

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09076

研究課題名(和文) 胃癌腹膜播種進行のメカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of peritoneal dissemination of gastric cancer

研究代表者

久森 重夫 (Hisamori, Shigeo)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50534351

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)：当科にて胃癌腹膜播種陽性(P1 and/or CY1)と診断された73例を対象とし、P01aCYany群とP1bcCYany群の予後を比較した結果、2年全生存率(OS)はP01aCYany群：63.6%、P1bcCYany群：38.9%、5年OSはP01aCYany群：39.0%、P1bcCYany群：9.9%であり、P1aCYany群で有意に予後が良好な結果となった。胃癌腹膜播種陽性患者2名から腹水及び腹膜結節を採取したが、細胞数が非常に少量で、cDNA作成には至らなかった。ヒト胃癌セルラインNCI-N87およびKATO-IIIを用いて、マウス腹膜播種モデルを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌腹膜播種の予後は極めて不良である。特に播種が進行し胃癌が腹腔内に遊離した状態(CY1)から腹膜転移(P1)をきたした後は、結節増大による出血や腸閉塞、転移結節壊死による疼痛や発熱、更に腹水貯留・栄養状態悪化など多様な病状を示し、緩和的にも対応困難な経過をたどることが多い。今回臨床データをupdateすることにより、改めて腹膜転移が広がった場合予後が悪くなることを示すことができた。マウスを用いて胃癌腹膜播種の形成過程を分子生物学的に検証中であるが、治療介入可能なメカニズムを同定できれば、胃癌の腹膜播種進行を食い止める一助となると考えている。さらに研究を続けていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The results of a prognostic comparison between the P01aCYany group and the P1bcCYany group in 73 patients diagnosed as gastric cancer with peritoneal dissemination (P1 and/or CY1) at our department showed that the 2-year overall survival (OS) rate was 63.6% in the P01aCYany group and 38.9% in the P1bcCYany group, and 5-year OS was 39.0% in the P01aCYany group and 9.9% in the P1bcCYany group, with the P1aCYany group having a significantly better prognosis. Ascites and peritoneal nodules were collected from two patients with positive peritoneal dissemination of gastric cancer, but the cell count was very small and cDNA generation was not possible. The human gastric cancer cell lines NCI-N87 and KATO-III were used to create a mouse peritoneal dissemination model.

研究分野：消化管外科

キーワード：胃癌 腹膜播種

1. 研究開始当初の背景

胃癌腹膜播種は、胃癌の非治癒因子として最も多い病態である。腹膜播種は原発胃癌細胞が漿膜外に露出し腹腔内に遊離した状態(CY1)から、進行して腹膜転移を形成した状態(P1)へ移行し、腸閉塞や貧血、低栄養などの臨床症状を示すようになる。P1 症例の全生存期間(OS)の中央値は、集学的治療を行っても約 13 か月と報告されており、依然予後不良である。

胃癌腹膜播種に関する基礎研究では、正常胃組織と腹膜播種陽性胃癌原発組織の遺伝子発現を比較した研究や、腹膜転移を形成する胃癌セルラインの遺伝子発現を調べた研究はみられるが、実際に腹腔内遊離胃癌細胞(CY 細胞)と腹膜転移胃癌細胞(P 細胞)を採取し、胃癌腹膜播種の進展に焦点を当てて遺伝子の発現状況や表現型を比較したとする研究は存在しない。

申請者はこれまでに、他癌腫において、特定の microRNA(miR)が癌幹細胞の性質を制御することを明らかにした。具体的には、乳癌幹細胞の治療抵抗性に miR-142 による APC 遺伝子の発現抑制が影響していることを示し、また正常大腸幹細胞と大腸癌幹細胞において発現パターンが逆になる遺伝子の組み合わせとして miR-137 - DCLK1 の関係性を見出した。各結果から、現在臨床組織での標的蛋白質発現状況と予後についての検討を行っている。これらの経緯から、極めて難治性と考えられている胃癌組織においても、その臨床的進展過程で miR が関与している可能性を考えた。

胃癌腹膜播種が進行する際、CY 細胞から P 細胞へ進展する分子生物学的メカニズムは依然不明である。患者の予後を大きく左右するにも関わらず、未だ殺細胞性抗癌剤を全身または腹腔内に投与するしかない臨床現場において、他に胃癌腹膜播種の進展をくい止める方法がなく、臨床に直結する重要な問題点として挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、腹膜播種陽性胃癌患者の予後を改善させるため、胃癌腹膜転移が形成される分子生物学的機序を解明し、これを阻害する新たな治療戦略を提示することを目的とする。従来の CY1/P1 をひとくりにして腹膜播種陽性胃癌群とし、陰性胃癌群と比較した研究ではなく、腹膜転移形成(P)をきたすことで予後が増悪する点に着目し、「腹膜播種進展の時間を止める因子を探究」とする点が、本研究の独自性である。

3. 研究の方法

まずあらためて臨床背景を確認するため、京都大学医学部附属病院消化管外科にてこれまでに経験した臨床症例から、P0CY1 群(腹腔内遊離胃癌細胞を認めるが、まだ腹膜転移を形成していない症例)と P1CYany 群を比較し、予後解析を行う。

続いて、ヒト臨床検体を用いて、胃癌細胞が腹腔内に遊離した状態から腹膜転移を形成する“胃癌腹膜播種進行の分子生物学的機序”を解明する。

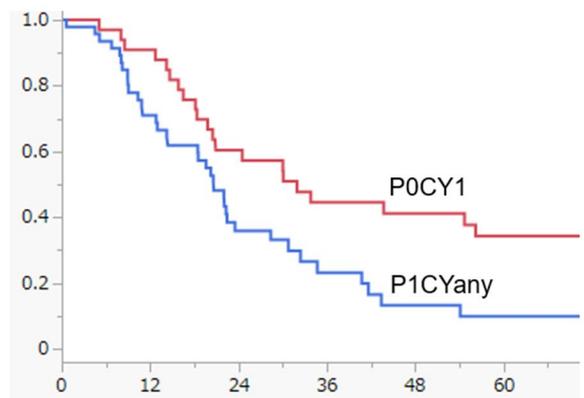
具体的に以下の 3 段階で研究を構成する。

- (1) 同一患者における胃癌腹腔内遊離細胞(CY 細胞)および胃癌腹膜転移細胞(P 細胞)を採取し RNA を抽出して、胃癌腹膜播種症例の CY 細胞/P 細胞の cDNA ライブラリーを作成する。
- (2) CY 細胞群、P 細胞群の 2 群間で microRNA(miR)発現の網羅的比較解析を行う。そのうち P 細胞群で発現が低下する miR(X)に着目し、その標的遺伝子(Y)を同定する。
- (3) miR(X)強制発現胃癌細胞株を作成し、腹膜転移が抑制されることを、すでに構築しているヌードマウス腹腔内投与モデルで検証する。

本研究結果から、胃癌腹膜播種の進行を阻害する新たな治療戦略を提示する。

4. 研究成果

1. 2003年5月～2023年4月までの20年間に、当科で経験した80例の胃癌腹膜播種症例から、P0CY1群とP1CYany群を比較し、予後解析を行った結果、全生存率(OS)はP0CY1群で31.9か月、P1CYany群で20.6か月であり、OSはP0CY1群で有意に長かった(p=0.01)。2群間を比較したKaplan-Meier曲線を右に示す。



本結果から、胃癌腹膜播種が結節を形成した場合、予後が悪くなることが改めて示された。

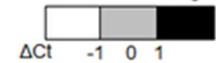
追加になるが、結果的には外科的に胃切除を行った症例の方が、胃切除を施行しなかった群よりも有意にOSが長く、さらにR0切除を達成した群では、R1/2切除(肉眼的または顕微鏡的断端陽性)切除群と比較して、有意にOSが長いという結果となった。

2. 実際の臨床にて患者から採取したCY細胞およびP細胞から、それぞれcDNAを作成し、CY細胞/P細胞cDNAライブラリーを作成した。当初の予定では年間5例程度の採取が期待されていたが、本研究開始直後よりコロナ感染が拡大し、臨床的に審査腹腔鏡を施行する件数が減少したこと、および大学院生の臨床現場への立ち入りが著しく制限されたことから、結果的に2例のライブラリーが形成されるにとどまった。

	Pt1	Pt2
miR-155	5.45	6.21
miR-365	7.21	4.34
miR-21	6.65	3.31
miR-150	2.21	4.21
miR-592	0.91	4.45
miR-181b	0.79	3.49
miR-210	-3.25	-0.5
miR-137	-2.57	-1.73
miR-34a	-3.39	-1.48
miR-34c	-2.96	-3.58
miR-200b	-4.48	-4.7
miR-200c	-6.84	-2.66
miR-203	-5.41	-4.22

miR expression in P cells

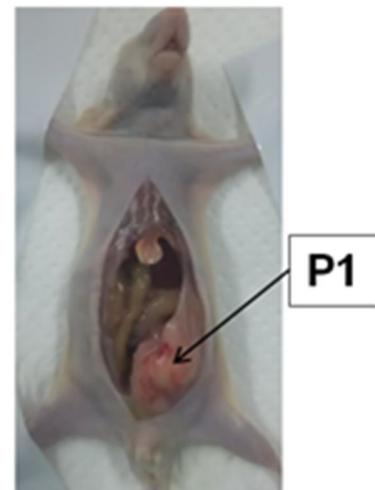
Lower Higher



現状としては右記のごとくmiRNAの発現状況を確認した。非常に興味深いことに、乳癌や正常大腸組織の幹細胞で発現が低下しているとされるmiR-203、miR-200cが¹²⁾、胃癌のP細胞でも発現抑制されていた。

ただ、件数としてまだ2例にとどまっていることから、今後も更なる症例集積を要する。

3. 続いてヒト胃癌セルラインを腹腔内に投与し、腹膜播種を形成させる実験を行った。予備実験として、NCI-N87およびKATO-IIIでは、ヌードマウス腹腔内投与で腹膜転移(P)を形成することを確認した。また、目的とするmiRやその標的候補遺伝子を強制発現するためのlentivirusベクターは、それぞれGFPおよびmCherryで標識したものを作成できるように準備をした。上記2において、適切な候補miR(X)が決定すれば、miR(X)-GFPを胃癌セルラインに強制発現させた後、実際に形成される腹膜播種のphenotypeを評価する予定である。



引用文献

1. Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, Diehn M, Liu H, Panula SP, Chiao E, Dirbas FM, Somlo G, Pera RA, Lao K, Clarke MF. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell*. 138:592-603, 2009
2. Hisamori S, Mukohyama J, Koul S, Hayashi T, Rothenberg ME, Maeda M, Isobe T, Valencia Salazar LE, Qian X, Johnston DM, Qian D, Lao K, Asai N, Kakeji Y, Gennarino VA, Sahoo D, Dalerba P, Shimono Y. Upregulation of BMI1-suppressor miRNAs (miR-200c, miR-203) during terminal differentiation of colon epithelial cells. *J Gastroenterol*. 57(6):407-422, 2022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hisamori Shigeo, Mukohyama Junko, Koul Sanjay, Hayashi Takanori, Rothenberg Michael Evan, Maeda Masao, Isobe Taichi, Valencia Salazar Luis Enrique, Qian Xin, Johnston Darius Michael, Qian Dalong, Lao Kaiqin, Asai Naoya, Kakeji Yoshihiro, Gennarino Vincenzo Alessandro, Sahoo Debashis, Dalerba Piero, Shimono Yohei	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Upregulation of BMI1-suppressor miRNAs (miR-200c, miR-203) during terminal differentiation of colon epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 Online ahead
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-022-01865-9	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Katsuhiko Murakami
2. 発表標題 Therapeutic strategy of conversion surgery for advanced gastric cancer with peritoneal dissemination
3. 学会等名 第76回 日本消化器外科学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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