

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501322

研究課題名(和文) 腹膜播種病巣制御のためのびまん型胃がん細胞に特異的な遺伝子治療ベクターの開発

研究課題名(英文) Development of vector specific to diffuse-type gastric cancer cells for peritoneal metastasis control

研究代表者

佐々木 博己 (Sasaki, Hiroki)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：60235265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：びまん型胃がんでも強く発現するがん遺伝子候補GSDMB遺伝子に着目し、プロモーター活性を調べた。腹膜中皮細胞で活性が弱く、6種のびまん性胃がん細胞株中5株で強い活性を示した。このGSDMBプロモーターとHSVtkを組み込んだレンチウイルスベクターを作製した。中皮細胞ではGanciclovir(GCV)投与でほとんど殺細胞作用を認めなかったが、60As6では、70%の細胞を殺傷した。さらに、60As6細胞をマウス腹腔に接種1週後からGCVを週1回腹腔内に投与し、30日後の生存の有無で評価したところ、GCV投与なしでは死亡率が67%であるのに対して、GCV投与では33%であった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the promoter activity of the GSDMB gene, which was identified to be expressed preferentially in diffuse-type gastric cancers (GCs). This promoter was found to act weakly in human mesothelial cell line MeT-5A but strongly in 5 of 6 diffuse-type GC cell lines. We next constructed the GSDMB promoter-driven HSVtk-lentivirus vector. This vector showed no cytotoxicity in MeT-5A cells, whereas 70% of diffuse-type GC-derived 60As6 cells were killed by Ganciclovir (GCV) treatment. We then established a peritoneal-metastasis control mouse model using 60As6 cells. By GCV treatment only once a week for 30 days after i.p. of 10⁶ 60As6 cells, we evaluated in vivo effects of this vector. The survival rate of GCV-treated mice showed 67%, but that of control mice showed 33%.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：遺伝子治療 びまん型胃がん

1. 研究開始当初の背景

胃がんの再発で最も頻度が高いのは腹膜再発であり、約半数を占めるびまん型の病理組織像を示す未分化型胃がんが顕著である。腹腔洗浄細胞診で陽性症例(進行がんの約20%)の外科切除後の再発は90%と高く、予後不良である。術後化学療法の効果も限定的であり、革新的治療法の開発が必要であった。このような背景から未分化型胃がん細胞を特異的に標的する殺細胞性遺伝子治療ベクターの開発を計画した。

2. 研究の目的

腹膜播種を頻発する未分化胃がん細胞に特異的に攻撃するウイルスベクターを作製し、腹膜播種を抑制する遺伝子治療法を開発する。

3. 研究の方法

本研究は以下のステップで行った。

1) プロモーターの選択

未分化型胃がん組織と分化型胃がん組織のマイクロアレイデータから未分化型胃がんが特異的に発現する遺伝子を選抜し、がん細胞株で発現する遺伝子のプロモーターを同定する。

2) プロモーターの in vitro 活性評価

選抜したプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子に繋げ、ヒト中皮細胞で働かず、未分化型胃がん由来の複数の細胞株で活性が高いことを確認する。

3) マウス腹膜再発抑制モデルの構築

未分化型胃がん細胞を Scid/scid マウスの腹腔に接種し、一か月ほどで多重結節を作り、腹水を貯留するモデルを作製する。

4) 殺細胞性ウイルスベクターの作製

HSVtk 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターにプロモーターを繋げ、in vitro での Ganciclovir (GCV) 投与での未分化型胃がん細胞特異的な殺細胞効果を調べる。

5) in vivo 腹膜再発抑制試験

3) で構築したマウスモデルを用い、4) で作製したウイルスベクターを用いて治療効果を調べる。

4. 研究成果

H23 年度は、びまん型胃がん細胞で特異的に発現する遺伝子を選抜するため、22 例のびまん型胃がん組織と 12 例の充実型胃がん組織のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを比較し、びまん型で特徴的に発現する約 700 種の遺伝子を選抜した。その中で特にびまん型の多くで強く発現する遺伝子に MYH11, LIPF, MFAP4, SERPINF1 があつたが、胃がん細胞株での発現は弱く、主に線維芽細胞等の豊富な間質由来の遺伝子であったため、引き続き遺伝子探索を進めた。一方、びまん型胃がんの特徴的な腹膜再発に関与し、腹膜中皮では発現しないケモカイン受容体 CXCR4 および CXCR7 遺伝子および充実型胃が

んで遺伝子増幅を示し、びまん型胃がんでも強く発現するがん遺伝子候補 GSDMB 遺伝子に着目し、そのプロモーターをルシフェラーゼレポーターに組み込み、プロモーター活性を調べた。ヒトの腹膜中皮細胞 MeT-5A で活性が弱く、6 種のびまん型胃がん細胞株 44As3, 58As9, 60As6, HSC44, HSC58, HSC60 で活性が強いプロモーターを期待したところ、このプロモーターは 6 種のびまん型胃がん細胞株中 5 株で強い活性を示し、腹膜中皮細胞では基本レポーターベクター程度の活性を示すのみだった。

H24 年度は、この GSDMB プロモーターを細胞殺傷用プラスミドベクターに組み込み、細胞死誘導活性を測定したところ、上記プロモーター活性の強い胃がん細胞に高い活性を認めた。同時に HSVtk 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターも準備した。このベクターは、in vivo 腹膜再発モデルマウスの抑制試験に使うため、染色体への挿入型を選択した。これは腫瘍内への遺伝子導入が充分でなくとも、バースタンド効果によって、染色体に組み込まれていない周囲のがん細胞や、殺傷から逃れた細胞分裂を休止させたがん細胞への効果が期待できる。さらに、特異的なプロモーター以外にも強力活性を持つ CMV プロモーターに細胞死誘導遺伝子 GSDMA を連結させたアデノウイルスベクターを準備し、ウイルス粒子を大量に得た。このウイルスを胃がん細胞に感染させ、in vitro の細胞殺傷効果も確認した。

最終年度は、HSVtk 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターの評価を行った。中皮細胞 MeT-5A では Ganciclovir (GCV) 投与でほとんど殺細胞作用を認めなかったが、びまん型胃がん細胞 60As6 では、70%の細胞を殺傷した(p=0.002)。次に、in vivo 腹膜再発モデルマウスの試験を行った。実際に、10⁶ 個の 60As6 細胞を腹腔に接種し、十分に生着が確認できる 1 週間後から GCV を週 1 回腹腔内に投与し、30 日後の生存の有無で評価したところ、GCV 投与なしでは死亡率が 67%であるのに対して、GCV 投与では 33%であった。現在、接種細胞数、GCV の投与量の組み合わせを増やし、統計的な有為差を検証中である。

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 17 件) 胃がん研究のみ

1. Oue N, Naito Y, Hayashi T, Takigahira M, Kawano-Nagatsuma A, Sentani K, Sakamoto N, Zarni Oo H, Uraoka N, Yanagihara K, Ochiai A, Sasaki H, Yasi W. Signal peptidase complex 18, encoded by SEC11A, contributes to progression via TGF- α secretion in gastric cancer. *Oncogene*, doi: 10.1038, in press. (査読有)

2. Sakamoto N, Naito Y, Oue N, Sentani K, Uraoka N, Zarni Oo H, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W. MicroRNA-148a is downregulated in gastric cancer, targets MMP7, and indicates tumor invasiveness and poor prognosis. *Cancer Sci.*, 105: 236-243, 2014. (査読有)
3. Kojima M, Higuchi Y, Yokota M, Ishii G, Saito N, Aoyagi K, Sasaki H, Ochiai A. Human subperitoneal fibroblast and cancer cell interaction creates microenvironment that enhances tumor progression and metastasis. *PLoS One*, 9: e88018, 2014. (査読有)
4. Tanabe S, Aoyagi K, Yokozaki H, Sasaki H. Gene expression signatures for identifying diffuse-type gastric cancer associated with epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Oncol.*, 44: 1955-70, 2014. (査読有)
5. Fujita T, Yanagihara K, Takeshita F, Aoyagi K, Takigahira M, Chiwaki F, Fukagawa T, Katai H, Ochiya T, Sakamoto H, Konno H, Yoshida T, Sasaki H. Intraperitoneal delivery of a small interfering RNA targeting NEDD1 prolongs the survival of scirrhous gastric cancer model mice. *Cancer Sci.*, 104: 214-222, 2013. (査読有)
6. Aoyagi K, Tamaoki M, Nishimura T, Sasaki H. Technical consideration for analyzing EMT-MET data from surgical samples. *Cancer Lett.*, Doi: 10.1016, 2013. (査読有)
7. Ishii H, Sasaki H, Aoyagi K, Yamazaki T. Classification of gastric cancer subtypes using ICA, MLR and Bayesian network. *Stud. Health Technol. Inform.*, doi: 10.3233, 2013. (査読有)
8. Satoh Y, Mori K, Kitano K, Kitayama J, Yokota H, Sasaki H, Uozaki H, Fukayama M, Seto M, Nagawa H, Yatomi Y, Takai D. Analysis for the combination expression of CK20, FABP1, and MUC2 is sensitive for the prediction of peritoneal recurrence in gastric cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 42: 148-152, 2012. (査読有)
9. Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Ichiro Oda I, Taniguchi H, Koizumi F, Yanagihara K, Sasaki H, Nishio K, Yamada Y. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br. J. Cancer*, 106: 727-732, 2012. (査読有)
10. Sentani K, Oue N, Naito Y, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Uraoka N, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W. Upregulation of HOXA10 in gastric cancer with intestinal mucin phenotype: reduction during tumor progression and favorable prognosis. *Carcinogenesis*, 33: 1081-1088, 2012. (査読有)
11. Nishimura K, Semba S, Aoyagi K, Sasaki H, Yokozaki H. Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. *Pathobiology*, 79: 290-306, 2012. (査読有)
12. Suzuki M, Narita M, Ashikawa M, Furuta S, Matoba M, Sasaki H, Yanagihara K, Terawaki K, Suzuki T, Uezono Y. Changes in the melanocortin receptors in the hypothalamus of a rat model of cancer cachexia. *Synapse*, 66: 747-751, 2012. (査読有)
13. Suzuki M, Narita M, Hasegawa M, Furuta S, Kawamata T, Miyano K, Yanagihara K, Chiwaki F, Ochiya T, Suzuki T, Matoba M, Sasaki H, Uezono Y. Sensation of abdominal pain induced by peritoneal carcinomatosis is accompanied by changes in the expression of substance P and m-opioid receptors in the spinal cord of mice. *Anesthesiology*, 117: 847-856, 2012. (査読有)
14. Saeki N, Saito A, Choi JI, Matsuno K, Ohnami S, Totsuka H, Chiku S, Kuchiba A, Lee Y-S, Yoon K-A, Kook M-C, Park SR, Kim Y-W, Tanaka H, Tajima K, Hirose H, Tanioka F, Matsuno Y, Sugimura H, Kato S, Nakamura T, Nishina T, Yasui W, Aoyagi K, Sasaki H, Yanagihara K, Katai H, Shimoda T, Yoshida T, Nakamura Y, Hirohashi S, Sakamoto H. Chromosome 1q22 is a susceptibility locus of diffuse-type gastric cancer, harboring a functional SNP of MUC1. *Gastroenterology*, 140: 892-902, 2011. (査読有)
15. Aoyagi K, Minashi K, Igaki H, Tachimori Y, Nishimura T, Hokamura N, Ashida A, Daiko H, Ochiai A, Muto M, Ohtsu A, Yoshida T, Sasaki H. Artificially induced epithelial-mesenchymal transition in surgical subjects: its implications in clinical and basic cancer research. *PLoS One*, 6(4):e18196, 2011. (査読有)
16. Sakamoto N, Oue N, Sentani K, Anami K, Uraoka N, Naito Y, Oo HZ, Ohdan H,

Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W. Liver-intestine cadherin induction by epidermal growth factor receptor is associated with intestinal differentiation of gastric cancer. *Cancer Sci.*, 103:1744-1750, 2012. (査読有)

17. Naito Y, Oue N, Hinoi T, Sakamoto N, Sentani K, Ohdan H, Yanagihara K, Sasaki H, Yasui W. RegIV is a direct target of intestinal transcription factor CDX2 in gastric cancer *PLoS One*, 7: e47545, 2012. (査読有)

[学会発表](計 23 件) 胃がん研究のみ

1. Shihori Tanabe, Kazuhiko Aoyagi, Hiroshi Yokozaki, Hiroki Sasaki. Gene combination regulated in stem cells and gastric cancer cells. Ninth AACR-JCA Joint Conference, 2013.
2. 芦川真帆、鈴木雅美、成田年、長谷川実奈美、鈴木勉、的場元弘、佐々木博己、上園保仁、癌性腹膜炎疼痛モデルマウスの脊髄における μ -opioid受容体およびサブスタンスPの発現変化、第 85 回日本薬理学会年会、2012.
3. 田邊思帆里、青柳一彦、横崎宏、佐々木博己、胃がん細胞と間葉系幹細胞において発現変化する遺伝子群、第 133 回日本薬学会、2013.
4. 田邊思帆里、青柳一彦、横崎宏、佐々木博己、胃がん細胞と間葉系幹細胞の遺伝子発現変動解析による細胞の性質判定マーカーの同定、第 40 回日本毒性学会、2013.
5. 鈴木雅美、千脇史子、澤田祐美、成田年、鈴木勉、長瀬博、上園保仁、佐々木博己、オピオイド増殖因子シグナル阻害によるドセタキセルの抗腫瘍作用の増強効果、第 33 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、2013.
6. 鈴木雅美、千脇史子、澤田祐美、柳原吾吉、中釜斉、上園保仁、佐々木博己、オピオイド増殖因子シグナルの阻害は細胞周期のRecyclingによって胃癌細胞へのドセタキセルの抗腫瘍効果を増強する、第 72 回日本癌学会、2013.
7. 仙谷和弘、大上直秀、内藤寛、坂本直也、Htoo Zarni Oo、浦岡直礼、青柳一彦、佐々木博己、安井弥、腸型粘液形質胃癌で多く発現する Hoxa10 は予後良好因子である、第 72 回日本癌学会、2013.
8. 千脇史子、鈴木雅美、澤田祐美、浜口哲弥、山田康秀、島田安博、柳原五吉、坂本裕美、松崎圭祐、上園保仁、吉田輝彦、佐々木博己、マウス腹膜中皮細胞とヒト未分化型胃がん細胞の異種間細胞相互作用系の評価、第 72 回日本癌学会、2013.
9. Naoya Sakamoto, Yutaka Naito, Naohide Oue, Kazuhiro Sentani, Naohiro Uraoka,

Htoo Zarni Oo, Kazuyoshi Yanagihara, Kazuhiko Aoyagi, Hiroki Sasaki, Wataru Yasui. MiR-148a, down-regulated in gastric cancer, targets MMP7 and participates in tumor invasion and poor prognosis. The 11th ICGC, 2013.

10. Takeshi Fujita, Fumiko Chiwaki, Ryo-u Takahashi, Kazuyoshi Yanagihara, Kazuhiko Aoyagi, Hiromi Sakamoto, Takeo Fukagawa, Hitoshi Katai, Takahiro Ochiya, Manabu Ohta, Kinji Kamiya, Hiroyuki Konno, Teruhiko Yoshida, Hiroki Sasaki. Transforming growth factor- β enhances the effect of docetaxel via inducing asymmetric cell division of CXCR4⁺ gastric cancer stem cells in a dormant state. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, 2013.
11. Hiromi Sakamoto, Norihisa Saeki, Hidemi Itoh, Keitaro Matsuo, Hidetaka Yamada, Haruhiko Sugimura, Hitoshi Ichikawa, Hiroki Sasaki, Teruhiko Yoshida. Towards the genetics and genomics of diffuse gastric cancer. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, 2013.
12. 藤田剛、青柳一彦、柳原五吉、佐々木博己、今野弘之、びまん性胃癌で特異的に発現するプロテアーゼの探索、第 17 回日本病態プロテアーゼ学会、2012.
13. 藤田剛、高橋陵宇、千脇史子、柳原五吉、青柳一彦、坂本裕美、深川剛生、片井均、落谷孝広、今野弘之、吉田輝彦、佐々木博己、腹膜播種におけるびまん性胃癌幹細胞に対する TGF- β の二元的機能、第 71 回日本癌学会、ワークショップ、2012.
14. 千脇史子、浜口哲弥、山田康秀、島田安博、柳原五吉、坂本裕美、吉田輝彦、佐々木博己、未分化胃がん患者腹水からの新規 34 がん細胞株および 2 マウス中皮細胞株の樹立、第 71 回日本癌学会、2012.
15. 松本和子、荒尾徳三、浜口哲弥、島田安博、加藤健、小田一郎、谷口浩和、小泉史明、柳原五吉、佐々木博己、西尾和人、山田康秀、胃がんにおける FGFR2 遺伝子増幅の検討、第 71 回日本癌学会、ワークショップ、2012.
16. 市川寛、神田達夫、谷口浩和、畠山勝義、佐々木博己、近藤格、胃がんリンパ節転移に関わるタンパク質の同定、第 71 回日本癌学会、2012.
17. 佐々木博己、体外診断薬としての発現解析型 DNA チップ、第 32 回日本分子腫瘍マーカー研究会、特別企画、2012.
18. Sasaki H. Subtyping and recurrence/prognosis prediction of gastric and esophageal cancers by the use of DNA chip. The 9th Annual Meeting

of JSMO, 2011.

19. Mori K, Sato Y, Kitayama J, Kaizaki S, Ishigami H, Yamaguchi H, Shimizu N, Nomura S, Wada I, Yokota H, Kageyama Y, Sasaki H, Uozaki M, Fukayama M, Yatomi Y, Takai D, Seto M. Multi-marker based RT-PCR for peritoneal cytology of gastric cancer. The 9th IGCC(Korea), 2011
20. 藤田剛、高橋陵宇、千脇史子、柳原五吉、青柳一彦、坂本裕美、深川剛生、片井均、落谷孝広、今野弘之、吉田輝彦、佐々木博己、びまん性胃癌における癌幹細胞の同定とその特性、第70回日本癌学会、ワークショップ、2011.
21. 田邊思帆里、佐々木博己、青柳一彦、横崎宏、鈴木孝昌、マイクロアレイによる幹細胞及びがん細胞の発現遺伝子解析、第70回日本癌学会、2011.
22. 坂本裕美、佐伯宣久、齋藤聡、松尾恵太郎、佐々木博己、大浪澄子、小野弘恵、片井均、梶村春彦、吉田輝彦、胃がんのゲノム網羅的遺伝素因の探索、第70回日本癌学会、シンポジウム、2011.
23. 吉田輝彦、佐伯宣久、齋藤聡、松尾恵太郎、佐々木博己、大浪澄子、小野弘恵、坂本裕美、片井均、胃がんのゲノム網羅的関連解析、第70回日本癌学会、シンポジウム、2011.

〔図書〕(計4件)

1. Saeki N, Sasaki H. Gasdermin superfamily: a novel gene family functioning in epithelial cells. In Endothelium and Epithelium: Composition and Functions. Carrasco J and Mota M (edits) Nova Science (2012)
2. 佐々木博己、五十畑則之、西村公男、玉置将司、小松崎理絵、千脇史子、青柳一彦、EMT と食道扁平上皮癌、Surgery Frontier 19: 51-55 (2012)
3. 深川剛生、阪真、三森功士、佐々木博己、森田信司、石田道拓、片井均、胃がんの予後予測因子、総合臨床、60: 461-463 (2011)
4. 佐々木博己、西村公男、小松崎理絵、千脇史子、青柳一彦、山田康秀、がん幹細胞を標的とした Hedgehog シグナル阻害薬、Mebio 28: 7-15 (2011).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 博己 (SASAKI, Hiroki)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：60235265

(2) 研究分担者

佐伯 宣久 (SAEKI, Norihisa)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：80466200

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：