

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591451

研究課題名（和文）腹膜播種発生に関わる腹膜中皮細胞の間葉系形質転換と造腫瘍性についての実験的検討

研究課題名（英文）Human Peritoneal Mesothelial Cell play important roles in the development of peritoneal metastasis by its EMT change

研究代表者

伏田 幸夫（FUSHIDA SACHIO）

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：10301194

研究成果の概要（和文）：我々は微小環境下において、がん細胞が分泌する TGF- $\beta$  が腹膜中皮細胞（HPMC）におよぼす影響を検討した。TGF- $\beta$  によって活性化した HPMC（a-HPMC）は間葉系細胞様に形質転換し（EMT）、浸潤能や増殖能を獲得することを明らかにした。TGF- $\beta$  によって誘導される EMT 様変化は増殖抑制を来さない低濃度 paclitaxel によって阻害可能であり、そのメカニズムとして Smad2 のリン酸化を抑制することを明らかにした。さらに、マウス背部に MKN45 と a-HPMC を共に培養したものを移植したところ、腫瘍の線維化をも誘導することを証明した。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether TGF- $\beta$  derived from cancer cells in the peritoneal microenvironment activates human peritoneal mesothelial cells (HPMCs), leading to the progression and fibrosis of gastric cancer. We found that activated HPMC (a-HPMCs) became more invasive and up-regulated proliferation of human gastric cancer-derived MKN45 cells following direct cell-cell contact. These EMT-like changes of HPMC were suppressed under 5nM of paclitaxel pretreatment by inhibiting Smad2 phosphorylation. To measure the effects of co-culture in vivo, we developed a mouse xenograft model. The largest tumors were observed in mice given MKN45 cells that had been co-cultured with a-HPMCs. Additionally, these tumors contained HPMC-derived fibrous tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃癌、腹膜播種、腹膜中皮細胞、EMT

## 1. 研究開始当初の背景

近年、進行胃癌においても治療成績は向上してきているが、再発形式でもっとも頻度の高い腹膜播種に対する治療法が確立していないのが現状である。最近頻用されている5-FUの代謝拮抗剤が含まれるS-1や従来の制癌剤とは異なるp53非依存性アポトーシスを誘導するタキサン系制癌剤の全身投与が腹膜播種の余命延長に貢献しているものの、その50%生存率は約1年であり2年生存率はほぼゼロに等しい。よって、抗癌剤による治療とともに腹膜播種の確立や増生に関わる分子機構を解明し、それらを標的とした新たな治療法の開発が急務である。

また、腹膜播種の重要な病態として腫瘍内の癌細胞は周囲に線維芽細胞やコラーゲンファイバーを誘導し、胆管や腸管および尿管の壁肥厚と内腔狭窄による閉塞性黄疸や腸閉塞、水腎症により死に至らしめる。近年、肝線維化に中心的に働く伊藤細胞が炎症細胞などから分泌されるTGF- $\beta$ により活性化され細胞外マトリックス成分を増生する一方、伊藤細胞はアンジオテンシンII1型(AT-1)受容体を発現しており、アンジオテンシンIIがTGF- $\beta$ を介してコラーゲン産生を促進することが明らかとなった。現在、動物実験においてAT1受容体拮抗薬が肝の線維化を抑制する可能性が示唆されており、癌の増殖・血管新生もアンジオテンシンIIが関与している事が明らかとなった。われわれも腫瘍(播種巣)内で産生されるアンジオテンシンIIがアンジオテンシンI型受容体を介して増殖・進展に関与していることを証明し、高血圧治療薬の1種であるARB(アンジオテンシンI型受容体ブロッカー)による腹膜播種治療の可能性について報告したが(Int J Oncol 2009)、未だ線維化にいたるメカニズ

ムが十分解明されていない。すなわち、癌細胞から放出されるTGF- $\beta$ によって腹膜中皮細胞に細胞間隙を生じさせ基底膜に接着し浸潤することが知られているが、腹膜中皮細胞自体が播種巣の増生・線維化にどのように関与しているかは明らかでない。

## 2. 研究の目的

近年、癌細胞と間質細胞との相互作用によって細胞の形態や性質が変化することが知られており、癌細胞が浸潤する際には間葉系細胞様に変化したり(epithelial-mesenchymal transition:EMT)再び間葉系から上皮系に変化したり(MET)する。また、線維化に関わる線維芽細胞も骨髄由来のfibrocyteが局所で間葉系変化をきたすと考えられている。

今回、腹膜を構成する中皮細胞が癌の接着に関わるだけでなく、自らが間葉系細胞に形質転換し、癌の増殖や浸潤に影響を与え、線維化にも関与するという仮説を証明することを本研究の目的とする。

すなわち、ヒト大網から分離培養した腹膜中皮細胞をもちいて腹膜播種成立に重要なサイトカインであるTGF- $\beta$ によって中皮細胞が間葉系細胞に形質転換することを間葉系マーカーの発現や運動・浸潤能を獲得することで証明する。一般的に、低濃度の化学療法剤や低線量の放射線照射により癌細胞にEMTが誘導されるが、paclitaxelは冠動脈薬剤溶出ステントに利用され再狭窄(線維化)を妨げる働きがあることから、低濃度paclitaxelが中皮細胞のTGF- $\beta$ によるEMTを抑制する特殊な薬剤である可能性があり、このことを実験的に証明する。

また、熱傷患者の皮膚のケロイド形成(線維化)には骨髄由来のfibrocyteが分泌するサイトカインやケモカインが関与すること

が知られており、腹膜播種患者の fibrocyte においても正常者の fibrocyte と異なる性格を有している可能性がある。そこで、腹膜播種患者の血液から fibrocyte を分離培養し、その培養上清を中皮細胞に添加することで線維芽細胞様に形態変化することを証明する。

動物実験においては、癌細胞単独移植と比較し、中皮細胞との混合移植によって腫瘍増殖能が亢進し、かつ腫瘍内間質組織が宿主由来だけでなく、中皮細胞由来の成分が主体であることを免疫組織学的に証明する。また、fibrocyte から分化誘導した細胞 (fibroblast) と癌細胞の混合移植により、腫瘍増殖能が亢進し、腫瘍内線維化も誘導されることを証明する。

### 3. 研究の方法

腹膜播種を有しない腹腔内洗浄細胞診陰性である胃癌切除標本 (主に早期胃癌) から得られた正常大網から分離した腹膜中皮細胞を培養し、正常腹膜モデルを作成する。この培養系に TGF- $\beta$  を添加し濃度依存性に中皮細胞が形態的に敷石状から紡錘状に変化することを証明する。次いで、TGF- $\beta$  添加後の中皮細胞における形質転換を間葉系細胞マーカーである vimentin, N-カドヘリン、 $\square$ SMA などの発現の有無によって検討する (RT-PCR、ウェスタンブロット、細胞免疫染色)。また、機能的にも間葉系細胞様変化をしていることを invasion アッセイをもちいて証明する。

TGF- $\beta$  によって活性化した中皮細胞と胃癌細胞株 MKN45 を分離チャンバーにて共培養 (細胞上清のみ共有) した場合と、両者を同一チャンバー内で接触培養した場合の、MKN45 の増殖能の違いについて検討する。混合培養された両細胞群を抗体ビーズ法で再度分離し、それぞれからウェスタンブロット

法で EMT 関連タンパクの発現を確認する。さらに 3次元ゲル内で MKN45 単独や正常中皮細胞 + MKN45、TGF- $\beta$  による活性化中皮細胞 + MKN45 との混合細胞群におけるコロニー形成能を検討する。

ついで、増殖抑制のかからない低濃度の paclitaxel で HPMC を前処置した後 TGF- $\beta$  を投与した場合に EMT マーカーが減弱すること、および TGF- $\beta$  & Smad 経路のどの部位に paclitaxel が関与しているかを検討する。

動物事件では  $\alpha$ -HPMC と MKN45 を共培養したものをマウス背部に移植し HPMC+MKN45、MKN45 単独移植群と腫瘍径や線維化の程度を比較する。また、MKN45 と MKN45 と共培養した fibrocyte をマウス背部に移植し、MKN45 単独移植群と腫瘍径や線維化の程度を比較する。

### 4. 研究成果

正常腹膜中皮細胞に TGF- $\beta$  を添加すると、敷石状から紡錘上に形態変化し、間葉系マーカーである vimentin や  $\alpha$ SMA の発現が増加することを確認し、活性化した腹膜中皮細胞 ( $\alpha$ -HPMC) の増殖能や浸潤能は非活性 HPMC よりも増強していることを証明した。癌細胞との相互作用として、共培養系で検討すると、 $\alpha$ -HPMC により MKN45 も増殖能が増強しており、3次元ゲル内でのコロニー形成を確認した。低濃度の paclitaxel は TGF- $\beta$  による HPMC の EMT 様変化を抑制し、そのメカニズムとして、低濃度 paclitaxel が Smad2/3 のリン酸化を抑制するためであることが明らかとなった。

マウスモデルにおいては、共培養した MKN45 と  $\alpha$ -HPMC を背部に移植した群は MKN45 単独で移植した群 (移植細胞数は同数) よりも有意に腫瘍径は大きく、腫瘍内に  $\alpha$ -HPMC 由来と考えられる筋線維芽細胞様の間質細胞とコラーゲン線維の増生を証明した。さらに、骨髄由来の fibrocyte と癌細胞の共存に

よって fibrocyte が fibroblast へ分化し、腫瘍の増殖や線維化を亢進することを証明した。

従来、腹膜中皮細胞は癌細胞の接着により形態変化することで中皮細胞下の基底膜が露出し、癌細胞が浸潤しやすくなると考えられていたが、今回の研究によって腹膜中皮細胞は癌細胞との共同作業として自らも形質転換し浸潤増殖し、繊維化を伴う腫瘍（腹膜播種）形成に関与することが明らかとなった。さらにそこに骨髄由来の fibrocyte が遊走し、主要の増大や線維化に拍車がかかるものと考えられた。

今後は、われわれの開発した線維化腫瘍モデルをもちいて低濃度 paclitaxel 以外に線維化を抑制する薬剤の探索をおこないたい。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

- 1, Tsukada T, Fushida S et al.: Low-dose paclitaxel modulates tumour fibrosis in gastric cancer. *Int J Oncol* 42: 1167-74, 2013 (査読有) doi:10.3892/ijo.2013.1801
- 2, Tsukada T, Fushida S et al.: The role of human peritoneal mesothelial cells in the fibrosis and progression of gastric cancer. *Int J Oncol* 41: 476-82, 2012. (査読有), doi:10.3892/ijo.2012.1490

〔学会発表〕（計 4 件）

- 1, 伏田幸夫他：スキルス胃癌の病態と集学的治療の現況と将来展望、第 85 回日本胃癌学会総会：2013 年 2 月 28 日、大阪国際会議場（大阪府）
- 2, 伏田幸夫他：腹腔内微小環境下における線維化メカニズムの解明とその制御. 第 112 回日本外科学会定期学術集会；2012 年

4 月 13 日、幕張メッセ（千葉県）

- 3, Fushida S et al. Interaction of gastric cancer cell and bone-marrow derived mesenchymal cell; fibrocyte. 19<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week, October 24, 2011. STOCKHOLM INTERNATIONAL FAIRS (Sweden)
- 4, Fushida S et al. Analysis of mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cell and cell-cell interaction with gastric cancer cell in the microenvironment of peritoneal metastasis. 69<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association. September 24, 2010. Osaka International Convention Center Corp (Osaka)

〔図書〕（計 1 件）

伏田幸夫共著：医薬ジャーナル社，スキルス胃癌—基礎と臨床，pp251-258，2010

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伏田 幸夫 (FUSHIDA SACHIO)  
金沢大学・大学病院・講師  
研究者番号：10301194

##### (2) 研究分担者

原田 真市 (HARADA SHINICHI)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号：90272955  
(H22-H23)