

## 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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591469

研究課題名（和文） 胃癌における上皮間葉移行（EMT）の解析による治療応用

研究課題名（英文） Therapeutic aspects from the analysis of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in gastric cancer.

研究代表者

和田 則仁 (WADA NORIHITO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40256087

研究成果の概要（和文）：上皮間葉移行（EMT）新たな視点から胃癌の浸潤転移を抑制し進行胃癌の治療に役立てることを目的に研究した。手術で切除した胃を調べたところ HOXB9 という EMT を誘導する分子の発現がリンパ節転移や脈管浸潤と関連していることと、生命予後が悪いことを明らかにした。TMK-1 という胃癌細胞に HOXB9 の遺伝子を導入して EMT を誘導すると癌の悪性度が増す傾向がみられた。さらなる研究によりリンパ節転移抑制の観点から治療応用を切り開ける可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have conducted our research in order to investigate the possibility of therapeutic application of the concept of epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the treatment of advanced gastric cancer. Gastric cancer tissue from the patient treated in our hospital was immunostained with the antibody of an EMT inducer HOXB9. Immunopositivity was correlated with lymph node metastasis and vascular/lymphatic invasion. Survival analysis was revealed that HOXB9 positive group had a worse prognosis. The virulence of gastric cancer cells was increased by gene introduction of HOXB9 by in vitro experiments. Further investigation will reveal the pathways for the development of a novel therapy of gastric cancer in the aspect of the inhibition of lymph node metastasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

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：胃十二指腸外科学、胃癌、上皮間葉移行、リンパ節転移、HOXB9

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 胃がんは我が国のがんの死亡率の上位を占めその新たな治療戦略の確立は公衆衛生学上重要である。我々はこれまで胃癌の浸潤・転移におけるマトリックス分解酵素（MMP）の関与を研究し報告してきた。1997年、肝細胞癌における MMP-1 の特徴的な発現

（Okazaki I, Wada N, et al.: Hepatol 1997;25:580-4）を解明するとともに、胃癌における MMP-1 の発現を報告した（Otani Y, et al. J Gastroenterol 1994;29:391-7）。さらに 1999 年には MMP 阻害剤の R-94138（Igarashi N, et al.: Jpn J Cancer Res 1999;90:116-121）により、また 2002 年には

他の MMP 阻害剤 marimastat (Kimata M, Wada N, et al.: Jpn J Cancer Res 2002;93:834-41) や、nobiletin (Minagawa A, et al.: Jpn J Cancer Res 2001;92:1322-8) により in vivo の腹膜播種モデルにおいて胃癌の腹膜転移抑制が認められることを報告した。この機序として marimastat に血管新生を阻害する作用があることも明らかにしてきた (Wada N, et al.: Clin Exp Meta 2003;20:431-5)。さらに胃癌ではスキルス胃癌が予後不良な難治癌として知られているが、スキルス胃癌における MMP や、その生理的阻害物質の TIMP の発現を非スキルス胃癌との比較して網羅的に解析し、スキルス胃癌におけるマトリックス代謝を明らかにした (Yokoyama T, et al.: Clin Exp Meta 2004;21:223-33)。すなわち胃癌の浸潤・転移には MMP が関与し、MMP 阻害には治療応用の可能性があることを実験的に証明し、報告してきた。

(2) 近年、癌の浸潤・転移過程において上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) という現象が広く受け入れられてきている。我々は免疫賦活剤として知られている PSK (クレスチン®) に、TGF $\beta$  により活性化される主要な経路である smad 経路を抑制する働きがあることを確認した。この結果 PSK に EMT を阻害する薬剤としての働きが期待され、この独創的な研究を推進する大きな動機となっている。

(3) 胃癌においても EMT に関する報告が散見される。EMT inducer のひとつの Twist を antisense vector で down regulation することで、胃癌細胞 (MKN45) の浸潤が抑制される (Yang Z, et al. Biochem Biophys Res Commun 2007;358:925-30)。また、乳癌において MMP 自体が EMT を誘導することが明らかとなってきている (Radisky DC, et al.: Nature 2005;436:123-7) が、これまで我々が明らかにしてきた胃癌における MMP の動態と EMT の関係は不明な点が多い。

(4) そこで胃癌において MMP が EMT を誘導し、その調節により胃癌の浸潤転移を抑制するという仮説を検証し、胃癌治療への応用に着目した。

## 2. 研究の目的

(1) 我々はこれまで胃癌の浸潤・転移における MMP の役割を明らかにし、MMP 阻害の治療的応用可能性について報告してきた。また既に上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) という新たな視点から消化器癌の研究を開始しており、マトリックス代謝の視点から研究を推進する。

(2) 3年間に、胃癌切除検体における EMT の確認、in vitro において EMT 誘導後の浸潤・転移能の変化確認、EMT 抑制による浸潤・転移能の低下の確認、EMT 抑制の臨床応用の計画立案を行う。

(3) 胃癌での EMT 研究は世界的に立ち遅れている。我々は以前からスキルスと非スキルス胃癌の相違に着目している点で世界的に独創的で研究成果が難治癌治療へ全く新規の戦略のひとつになりうる。

## 3. 研究の方法

(1) 胃癌切除検体における EMT の組織学的検討: 既に倫理委員会で承認を得た手順で、当院における胃癌手術検体を取り扱う。2008年6月~2012年2月に当院で胃切除を行った症例で、文書にて本研究の同意を得られた69例を対象とした。免疫染色は既報 (Seki H, et al. Ann Surg Oncol. 2012;19:1831-40) の通りとする。JpXB9 発現は図1に従い半定量化した。EMT 関連分子 (Smad2, Snail, Slug, Twist, SIP1 など)、epithelial マーカー (E-cadherin など)、mesenchymal マーカー (vimentin など) の発現と、癌細胞の浸潤形態とを癌の heterogeneity を考慮しつつ比較検討する。さらに臨床病理学的因子 (T, N, M, ly, v, 予後など) との相関をみる。特に sm および mp 程度に浸潤した癌を中心に検討し、EMT の初期の変化を捉える。またスキルス胃癌と非スキルス胃癌との比較検討を合わせて行う。

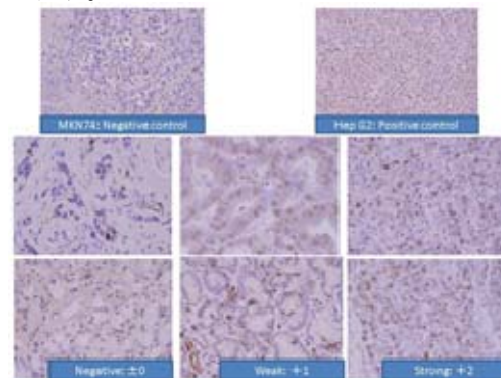


図1 HOXB9 の免疫組織化学的評価基準

(2) 胃癌細胞に対する in vitro での EMT 誘導と転移浸潤能の検討: 教室で保有する胃癌培養株 TMK-1, MKN45, MKN74, MKN28 などについて、EMT の状況を qRT-PCR にてスクリーニングする。Epithelial な形質が強い胃癌細胞株 TMK-1 に HOXB9 遺伝子 (コントロールは LacZ 遺伝子) を導入する。HOXB9 を恒常的に高発現する TMK-1/HOXB9 と、テトラサイクリン発現誘導システム (Tet-On&reg; 3G 発現誘導システム、タカラバイオ(株)) により

HOXB9 発現を調節可能な TMK-1/TR/HOXB9 の 2 種類の細胞を作成する。遺伝子導入の効率を評価する。逆に mesenchymal な形質の強い培養株は shRNA による阻害で MET を誘導し、その後の浸潤能の変化を検討する。浸潤能の評価は scratch assay および invasion assay を用いる。

(3) In vivo では、免疫不全マウス(SCID)の xenograft モデルにおいて、テトラサイクリンを経口投与することで HOXB9 遺伝子の発現を調節しながら、腫瘍の増殖能、脈管浸潤能、EMT を評価する。また得られた腫瘍における種々の病理学的因子を評価する。

#### 4. 研究成果

(1) 胃癌切除検体における EMT の組織学的検討：HOXB9 の免疫組織学的発現と臨床病理学的因子の検討(表 1)では、以下の表のごとく HOXB9 を発現している群で有意にリンパ節転移が多く、病期が進行しており、脈管浸潤が高度であった。

表 1 HOXB9 の免疫組織学的発現と臨床病理学的因子の検討

	HOXB9 (+) (n=30)	HOXB9 (-) (n=39)	P val.
T1 /T2 /T3 /T4	11 /5 /10 /4	4 /5 /15 /15	0.012
N0 /N1 /N2 /N3	19 /3 /1 /7	11 /5 /8 /15	0.005
M0 /M1	29 /1	37 /2	0.35
Stage IA/IB/IIA/IIIB /IIIA/IIIB/IIIC/IV	8 /4 /8 /3 /1 /2 /2 /2	3 /2 /6 /5 /7 /7 /7 /2	0.002
ly0 /ly1 /ly2 /ly3	14 /5 /5 /6	5 /11 /14 /9	0.005
v0 /v1 /v2 /v3	13 /11 /3 /2	6 /16 /15 /1	0.002
med /int /sci	2 /15 /9	2 /18 /14	0.79
INFa/INFb/INFc	2 /12 /12	3 /12 /22	0.32
Diff./Undif.	16/14	16/21	0.46

また予後因子としての意義については、図 2 に示すように、HOXB9 発現群において有意に不良であり、HOXB9 が胃癌において予後不良を予測する因子となりうる可能性が示唆された。

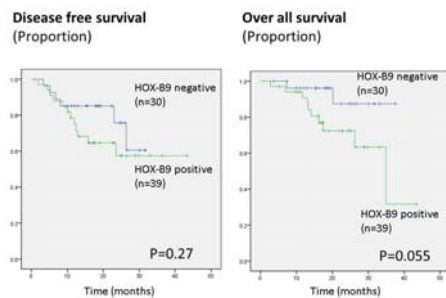


図 2 HOXB9 の免疫組織学的発現と生存の検討

(2) 胃癌細胞に対する in vitro での EMT 誘導と転移浸潤能の検討：教室で保有する胃癌培養株 TMK-1、MKN45、MKN74、MKN28 などについて、EMT の状況を qRT-PCR にてスクリーニングした。HOXB9、Eカドヘリン、Nカドヘリン、Vimentin、slug、snail、twist の発現状況を調べたところ(図 3)、TMK-1 は epithelial な形質が強く、一方 MKN74、MKN45 は mesenchymal な形質が強いことが判明した。

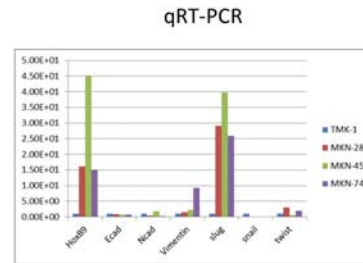


図 3 胃癌培養株における EMT 関連分子の発現状況

Epithelial な形質が強い胃癌細胞株 TMK-1 に HOXB9 遺伝子(コントロールは LacZ 遺伝子)を導入しえた。HOXB9 を恒常的に高発現する TMK-1/HOXB9 と、テトラサイクリン発現誘導システムにより HOXB9 発現を調節可能な TMK-1/TR/HOXB9 の 2 種類の細胞を作成した。逆に mesenchymal な形質の強い MKN45 では shRNA により HOXB9 の発現を阻害しえた(図 4)。これにより mesenchymal な癌細胞で MET を誘導し、その後の浸潤能の変化を検討することが可能となり、MET 誘導による新たな胃癌治療への応用が展望される。浸潤能の評価は scratch assay および invasion assay を用いる。

#### Sh-RNAによるHOXB9発現抑制

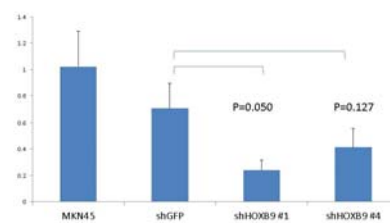


図 4 MKN45 に対する shRNA による HOXB9 の発現抑制

TMK-1 に HOXB9 遺伝子を導入し、EMT を誘導することで遊走能がどのように変化するかを検討した。図 5 に示すように、HOXB9 導入により遊走能が亢進する傾向が認められたが、統計学的な有意差を検出するには至らなかった。今後、条件設定を最適化することで、詳細な検討を進める予定である。

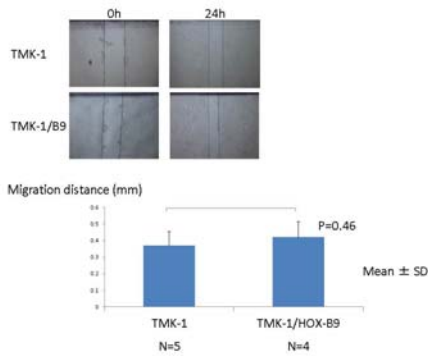


図5 EMT誘導した胃癌細胞の Scratch assay による遊走能の検討

(3) In vivo では、免疫不全マウスによる xenograft モデルにおいて、テトラサイクリンを経口投与することでHOXB9 遺伝子の発現を調節しながら腫瘍形成能を評価した。しかしながら腫瘍の増大能が低く (図6)、実験条件のさらなる最適が必要であった。今後、さらなる研究の推進により、腫瘍の増殖能、脈管浸潤能、EMTを評価することで、胃癌の悪性化におけるEMTの関与を生体内で明らかにし、リンパ節転移の観点から治療応用を切り開く必要があると考えられた。



図6 免疫不全マウス背部皮下の xenograft モデル

#### 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 45 件)

- Hirano Y, Takeuchi H, Suda K, Oyama T, Nakamura R, Takahashi T, Kawakubo H, Wada N, Saikawa Y, Obara H, Jinno H, Hasegawa H, Tanabe M, Kitagawa Y. Clinical utility of the Revised Cardiac Risk Index in non-cardiac surgery for elderly patients: a prospective cohort study. Surg Today 2013 査読有
- Kanda T, Nishida T, Wada N, Kobayashi O,

Yamamoto M, Sawaki A, Boku N, Koseki M, Doi T, Toh Y, Kakeji Y, Sugiyama T, Komatsu Y, Kikuchi S, Ogoshi K, Katai H, Miyachi K, Hirota S, Ohtsu A. Adjuvant therapy with imatinib mesylate after resection of primary high-risk gastrointestinal stromal tumors in Japanese patients. Int J Clin Oncol 2013; 18: 38-45 査読有

- Fukuda K, Saikawa Y, Takahashi M, Takahashi T, Wada N, Kawakubo H, Takeuchi H, Kitagawa Y. Antitumor effect of cetuximab in combination with S-1 in EGFR-amplified gastric cancer cells. Int J Oncol 2012; 40: 975-982 査読有
- Fukuda K, Saikawa Y, Yagi H, Wada N, Takahashi T, Kitagawa Y. Role of integrin  $\alpha 1$  subunits in gastric cancer patients with peritoneal dissemination. Mol Med Repor 2012; 5: 336-40 査読有
- Takeuchi H, Oyama T, Kamiya S, Nakamura R, Takahashi T, Wada N, Saikawa Y, Kitagawa Y. Laparoscopy-assisted proximal gastrectomy with sentinel node mapping for early gastric cancer. World J Surg 2011; 35: 2463-2471 査読有
- Takahashi T, Saikawa Y, Takaishi H, Takeuchi H, Wada N, Oyama T, Fukuda K, Fukada J, Kawaguchi O, Shigematsu N, Kitagawa Y. Phase I study of neoadjuvant chemoradiotherapy consisting of S-1 and cisplatin for patients with resectable advanced gastric cancer (KOGC-01). Anticancer Res 2011; 31: 3079-3083 査読有
- Takahashi T, Saikawa Y, Takaishi H, Takeuchi H, Wada N, Oyama T, Nakamura R, Kitagawa Y. Feasibility and efficacy of combination chemotherapy with S-1 and fractional Cisplatin for advanced gastric cancer. Anticancer Res 2010; 30: 3759-3762 査読有
- Takahashi T, Saikawa Y, Igarashi T, Tsuwano S, Kumagai K, Nakamura R, Ooyama T, Wada N, Takeuchi H, Takaishi H, Kitagawa Y. Octreotide acetate enables the administration of chemoradiotherapy, including the oral anticancer drug S-1, in gastric cancer patients with malignant gastrointestinal obstruction. Oncology Letters 2010; 1: 673-677 査読有

[学会発表] (計 389 件)

- Takeuchi H. Gastric Cancer. Surgery Clinical significance of cancer cells in lymphatic vessels between primary tumor and sentinel nodes gastric cancer. 10th International Conference of the Asian

- Clinical Oncology Society 2012/06/14、Seoul, Korea
2. Takahashi T. Phase I study of preoperative chemoradiotherapy consisted of S-1 and cisplatin for patients with curable advanced gastric cancer (KOGC-01). International Surgical Week 2011.8.29, Yokohama
  3. Nakamura R. Retrospective analysis for prognostic outcome of gastric cancer in young patients. International Surgical Week 2011.8.29, Yokohama
  4. Kamiya S. The assessment of the procedure of the additional gastrectomy with sentinel node (SN) mapping after endoscopic submucosal dissection (ESD). 9th International Gastric Cancer Congress 2011.4.22, Seoul, Korea
  5. Wada T. Feasibility and efficacy of combination chemotherapy with S-1 and fractional cisplatin for advanced gastric cancer. 9th International Gastric Cancer Congress 2011.4.22, Seoul, Korea
  6. Wada N. Long-term outcomes of laparoscopic wedge resection for gastrointestinal stromal tumor (GIST) of the stomach. 9th International Gastric Cancer Congress 2011.4.22, Seoul, Korea
  7. Mayanagi S. Histological complete response for patients with advanced gastric cancer after preoperative chemoradiation therapy with S-1 and low-dose cisplatin. 9th International Gastric Cancer Congress 2011.4.21, Seoul, Korea
  8. Takeuchi H. Laparoscopy -assisted proximal gastrectomy based on the SN concept and esophagogastric anastomosis using the orvil. 9th International Gastric Cancer Congress 2011.4.21, Seoul, Korea
  9. Wada T. The role of CD44 variant in the development of spasmodic polypeptide expressing metaplasia (SPEM) and gastric cancer. AACR 102nd Annual Meeting 2011.4.3, Florida, USA
  10. Wada N. Oncologic Outcomes of Laparoscopic Surgery for Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST) of the Stomach.. SAGES 2011/03/31, San Antonio, USA
  11. Niihara M. Validation study of sentinel lymph node mapping using radio- and dye-guided methods in gastric cancer: 431 cases at a single institution. 8th Gastrointestinal Cancers Symposium 2011/1/20, San Francisco, USA
  12. Kamiya S. Availability of sentinel node as predictive index of lymph node metastases to early-stage gastric cancer surgery. 8th Gastrointestinal Cancers Symposium

- 2011/1/20, San Francisco, USA
13. Niihara M. The Microanatomic Location of Metastatic Gastric Cancer in Sentinel Lymph Nodes. The 7th International Sentinel Node Society Meeting 2010.11.18, Yokohama
  14. Niihara M. Validation Study of Sentinel Lymph Node Mapping Using Radio- and Dye-guided Method in Gastric Cancer. The 7th International Sentinel Node Society Meeting 2010.11.18, Yokohama
  15. Kamiya S. Evaluation of the Proximal Gastrectomy with Sentinel Node Biopsy in Gastric Cancer. The 7th International Sentinel Node Society Meeting 2010.11.18, Yokohama
  16. Kamiya S. Evaluation of the Pylorus-preserving Gastrectomy with Sentinel Node Biopsy during an Operation for Less Invasive Surgery. The 7th International Sentinel Node Society Meeting 2010.11.18, Yokohama
  17. Wada N. Laparoscopic gastrojejunostomy for malignant gastric outlet obstruction. 12th World Congress of Endoscopic Surgery 2010/4/16, National Harbor, USA

〔図書〕 (計 7 件)

1. 和田則仁、古川俊治. 医学書院. 今日の治療指針 2012 年版. 2012. 01 P1759-1763
2. 和田則仁. 中山書店. 症候群ハンドブック. 2011. 05 P255
3. 田邊稔, 河地茂行, 板野理, 篠田昌宏, 和田則仁, 大島剛, 小野嘉大, 谷紀幸, 上田政和, 北川雄光. 南山堂. 消化器単孔式腹腔鏡下手術. 2010. 10 P79-91

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~nori/hp/research.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 則仁 (WADA NORIHITO)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：40256087

(2) 研究分担者

竹内 裕也 (TAKEUCHI HIROYA)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：20265838

林田 哲 (HAYASHIDA TETSU)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：80327543

(3)連携研究者  
なし