

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591947

研究課題名(和文) 未分化型胃癌に対する低酸素誘導エピジェネティック分子を標的とした治療モデルの確立

研究課題名(英文) Molecular target therapy induced by hypoxia for scirrhous gastric cancer.

## 研究代表者

古賀 靖大 (Koga, Yasuo)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：30555090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、スキルス胃癌の腹膜播種形成における低酸素誘導因子(HIF-1)発現の意義について検討した。スキルス胃癌細胞のHIF-1発現を完全欠失させたknockdown (ND)株の同所性移植モデルにおいて、KD群の胃腫瘍形成は86.7%と高率であったが、腹水産生および腹膜播種は低率であった。胃腫瘍内のリンパ管の個数・外径および新生血管は少なく、腹腔内接種モデルでは播種結節個数が有意に多かった。これらの結果により、胃癌腹膜播種の形成機序が従来の腹腔内直接散布説ではなく、胃癌原発巣に誘導されるHIF-1依存的な血管・リンパ管侵襲を介した遠隔転移である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study was to clarify the role of hypoxia inducible factor (HIF)-1 in the development of peritoneal dissemination of gastric cancer. HIF-1 knockdown (KD) cells were established in the scirrhous gastric cancer cell line 58As9. Using KD and control (SC) cells, the presence of peritoneal dissemination was assessed in orthotopic implantation (o.i.) and intraperitoneal injection (i.p.) models. In the o.i. model, peritoneal dissemination was more frequently observed in the SC mice compared to the KD mice. In the i.p. model, a greater number of disseminated nodules was observed in the KD mice. Angiogenesis and vascular invasion were more aggressive in the SC gastric tumors. We provide a possible mechanism in which peritoneal dissemination of gastric cancer develops via a vascular network whereby HIF-1 activates tumor angiogenesis.

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 腹膜播種 低酸素

1. 研究開始当初の背景

未分化型胃癌は高率に腹膜播種へと進展し、手術不能となるばかりでなく抗癌剤にも抵抗性を示す。出願者らはこれまでに胃癌細胞において低酸素誘導因子(HIF-1)発現が胃癌細胞において癌浸潤能亢進に重要であることを報告してきた。

2. 研究の目的

スキルス胃癌の腹膜播種形成におけるHIF-1発現の意義について検討する。

3. 研究の方法

腹膜播種形成能を有するスキルス胃癌細胞株 HIF-1 発現を完全欠失させた knockdown 株 (KD) および control 株 (SC) を樹立した。in vitro にて増殖能、浸潤能、anoikis 耐性を比較解析した。マウス胃壁に同所性移植し、腹膜播種形成・腹水産生能を解析した。免疫染色にて胃腫瘍の新生脈管評価を行った。一方、腹腔内直接接種モデルでの播種形成能を同所性移植モデルと比較した。

4. 研究成果

SC は KD に比し in vitro 増殖能・浸潤能が有意に高かった。逆に anoikis 解析では、KD が SC に比し有意に耐性を示した。同所性移植において SC 群 (n=15) は全例に胃腫瘍形成、14/15 例に腹水産生・腹膜播種形成を認めた。KD 群の胃腫瘍形成は 86.7% と高率であったが、腹水産生および腹膜播種は低率であった。胃腫瘍内のリンパ管の個数・外径および新生血管 MVD は SC 群が KD 群に比し有意に高値を示した。腹腔内接種モデルでは、両群ともに高率に播種形成・腹水産生を認めたが、播種結節個数は KD 群が SC 群に比し有意に多数であった。これらの結果により、同所性移植 (自然転移) モデルにおいて、HIF-1 発現はスキルス胃癌の腹膜播種形成に重要な因子であることが示唆された。一方、腹腔内接種モデルにおいて HIF-1 発現は腹膜播種形成に影響せず、従来の原発巣から腹腔内への癌散布とは異なる腹膜播種機序が示唆された。また、Anoikis 解析結果もマウスモデルでの差異を示唆した。HIF-1 は原発巣の新生脈管を増性させることより、胃癌腹膜播種が新生脈管を介した腹膜転移である可能性が推測された。

さらに、ヒト胃癌細胞 58A9 より分泌される液性因子によりマウス胃壁内の脈管系幹細胞 (VSC) が de novo 分化 (vasculogenesis) する機序を想定し、以下の研究を行った。まずマウス embryonic stem (ES) 細胞 EB3 を中胚葉に分化させた後、胃癌細胞株 58As9 の培養上清およびコントロール (medium のみ)

を添加し、経時的に形態学的変化および血管・リンパ管内皮細胞マーカー遺伝子の発現変化につき解析した。その結果、58As9 上清添加では control に比し、10 日目過ぎから、EB3 とは形態が明らかに異なる扁平 colony が多数形成された (図 1)。遺伝子発現解析では、血管分化初期マーカーである PECAM1, CD34 が有意に発現上昇した (図 2)。分化後期マーカー VE-カドヘリンには有意な上昇は認めなかった。リンパ管内皮分化初期マーカーである VEGFR3, Prox1 も有意な上昇を認めた (図 3)。

さらに驚くべきことには、マウス ES 細胞の未分化状態維持に必須な LIF 因子が除去された状況にもかかわらず、ES 細胞の未分化マーカーである OCT3/4, Nanog 発現が上清添加後再上昇することが明らかとなった (図 4)。尚、常酸素と低酸素で調整した上清間に明らかな誘導能の違いは見られず、HIF-1 $\alpha$  は脈管新生ではなく脈管侵襲ステップに関与することが推測された。以上より、58As9 細胞はマウス中胚葉細胞を脈管系 (血管・リンパ管) 幹細胞にリプログラミングする何らかの液性因子を分泌している可能性が推測された。

図1 EB3 (ES細胞)の58As9細胞上清添加後の形態変化



EB3細胞をコラーゲンIVで培養後VEGF2抗体カラムでcell sortし、medium (control)および58As9上清を添加し、day20まで継代培養した。

図2 培養上清添加後の血管内皮細胞マーカーの発現 (RT-qPCR)

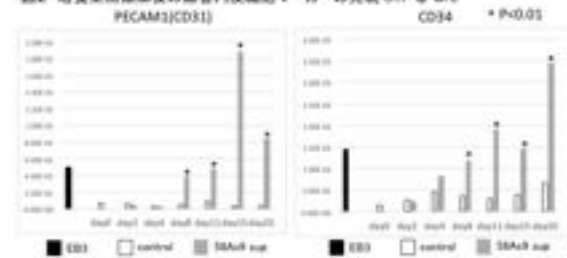


図3 培養上清添加後のリンパ管内皮細胞マーカーの発現 (RT-qPCR)

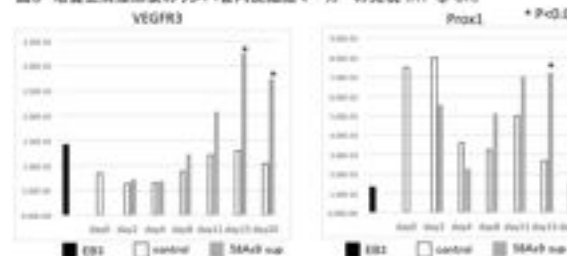
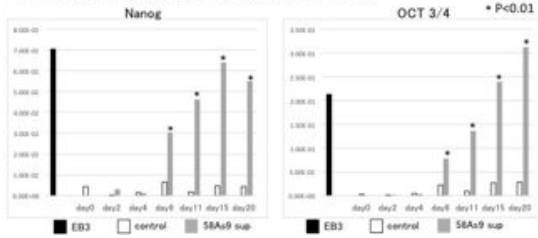


図4 培養上清添加後の未分化マーカーの再発現 (RT-qPCR)



## 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. Miyake S, Kitajima Y, Nakamura J, Kai K, Yanagihara K, Tanaka T, Hiraki M, Miyazaki K, Noshiro H.

HIF-1 is a crucial factor in the development of peritoneal dissemination via natural metastatic routes in scirrhous gastric cancer. International Journal of Oncology, 43, 1431-1440, 2013

査読有り

2. Tanaka T, Nakamura J, Kitajima Y, Kai K, Miyake S, Hiraki M, Ide T, koga y, Noshiro H.

Loss of trefoil factor 1 is regulated by DNA methylation and is an independent predictive factor for poor survival in advanced gastric cancer. International Journal of Oncology, 42, 3 894-902, 2013

査読有り

〔学会発表〕(計 5件)

1. 久保洋、北島吉彦、中村淳、甲斐敬太、三宅修輔、柳原五吉、森戸清人、田中智和、井手貴雄、古賀靖大、能城浩和

胃癌における ANGPTL4 の発現解析と HIF-1 との関連性  
第 113 回日本外科学会定期学術集会  
2013.4.13 福岡

2. 三宅修輔、北島吉彦、中村淳、柳原五吉、田中智和、馬場耕一、志田雅明、井手貴雄、古賀靖大、宮崎耕治、能城浩和

隔転移である

第 24 回日本消化器癌発生学会総会  
2013.09.06 金沢

3. 田中智和、北島吉彦、三宅修輔、柳原五吉、馬場耕一、志田雅明、中村淳、井手貴雄、古賀靖大、宮崎耕治、能城浩和

Warburg 効果をターゲットとした新たな胃癌薬物治療の可能性  
第 72 回日本癌学会学術総会  
2013.10.3-5 横浜

4. 三宅修輔、北島吉彦、中村淳、甲斐敬太、柳原五吉、田中智和、馬場耕一、志田雅明、井手貴雄、古賀靖大、宮崎耕治、能城浩和

スキルス胃癌の腹膜播種は HIF-1 により活性化されるリンパ管新生を介した遠隔転移である

第 72 回日本癌学会学術総会  
2013.10.3-5 横浜

5. 馬場耕一、北島吉彦、三宅修輔、中村淳、柳原五吉、田中智和、池田貯、能城浩和

ANGPTL4 と LOXL2 はスキルス胃癌腹膜転移の発生における候補遺伝子の可能性がある

第 73 回日本癌学会学術総会  
2014.9.25-27 横浜

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)  
なし

取得状況 (計 0件)  
なし

〔その他〕

ホームページ等  
特記事項なし。

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

古賀靖大 (KOGA, Yasuo)  
佐賀大学医学部医学科・助教  
研究者番号 : 30555090

### (2)研究分担者

中村 淳 (NAKAMURA Jun)  
佐賀大学医学部医学科・助教  
研究者番号 : 60404175

### (3)連携研究者

北島吉彦 (KITAJIMA, Yoshihiko)  
佐賀大学医学部医学科・助教  
研究者番号 : 30234256

### (4)連携研究者

三宅修輔 (MIYAKE Shusuke)  
佐賀大学医学部医学科・助教  
研究者番号 : 70726893