

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390329

研究課題名(和文)低酸素微小環境における胃癌細胞の悪性形質獲得の機序解明と治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Analysis of factors associated with the development of gastric cancer in hypoxic microenvironment

研究代表者

八代 正和 (Yashiro, Masakazu)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60305638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌周囲低酸素環境が癌の悪性度に影響することが示唆されている。本研究は、低酸素環境が癌関連線維芽細胞(CAF)と胃癌細胞との相互作用におよぼす影響について検討した。胃癌細胞とCAFを低酸素状態にて共培養し、増殖能、遊走能、及び増殖因子受容体発現を検討した。その結果、低酸素はスキルス胃癌細胞のCXCR4発現やCAFのCXCL12産生を亢進させ、CAF-スキルス胃癌細胞の相互作用を促進した。CXCR4阻害剤はこの相互作用を抑制した。以上のことから、低酸素環境はスキルス胃癌のCXCL12/CXCR4シグナルを増強し、CXCR4はスキルス胃癌の分子標的であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the growth-signaling of gastric cancer (GC) cells in focus on the interaction with cancer-associated fibroblasts (CAFs) and gastric cancer (GC) cells under normoxia and hypoxia. Nine cell lines, including four diffuse-type GC cell lines, two intestinal-type GC cell lines, and three CAF cell lines were used. Cells were examined for expression CXCR4, FGFR2 and SDF1. CXCR4 expression by diffuse-type GC cells was significantly increased in hypoxia, while FGFR2 expression was decreased. FGFR2 inhibition significantly decreased the activity of CAFs for diffuse-type GC cells in normoxia but not in hypoxia. In contrast, CXCR4 inhibition significantly decreased the activity of CAFs in hypoxia. HIF1 siRNA significantly decreased both CXCR4 expression by diffuse-type GC cells and SDF1 production by CAFs. These findings suggest that diffuse-type GC cells might switch their driver pathways from FGFR2 signaling to SDF1/CXCR4 axis through HIF1 in hypoxic microenvironments.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌周囲低酸素環境 胃癌 スキルス胃癌細胞 癌関連線維芽細胞 CXCL12 CXCR4 分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌は術後に腹膜転移などの再発が多いため治療成績は依然不良である。そのため胃癌の病態解明と治療法の開発は現在においても重要課題の一つである。申請者は癌細胞と間質細胞との相互作用の観点から、胃癌の増殖進展は癌細胞だけの特性で決定されるのではなく癌周囲微小環境が関与することを明らかにしてきた。癌微小環境は間質細胞のみならず酸素状態や栄養状態などの因子があり、これらの因子が癌組織にどのような影響を与えているのかを検討する必要がある。一般に固形腫瘍は、癌細胞の増殖が進むと自らの過剰な酸素消費や血流配分の異常によって、癌微小環境に低酸素状態が生じる。最近、国内・国外において低酸素環境における癌難治性の研究が始められるようになり、低酸素微小環境下の癌細胞は難治癌の原因の一つと考えられるようになってきた。しかしながら、胃癌細胞の低酸素による悪性形質獲得の機序はほとんど研究されておらず、また低酸素環境の分子機構を標的とした癌治療薬は臨床開発されていない。

## 2. 研究の目的

上記の背景にもとづいて、癌低酸素微小環境における胃癌の悪性形質獲得機序を癌細胞のみならず癌細胞・間質細胞相互作用や癌幹細胞の観点から解明し、その機序に立脚した低酸素環境特異的な分子を標的とした胃癌治療法開発を本研究の目的とした。すなわち、細胞株を用いて低酸素環境における胃癌細胞の特性を解析する。細胞株には胃癌細胞、間質細胞、低酸素耐性胃癌細胞を用いて、低酸素環境下の間質細胞 - 胃癌細胞間相互作用を解明する。低酸素微小環境における胃癌細胞の特性に基づいた新規治療法の開発を行う。FGFR2 阻害剤あるいは TGF $\beta$  阻害剤を用いて、低酸素微小環境における胃癌悪性形質獲得に対する抑制効果を明らかにする。さらに種々のシグナル抑制剤を用いて低酸素環境における抑制作用を明らかにする。低酸素状態の胃癌の特性を明らかにする。すなわち、胃癌標本を用いて CA-9 低酸素マーカーの臨床病理学的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)低酸素環境における胃癌細胞の特性の解析. 胃癌細胞株 (OCUM-2M, OCUM-2MD3, OCUM-2D, OCUM-8, OCUM-12, MKN45, MKN74), 低酸素耐性株 (OCUM-2MD3/Hypo, OCUM-12/Hypo)を用いて低酸素の影響を検討した。OCUM-2M, OCUM-2MD3, OCUM-2D, OCUM-8, OCUM-12 はスキルス胃癌細胞株である。

急性低酸素環境の検討: 胃癌細胞株を 1%O<sub>2</sub> 状態で培養し、EMT、増殖能、浸潤能を検討。

低酸素耐性胃癌細胞株を親株と比較解析する。低酸素耐性株を樹立し、耐性株の細胞形態、増殖能、接着能、浸潤能を検討。間接着因子 ZO-1、ZO-2、E-cadherin の発現を検討。

耐性株の転移能: ヌードマウスの胃壁に耐性株を接種し転移形成を検討する。

(2)胃癌組織低酸素環境の臨床病理学的意義

低酸素状態で誘導される carbonic anhydrase-9 (CA-9)および hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)を指標に、胃癌組織における低酸素状態とその臨床病理学的意義について検討する。胃癌手術標本パラフィン包埋切片を用い、抗 CA-9 抗体、抗 HIF-1 抗体による免疫組織学的染色を行い、CA-9 や HIF-1 陽性で示される低酸素状態の臨床病理学的意義を検討する。

(3)低酸素環境における胃癌細胞と癌関連線維芽細胞(CAF)との相互作用: 胃癌細胞と CAF を低酸素状態にて共培養し、増殖能、遊走能、増殖因子産生、及び増殖因子受容体発現を検討した。また、種々の増殖因子シグナル阻害剤の有効性を検討する。

## 4. 研究成果

(1)低酸素耐性胃癌株は、親株に比し EMT を示し、増殖能、接着能、浸潤能、マウス転移能とも増加していた。耐性株を 1%酸素下で培養してもアポトーシスは少なかった。転移関連遺伝子では、耐性株にのみ MMP-2 の発現を認めた。ZO-1, ZO-2, E-cadherin の接着因子は低酸素下で発現が減弱した。それぞれの細胞株を胃壁に移植すると、親株組織は壊死組織を広範囲に認め、一方耐性株組織では壊死組織をほとんど認めなかった。慢性的低酸素環境は、EMT や浸潤能を促進させることで癌の悪性化を増強していることが示唆された。EMT や浸潤能の促進には、ZO-1, ZO-2, E-cadherin の接着因子の発現の減弱や MMP-2 の発現の増加が関与している事が示唆された。今回樹立された低酸素耐性細胞株は癌細胞の低酸素環境の解明に有用な細胞株であると考えられた。

(2)抗 CA-9 抗体による胃癌 265 例の免疫組織学的染色を行った。胃癌 265 例中 88 例が CA-9 陽性であった。CA-9 発現は、4 型で 60%、未分化癌で 41%、進行癌で 43%、リンパ節転移陽性で 45%、リンパ管侵襲陽性で 43%と有意に高頻度であった。予後因子についての単変量解析では CA-9 の発現は予後に有意に相関していたが、多変量解析では有意な独立した予後因子ではなかった。CA-9 の発現は overall 免疫染色の実験では、さまざまな因子と CA-9 の発現が関わりを示し、腫瘍の悪性度との関係を示唆された。化学療法や放射線療法の抵抗性を示す低酸素の状態に CA-9 が関わっている可能性があり、今後 CA-9 をコントロー

ルすることで治療効果を向上させる可能性が示唆された。

(3) 癌関連線維芽細胞 (CaF-45, CaF-53, CaF-58)を用いた。通常酸素ではスキルス胃癌細胞株は CAF と共培養することで、増殖能は 1.3 倍、遊走能は 1.4 倍に増加した。さらに、低酸素では SGC は CAF と共培養することで増殖能は 1.6 倍、遊走能は 2 倍に増加した。低酸素環境は CAF のスキルス胃癌細胞増殖・浸潤促進作用をさらに亢進させた。PT-PCR, Western blot では低酸素はスキルス胃癌細胞株の CXCR4 発現を亢進させ、ELISA では CAF の CXCL12 産生を亢進させた。HIF-1 siRNA により HIF-1 を抑制することで、スキルス胃癌細胞株の CXCR4 発現は低下し、CAF の CXCL12 産生は低下した。CXCR4 阻害剤は低酸素環境において有意に CAF の増殖、遊走促進作用を抑制した。以上のことから、低酸素環境にてスキルス胃癌細胞株の CXCR4 発現が亢進し、また CAF が産生する CXCL12 が促進され、HIF1 を介してスキルス胃癌細胞の CXCL12/CXCR4 シグナルが増強される事が明らかになった。CXCR4 阻害剤はスキルス胃癌に対する新規分子標的治療剤である事が示唆された。

## 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 34 件)

1. Fukuoka T, Yashiro M, Kinoshita H, Morisaki T, Hasegawa T, Hirakawa T, Aomatsu N, Takeda H, Maruyama T, Hirakawa K. Prostaglandin d synthase is a potential novel therapeutic agent for the treatment of gastric carcinomas expressing PPAR $\gamma$ . *Int J Cancer*. 2015 (in press). 査読有
2. Tsuji T, Satoyoshi R, Aiba N, Kubo T, Yanagihara K, Maeda D, Goto A, Ishikawa K, Yashiro M, Tanaka M. *Cancer Res*. 75(2):356-66. 査読有
3. Kiga K, Mimuro H, Suzuki M, Shinozaki-Ushiku A, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Ogawa M, Iwasaki YW, Kayo H, Fukuda-Yuzawa Y, Yashiro M, Fukayama M, Fukao T, Sasakawa C. Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of gastric epithelium during chronic *Helicobacter pylori* infection. *Nature Commun*. 5:4497.2014. (in press) 査読有
4. Morisaki T, Yashiro M, Kakehashi A, Inagaki A, Fukuoka T, Ohira M, Wanibuchi H, Hirakawa K Comparative Proteomics Analysis of Gastric Cancer Stem Cells. *PLoS One*. *PLoS One*. 9(11):e110736.2014. 査読有
5. Satoyoshi R, Kuriyama S, Aiba N, Yashiro M, Tanaka M. Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer-associated fibroblasts. *Oncogene*. 34(5):650-60. 2015. 査読有
6. Hasegawa T Yashiro M, Nishii T, Matsuoka J, Morisaki T, Fukuoka T, Shimizu K, Shimizu T, Miwa A, Hirakawa K. Cancer-associated fibroblasts might sustain the stemness of scirrhous gastric cancer cells via transforming growth factor- $\beta$  signaling. *Int J Cancer*. 2014, 134, 1785-1795. 査読有
7. Yashiro M, Nishii T, Matsuzaki T, Hasegawa T, Morisaki T, Fukuoka T, Hirakawa K. A cMet inhibitor increases the chemosensitivity of cancer stem cells to the irinotecan in gastric carcinoma. *Br J Cancer*. 2013. 109:2619-28. 査読有
8. Yoshii M, Tanaka H, Ohira M, Muguruma K, Sakurai K, Kubo N, Yashiro M, Sawada T, Hirakawa K. Association of MHC class I expression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 60: 611-5. 2013. 査読有
9. Ohashi M, Oyama T, Putranto EW, Waku T, Nobusada H, Kataoka K, Matsuno K, Yashiro M, Morikawa K, Huh NH, Miyachi H. Design and synthesis of a series of alpha-benzyl phenylpropanoic acid-type peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma partial agonists with improved aqueous solubility. *Bioorg Med Chem*. 21:2319-32. 2013. 査読有
10. Kubo N, Ohira M, Sakurai K, Toyokawa T, Tanaka H, Muguruma K, Nagahara H, Kimura K, Noda E, Amano R, Yamada N, Yashiro M, Maeda K, Sawada T, Hirakawa K. SPan-1 is a useful prognostic marker for patients with stage IV gastric cancer who underwent palliative gastrectomy: a retrospective multivariate study. *World J Surg*. 37:1681-7. 2013. 査読有
11. Nakamoto K, Nagahara H, Maeda K, Noda E, Inoue T, Yashiro M, Nishiguchi Y, Ohira M, Hirakawa K. Expression of E-cadherin and KRAS mutation may serve as biomarkers of cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer. *Oncol Lett*. 5:1295-300. 2013. 査読有
12. Ohira G, Kimura K, Ymada N, Amano R, Nakata B, Doi Y, Murata A, Yashiro M, Tanaka S, Ohsawa M, Wakasa K, Hirakawa K. MUC1 and HER2 might be associated with invasive phenotype of intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN). *Hepatogastroenterology*. 60. 2013. 査読有
13. Matsuoka J, Yashiro M, Doi Y, Fuyuhiko Y, Kato Y, Shinto O, Aomatsu N, Hirakawa T, Hasegawa T, Shimizu K, Shimizu T, Miwa A, Yamada N, Sawada T, Hirakawa K. Hypoxia stimulates the EMT of gastric cancer cells through autocrine TGFbeta signaling. *PLoS One*. 8:e62310. 2013. 査読有
14. Murata A, Amano R, Yamada N, Kimura K, Yashiro M, Nakata B, Hirakawa K. Prognostic predictive values of gemcitabine sensitivity-related gene products for unresectable or recurrent biliary tract cancer treated with gemcitabine alone. *World J Surg Oncol*. 11:117. 2013. 査読有
15. Hirakawa T, Yashiro M, Murata A, Hirata K, Kimura K, Amano R, Yamada N, Nakata B, Hirakawa K. IGF-1 receptor and IGF binding protein-3 might predict prognosis of patients with resectable pancreatic cancer. *BMC Cancer*. 13:392. 2013. 査読有
16. Amano R, Yamada N, Nakata B, Kimura K,

- Yashiro M, Ohira M, Hirakawa K. A prognostic indicator for the resection of liver metastasis of colorectal cancer. *Surg Today*. 2013. 査読有
17. Tanaka T, Kuramitsu Y, Wang Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda K, Hirakawa K, Yashiro M, Naito S, Nakamura K. Glyoxalase I as a candidate for indicating the metastatic potential of SN12C human renal cell carcinoma cell clones. *Oncol Rep*. 2013. 査読有
18. Kubo N, Ohira M, Lee T, Sakurai K, Toyokawa T, Tanaka H, Muguruma K, Kimura K, Nagahara H, Noda E, Amano R, Ohtani H, Yamashita Y, Yashiro M, Maeda K, Hirakawa K. Successful resection of esophageal cancer with right aortic arch by video-assisted thoracoscopic surgery: a case report. *Anticancer Res*. 33:1635-40. 2013. 査読有
19. Kashiwagi S, Yashiro M, Takashima T, Aomatsu N, Kawajiri H, Ogawa Y, Onoda N, Ishikawa T, Wakasa K, Hirakawa K. c-Kit expression as a prognostic molecular marker in patients with basal-like breast cancer. *Br J Surg*. 100:490-6. 2013. 査読有
20. Doi Y, Yashiro M, Yamada N, Amano R, Noda S, Hirakawa K. VEGF-A/VEGFR-2 Signaling Plays an Important Role for the Motility of Pancreas Cancer Cells. *Ann Surg Oncol*. 19:2733-43. 2012. 査読有
21. Aomatsu N, Yashiro M, Kashiwagi S, Takashima T, Ishikawa T, Ohsawa M, Wakasa K, Hirakawa K. CD133 is a useful surrogate marker for predicting chemosensitivity to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *PLoS One*. 7:e45865. 2012. 査読有
22. Kataoka Y, Mukohara T, Tomioka H, Funakoshi Y, Kiyota N, Fujiwara Y, Yashiro M, Hirakawa K, Hirai M, Minami H. Foretinib (GSK1363089), a multi-kinase inhibitor of MET and VEGFRs, inhibits growth of gastric cancer cell lines by blocking inter-receptor tyrosine kinase networks. *Invest New Drugs*. 30:1352-60. 2012. 査読有
23. Yamazaki M, Yamashita Y, Kubo N, Yashiro M, Ohira M, Ako E, Tanaka H, Muguruma K, Sawada T, Hirakawa K. Concurrent biological targeting therapy of squamous cell carcinoma of the esophagus with cetuximab and trastuzumab. *Oncol Rep*. 28:49-54. 2012. 査読有
24. Matsuoka J, Yashiro M, Sakurai K, Kubo N, Ohira M, Hirakawa K. Role of the stemness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma. *J Surg Res*. 174:130-5. 2012. 査読有
25. Yoshii M, Tanaka H, Ohira M, Muguruma K, Yashiro M, Sawada T, Hirakawa K. Expression of Forkhead box P3 in tumour cells causes immunoregulatory function of signet ring cell carcinoma of the stomach. *Br J Cancer*. 106:1668-74. 2012. 査読有
26. Harada M, Iwata C, Saito H, Yashiro M, Hirakawa K, Miyazono K, Kato Y, Kano MR. NC-6301, a polymeric micelle rationally optimized for effective release of docetaxel, is potent but is less toxic than native docetaxel in vivo. *Int J Nanomedicine*. 7:2713-27. 2012. 査読有
27. Ito G, Tanaka H, Ohira M, Yoshii M, Yashiro M, Yamada N, Maeda K, Sawada T, Hirakawa K. Correlation between efficacy of PSK postoperative adjuvant immunochemotherapy for gastric cancer and expression of MHC class I. *Exp Ther Med*. 3:925-30. 2012. 査読有
28. Kubo N, Ohira M, Yamashita Y, Sakurai K, Kimura K, Nagahara H, Noda E, Amano R, Yashiro M, Maeda K, Hirakawa K. Successful resection of esophageal carcinoma associated with double aortic arch: a case report. *Anticancer Res*. 32:3351-5. 2012. 査読有
29. Nishioka N, Matsuoka T, Yashiro M, Hirakawa K, Roberts JD. Plasminogen activator inhibitor 1 RNAi suppresses gastric cancer metastasis in vivo. *Cancer Sci*. 103:228-32. 2012. 査読有
30. Rafi M, Cabral H, Kano MR, Mi P, Iwata C, Yashiro M, Hirakawa K, Miyazono K, Nishiyama N, Kataoka K. Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane)platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis. *J Control Release*. 159:189-96. 2012. 査読有
31. Noda E, Maeda K, Inoue T, Fukunaga S, Nagahara H, Shibutani M, Amano R, Nakata B, Tanaka H, Muguruma K, Yamada N, Yashiro M, Ohira M, Ishikawa T, Hirakawa K. Predictive value of expression of ERCC 1 and GST-p for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 59:130-3. 2012. 査読有
32. Matsuoka T, Yashiro M, Nishioka N, Hirakawa K, Olden K, Roberts JD. PI3K/Akt signalling is required for the attachment and spreading, and growth in vivo of metastatic scirrhous gastric carcinoma. *Br J Cancer*. 106:1535-42. 2012. 査読有
33. Katsuno Y, Ehata S, Yashiro M, Yanagihara K, Hirakawa K, Miyazono K. Coordinated expression of REG4 and aldehyde dehydrogenase 1 regulating tumorigenic capacity of diffuse-type gastric carcinoma-initiating cells is inhibited by TGF-beta. *J Pathol*. 228(3):391-404. 2012. 査読有
34. Fuyuhiko Y, Yashiro M, Noda S, Matsuoka J, Hasegawa T, Kato Y, Sawada T, Hirakawa K. Cancer-associated orthotopic myofibroblasts stimulates the motility of gastric carcinoma cells. *Cancer Sci*. 103:797-805. 2012. 査読有
- [学会発表](計5件)
1. Yashiro M, Hasegawa T, Fukuoka T, Kinoshita H, Morisaki T, Kasashima H, Masuda G, Kubo N, Hirakawa K. The stemness of gastric cancer stem cells is sustained by TGFβ produced from cancer-associated fibroblasts. American Association for Cancer Research 105th Annual Meeting 2014. 2014.4.6, San Diego, USA.
2. Yashiro M. Molecular mechanisms responsible

for scirrhous gastric cancer and novel targeting therapies. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference ( The Latest Advances in Gastric Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics ) 2013.12.18, Tokyo.

3. Yashiro M, Fukuoka T, Kinoshita H, Nishii T, Hasegawa T, Matsuzaki T, Morisaki T, Hirakawa K. A c-Met inhibitor increases the chemosensitivity of cancer stem cells to the irinotecan active metabolite SN38 in gastric carcinoma. American Association for Cancer Research 104rd Annual Meeting 2013.4.7, Washington, USA.
4. Yashiro M, Fukuoka T, Kinoshita H, Nishii T, Hasegawa T, Matsuzaki T, Morisaki T, Hirakawa K. An EGFR inhibitor enhances the efficacy of SN38, an active metabolite of irinotecan, in SN38-refractory gastric carcinoma cells. American Association for Cancer Research 103rd Annual Meeting. Convention Center, 2012.4.5, Chicago, USA.
5. Yashiro M, Shinto O, Nakamura K, Tendo M, Matsuoka T, Matsuzaki T, Kaizaki R, Miwa A, Hirakawa K. Synergistic antitumor effects of FGFR2 inhibitor with 5-fluorouracil on diffuse-type gastric carcinoma. American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting, 2011.4.5, Florida, USA.

〔図書〕(計 1 件)

八代正和, 最新胃癌学, 日本臨床, 2014, 751.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: プロスタグランジン D2 合成酵素を利用した消化器癌治療剤

発明者: 公立大学法人大阪市立大学

権利者: 平川弘聖, 八代正和, 福岡達成

番号: 特願 2013-268465

出願年月日: 平成 25 年 12 月 26 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.osaka-cu.ac.jp/surgical-oncology/relation/geriatric\\_oncology.html](http://www.med.osaka-cu.ac.jp/surgical-oncology/relation/geriatric_oncology.html)

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

八代 正和 (YASHIRO, Masakazu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 60305638