

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17692

研究課題名（和文）胃癌腹膜播種を亢進する独自の誘導胃癌幹細胞からの播種再発抑制標的の同定

研究課題名（英文）Identification of responsible genes of dissemination of gastric cancer using induced cancer stem-like cells

研究代表者

西山 光郎（Nishiyama, Mitsuo）

山口大学・医学部附属病院・診療助教（4日/週）

研究者番号：50714614

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々独自のcancer stem-like sphere cell (CSLC) 誘導培地を用いて、胃癌細胞株からCSLCを誘導し、がん幹細胞マーカー発現、腹膜播種、抗がん剤耐性、遺伝子発現プロファイルについて検討を行った。ヒト胃癌細胞株MKN45よりがん幹細胞マーカーCD44v発現が上昇したCSLCが誘導され、このCSLCはマウスにおける腹膜播種頻度及び抗がん剤（5-フルオロウラシル、イリノテカン）耐性の増加を示した。さらに、既報の肝がんCSLCと同様に上皮間葉系移行や低酸素に関わる遺伝子セットのenrichや、自然免疫系からの逃避に関わるHLAやMICA/Bの発現上昇が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌実臨床上の大きな課題の一つに腹膜播種再発が挙げられる。播種再発の抑制は胃癌治療成績向上の重要な鍵といえる。我々は独自にがん幹細胞様細胞（CSLC）を有しており、胃癌細胞株から誘導したCSLCは、腹膜播種頻度の増加だけでなく、抗がん剤耐性も上昇を示した。さらに、遺伝子発現プロファイルを検討したところ、転移過程において重要な自然免疫系からの逃避を示した肝がんCSLCと同様のプロファイルを有することが示唆された。本研究による胃癌腹膜播種機構に対する検討は、今後の胃癌予後の改善につながる学術的・社会的意義を有する成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：We induced cancer stem-like sphere cells (CSLCs) from a human gastric cancer cell line, MKN45, using unique CSLC induction medium and examined the expression of cancer stem cell marker (CD44v), peritoneal dissemination, anticancer drug resistance, and gene expression profile. The results showed that CSLCs with elevated expression of cancer stem cell marker CD44v were induced from human gastric cancer cell line MKN45, and these CSLCs showed increased frequency of peritoneal dissemination and resistance to anti-cancer drugs (5-fluorouracil and irinotecan). Furthermore, similar to the previously reported liver-CSLCs, the CSLCs showed enriched gene sets related to epithelial-mesenchymal transition and hypoxia, as well as increased expression of HLA and MICA/B, which are involved in escape from the innate immune system.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌

### 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤や分子標的治療薬が進歩する中、胃癌実臨床上の大きな課題の一つに腹膜播種再発が挙げられる。予後が悪いと言われる3型や4型胃癌においても播種頻度の高さが知られており (Sasako M et al. Shoukagakigeika. 1992; Kitamura K et al. J Surg Oncol. 1995)、播種再発の抑制は胃癌治療成績向上の重要な鍵といえる。この播種制御に関して、申請者が着目しているのが癌幹細胞 (Cancer stem cell: CSC) である。癌組織中に少数含まれる CSC は、転移能、抗癌剤耐性や放射線治療抵抗性を有し、消化器癌の術後再発や遠隔転移への CSC の関与も近年知られ始めた (Clevers H, et al. Nat Med, 2011; Zhou BB, et al. Nat Rev Drug Discov, 2009) ことから、申請者らは CSC と播種とが強く関係すると思え、その分子機構は何かという学術的な「問い」を持っている。

一方で、分化した癌細胞が上皮間葉系転換を介して可塑性を持って CSC の誘導が可能という報告があり (Mani SA, et al. Cell 2008)、研究代表者が所属する教室においても、膵癌細胞株や肝癌細胞株から Cancer stem-like cells (CSLCs) が豊富な細胞集団誘導方法を開発した (Watanabe et al. Int J Oncol, 2014; Hashimoto N, et al. BMC Cancer, 2014; Nishiyama et al. Cancer Science, 2018) (図 1)。さらに、胃癌細胞株からも同様の方法を用いて sphere 形成細胞の誘導に成功した。この胃癌 CSLC を研究することで播種再発を抑制できる治療ターゲットを同定できるのではないかと考えた。

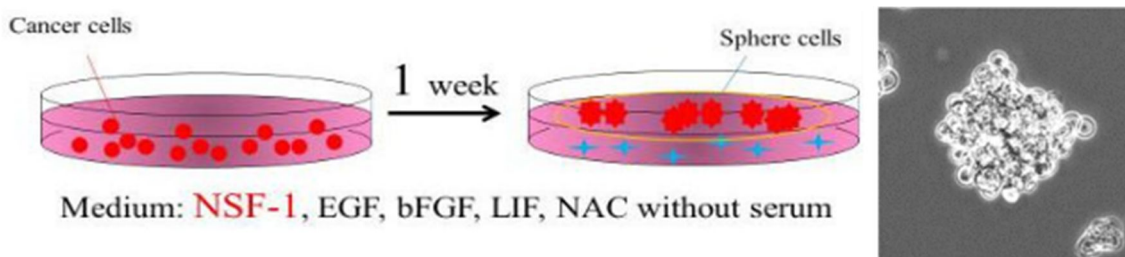


図 1. Cancer stem-like cells の誘導

### 2. 研究の目的

本研究では、胃癌治療成績向上の重要な鍵となる播種再発の抑制に対し、腹膜播種の原因となる CSC に着目して有効な治療ターゲットとなる遺伝子の同定を目的とする。胃癌の術後再発の約半数は腹膜播種であり、その予後は不良で播種に対する新規治療の開発は急務である。

### 3. 研究の方法

#### 細胞株

ヒト胃癌細胞株として MKN7, MKN45 および KATO III を用いた。細胞は 10%FBS 含有 DMEM 培地にて 37℃, 5%CO<sub>2</sub>、湿潤条件下にて培養した。

#### CSLC 誘導

既報に従って (Hashimoto N, et al. BMC Cancer. 2014; Nishiyama M, et al. Cancer Sci. 2018)、Sphere 誘導培地によって 1 週間培養して得られた浮遊 Sphere 細胞を回収した。

#### フローサイトメトリー解析

細胞培養後、スフィアと親の付着細胞をそれぞれ Accumax と Accutase (Innovative Cell Technologies) を用いて分散した。分散した細胞は、Fixable Viability Dye eFluor 450 (Thermo Fisher Scientific) で染色し、生細胞と死細胞の区別をした。CD44 パリアントの染色には、一次抗体として抗 CD44v9 (Cosmo Bio)、二次抗体としてマウス抗ラット IgG FITC (Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ使用しました。ラット IgG2a、k アイソタイプコントロール (Thermo Fisher Scientific) を抗 CD44v9 抗体のネガティブコントロールとして使用した。フローサイトメトリー解析は、MACSQuant アナライザー (Miltenyi Biotec) を用いて実施した。

#### マウス腹膜播種モデル

免疫不全マウス NOD-Rag1<sup>null</sup> IL2r<sup>null</sup> double mutation (NRG マウス) の腹腔に細胞を 10<sup>4</sup> 個注射し、8 週間後に腹膜播種の形成を確認した。

#### 抗がん剤感受性解析

テトラゾリウム化合物 (MTS) を含む CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (プロメガ) を用いて cell viability を測定した。培養液中の細胞を、5-フルオロウラシ

ル (Sigma-Aldrich)、シスプラチン (Sigma-Aldrich)、塩酸イリノテカン (Sigma-Aldrich) のいずれかを含んだ 10%FBS 含有 DMEM 培地にて 37℃, 5%CO<sub>2</sub>、湿潤条件下にて 24 時間培養した。MTS 試薬添加 2 時間後の O.D. 492 および O.D. 650 を、EnVision プレートリーダー (PerkinElmer) を用いて測定した。抗がん剤で処理した細胞の生存率は、抗がん剤非存在下での生存率に対する比率として計算した。

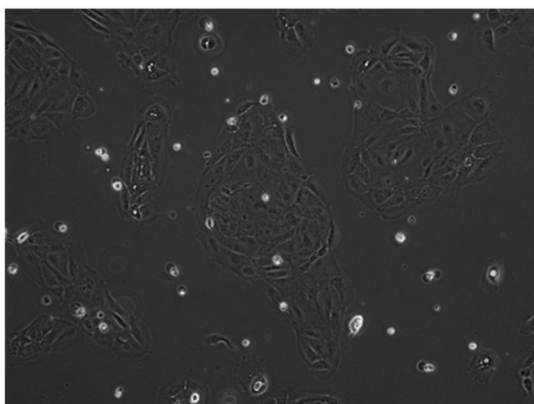
#### RNA-sequencing

細胞を QIAzol (Qiagen) により溶解し、miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を単離した。RNA の品質は、Bioanalyzer 分析 (Agilent Technologies) により確認した。TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold LT Sample Prep kit (Illumina) を用いて、シーケンスライブラリを構築した。ライブラリーは、Bioanalyzer 分析による定量、および Qubit dsDNA HS Assay キットと Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いた蛍光法による定量後にプールされた。ペアエンド断片 (75 bp × 2) の塩基配列 (fastq 形式) を NextSeq 500 (Illumina) を用いて得た。データは、cutadapt と cmpfastq\_pe.pl を用いてリードのクリーニングを行った。クリーニングされたショートリードは、STAR (version 2.5.1b) を用いて参照ゲノム (hg38) にマッピングされ、各サンプルの鎖特異的なカウントは、RSEM (version 1.3.3) を用いて取得した後に、TCC パッケージを用いた Trimmed Mean of M values 法で正規化した。EdgeR (version 3.28.1) を用いて、q 値 < 0.05 で 2 倍以上の変化を示した遺伝子を差次的発現とみなした。Gene set enrichment analysis (GSEA) は、Java コマンドラインプログラム GSEA2 (バージョン 4.3.2) を用いて実施した。

#### 4. 研究成果

独自 Sphere 誘導培地 (Sphere induction medium, SIM) を用いて、CSC の特徴である sphere 形成細胞の誘導をヒト胃癌細胞株 (MKN7, MKN45, KATO III) に対して行った。その結果、MKN45 からは Cancer stem-like sphere cell (CSLC) が誘導されたが、MKN7 では接着細胞のままであった。そのため、MKN45 を CSLC 形成株、MKN7 を CSLC 非形成株として以後の解析に用いた (図 2)。KATO III 細胞株については、通常培養下でも半浮遊状態を示し、SIM 下においては凝集体が見られたが、これは死細胞塊であったため、以後の解析には用いていない。

**MKN7 -> not sphere**



**MKN45 -> sphere**

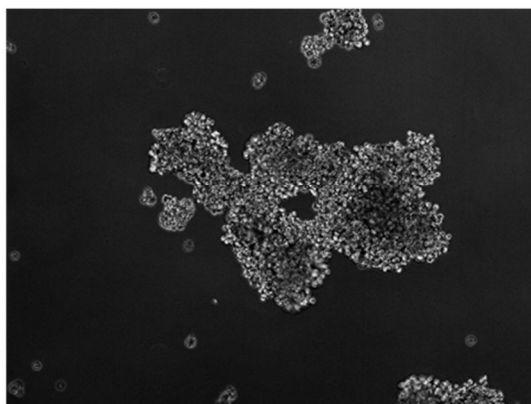


図 2. Sphere 細胞

CSLC 形成株である MKN45 を用いて、CSC マーカーである CD44 variant isoform 9 (CD44v) の発現を親株と Sphere 細胞とで比較したところ、Sphere 細胞では親株と比較して CD44v 発現が亢進していることが示された (図 3)。親株と Sphere 細胞をそれぞれ超免疫不全マウス (NRG マウス) に腹腔内投与し腹膜播種頻度を比較した結果、Sphere 細胞投与でのみ高頻度の腹膜播種を観察した (図 4)。

(a) 親株

(b) sphere細胞

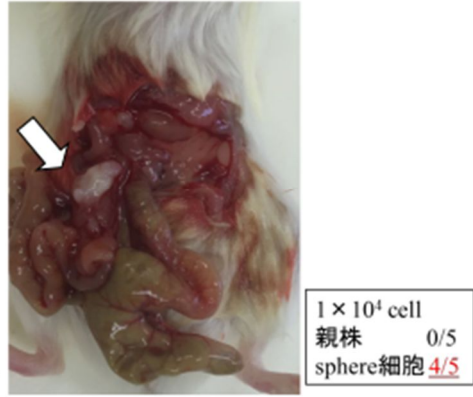
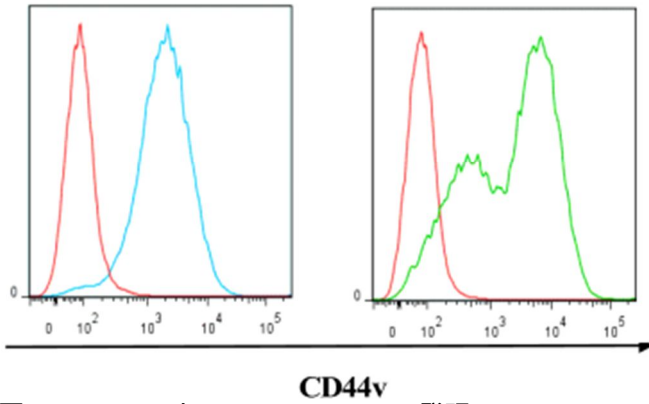


図 3. CSC マーカーCD44 variant 9 発現

図 4. マウス腹膜播種頻度

また、抗癌剤耐性能 (5-フルオロウラシル, シスプラチン, イリノテカン) について通常培地下と SIM 下において評価した結果、MKN45 は SIM 下において 5-FU および CPT-11 に対して有意な耐性化を認めた。CSLC 非形成株である MKN7 では上述の抗癌剤耐性化は認められなかった (図 5)。

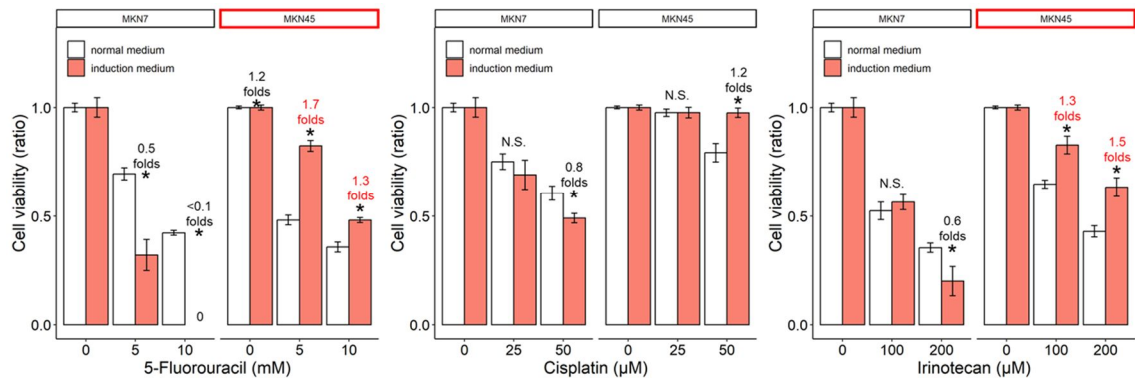


図 5. 抗がん剤存在下での細胞生存率

さらに、RNA-sequencing および Gene Set Enrichment Analysis を行い、CSLC 形成によって特異的に enrich された特徴を探索した。その結果、これまで我々が肝癌 CSLC から得ていた結果と同様に上皮間葉系移行や低酸素が特徴として得られた (図 6)。さらに、肝癌 CSLC にて転移と関係する NK 細胞からの逃避機構として示された HLA や MICA/B 発現の上昇も示された。

### MKN45-sphere vs MKN45 parental

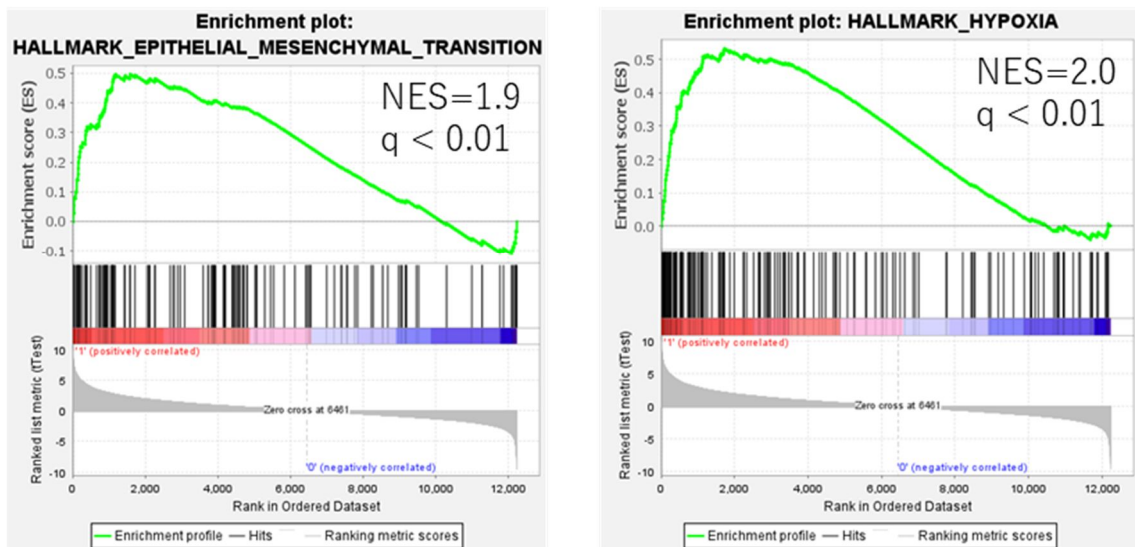


図 6. Gene set enrichment analysis

以上より、胃がん幹細胞様細胞は、腹膜播種頻度の亢進だけでなく、抗がん剤耐性の上昇も示し、さらに、胃がん幹細胞様細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルを得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujiwara Yasuhiro, Tsunedomi Ryouichi, Yoshimura Kiyoshi, Matsukuma Satoshi, Fujiwara Nobuyuki, Nishiyama Mitsuo, Kanekiyo Shinsuke, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Tokumitsu Yukio, Yoshida Shin, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki	4. 巻 50
2. 論文標題 Pancreatic Cancer Stem-Like Cells With High Calreticulin Expression Associated With Immune Surveillance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 405 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001772	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 Tsunedomi Ryouichi, Yoshimura Kiyoshi, Kimura Yuta, Nishiyama Mitsuo, Fujiwara Nobuyuki, Matsukuma Satoshi, Kanekiyo Shinsuke, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Tokumitsu Yukio, Yoshida Shin, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Elevated expression of RAB3B plays important roles in chemoresistance and metastatic potential of hepatoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-09370-1	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14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西山光郎
2. 発表標題 食道胃接合部癌の郭清範囲の検討
3. 学会等名 第92回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島千代、西山光郎
2. 発表標題 Nivolumab を投与した胃癌症例の末梢血好中球/リンパ球比（NLR）の推移の検討
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 恒富亮一、西山光郎
2. 発表標題 誘導癌幹細胞における免疫逃避機構の検討
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 恒富亮一、西山光郎
2. 発表標題 抗がん剤耐性・転移能亢進を示す肝癌幹細胞における免疫逃避機構の検討
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島千代、西山光郎
2. 発表標題 当科における胃癌術後合併症と予後の検討
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 恒富亮一、西山光郎
2. 発表標題 肝転移能亢進を示す肝癌幹細胞における免疫逃避
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊裕策、西山光郎
2. 発表標題 高齢者胃癌に対する胃切除後長期予後の予測因子
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯田通久、西山光郎
2. 発表標題 80歳以上高齢者胃癌手術後の短期および長期成績に影響を及ぼす術前因子の解析
3. 学会等名 第94回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原康弘、西山光郎
2. 発表標題 膵癌幹細胞様細胞の細胞表面における免疫関連分子の検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊孝啓、西山光郎
2. 発表標題 高齢者胃癌手術後の短期および長期成績に影響を及ぼす術前因子の解析
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 恒富亮一、西山光郎
2. 発表標題 肝癌幹細胞における自然免疫系からの逃避
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊孝啓、西山光郎
2. 発表標題 高齢者胃癌における手術後合併症および予後予測因子としての CONUT score の有用性
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 恒富亮一、西山光郎
2. 発表標題 がんの進展・浸潤に關与する肝癌幹細胞様 Sphere 細胞における RAB3B の役割
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯田通久、西山光郎
2. 発表標題 高齢者胃癌手術における短期および長期成績に影響を及ぼす予測因子の探索
3. 学会等名 第30回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2022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
---------	---------