠仁、小岩麻由、馬場秀夫、石本崇胤
2. 発表標題 癌性腹水中SASP-CAFsによる腹膜播種促進メカニズムの解明
3. 学会等名 第29回JDDW
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田 忠仁、小岩麻由、馬場秀夫、石本崇胤
2. 発表標題 腫瘍間質細胞によって促進される胃癌腹膜播種進展メカニズムの解明
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tadahito Yasuda, Mayu Koiwa, Hideo Baba, Takatsugu Ishimoto
2. 発表標題 Senescent-CAFs in malignant ascites enhance peritoneal tumor formation
3. 学会等名 IGCC2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田 忠仁、石本崇胤、小岩麻由、米村敦子、三宅慧輔、内原智幸、江藤弘二郎、岩上志朗、馬場祥史、岩槻政晃、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 胃癌由来CAFsの老化と腹膜播種進展機序の解明
3. 学会等名 第120回日本外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tadahito Yasuda, Mayu Koiwa, Atsuko Yonemura, Keisuke Miyake, Luke Bu, Hideo Baba, and Takatsugu Ishimoto
2. 発表標題 Gastric cancer CAFs maintain SASP through epigenetic histone modification and enhance peritoneal dissemination
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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	石本 崇胤  (Ishimoto Takatsugu)  (00594889)	熊本大学・病院・特任准教授    (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	三宅 慧輔  (Miyake Keisuke)  (10814759)	熊本大学・病院・リサーチ・スペシャリスト    (17401)	

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			
シンガポール	Duke-NUS Medical School			