

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460941

研究課題名(和文) 胃癌細胞の生存・増殖・浸潤・脂肪滴沈着における脂肪組織の役割とその制御機構

研究課題名(英文) Roles and regulation of adipose tissue in the survival, growth, invasion and lipid droplet deposition of gastric cancer cells

研究代表者

戸田 修二 (Shuji, Toda)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80188755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌の発症と内臓、皮下脂肪組織の増加を基盤とする肥満との関連が示唆されている。胃癌は粘膜内で発生し、粘膜下層、筋層、漿膜下層へと浸潤し、癌性腹膜炎に進展する。一方、胃粘膜下層、漿膜下層、腹腔内には脂肪組織が存在する。さらに、脂肪組織由来脂質が癌細胞に脂肪滴として取り込まれ、癌細胞の細胞動態に影響することが示唆されている。それ故に、脂肪組織が胃癌の細胞動態に活発に影響していると予想される。しかし、内臓及び皮下脂肪組織が胃癌細胞に与える影響を解析した研究は国内外にはなく、その詳細は不明である。本研究では、胃癌細胞の生存、増殖、浸潤、脂肪滴沈着における脂肪組織の役割とその制御機構を解明する。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue is suggested to be associated with the pathogenesis of gastric cancer. The cancer cells generated in the mucosa infiltrate into submucosa, muscular layer and subserosa, and they results in cancer peritonitis. On the other hand, adipose tissue abundantly exists in the submucosa, subserosa and intraabdominal space. In general, lipid derived from adipose tissue is suggested to actively influence cancer cell behavior. Thus, adipose tissue is expected to actively affect the behavior. However, adipose tissue-cancer interaction remains to be elucidated. Here, we studied the interaction and mechanisms.

研究分野：実験病理学

キーワード：胃癌 脂肪組織 脂肪滴 アポトーシス 増殖 浸潤 アディポカイン 培養モデル

1. 研究開始当初の背景

胃癌は、日本人に最も多い癌であり、癌死の上位に位置する(男性、2位;女性、3位)。近年、胃癌、大腸癌、乳癌などの種々の癌の発症リスクと内臓、皮下脂肪組織の増加を基盤とする肥満との関連が疫学的に示唆されている(Eur J Cancer 45:2867-73, 2009; Lancet 371:569-78, 2008)。しかし、脂肪組織が胃癌にどのような影響を与えているか、その詳細は不明である。一般に、胃癌は粘膜内で発生し、粘膜下層 → 筋層 漿膜下層へと浸潤し、癌性腹膜炎に進展する。一方、粘膜下層、漿膜下層、腹腔内には豊富な脂肪組織が存在する。それ故に、脂肪組織が胃癌細胞の生存、増殖、浸潤、転移に活発に影響していると予想される。しかし、脂肪組織が胃癌細胞に与える直接的な影響を解析した研究は国内外にはなく、その詳細は不明である。

これまで、脂肪組織を培養することは困難であった。我々は初めて脂肪組織の器官培養系を確立し、脂肪組織の長期維持、脂肪酸、アディポカイン産生を見出した(Toda et al. Endocrinology 149:4794-98, 2008)。さらに、尿細管上皮や心筋細胞、肝細胞 - 脂肪組織解析モデルを考案し、脂肪組織が尿細管上皮の機能分化、グリコーゲン産生を促進し、細胞死を抑制すること(Toda et al. Kidney Int 78:60-8, 2010)や、心筋細胞、肝細胞に脂肪滴沈着・細胞死促進、分化抑制(脂肪毒性)を誘導することを見出した(Toda et al. Endocrinology 152:1599-605, 2011; Toda et al. Cell Tissue Res 352:611-21, 2013)。以上により、脂肪組織が胃癌細胞に与える直接的な影響を解析することが初めて可能となった。

癌 - 間質相互作用は癌生物学の中心課題の一つであり(Cancer Biol Ther 11:150-6, 2011)。我々の予備実験でも、間質組織としての内臓脂肪組織が、MKN7胃癌細胞の肥大・増殖を高度に促進するが、その詳細は不明である。また、皮下脂肪組織の胃癌細胞に与える影響も不明である。さらに、最近、脂肪組織由来の脂肪酸が乳癌、前立腺癌、卵巣癌などの癌細胞に脂肪滴として取り込まれ、エネルギー源や情報伝達脂質として、癌細胞の増殖・浸潤・転移に関与することが示唆されている(Biochim Biophys Acta 1831:1499-508 & 1509-517, 2013; Nat Med 17:1498-503, 2011)。しかし、胃癌での研究は国内外にはなく、その詳細は不明である。以上の背景に基づいて、胃癌細胞の生存、増殖、浸潤、脂肪滴沈着における脂肪組織の役割とその制御機構を解明する本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発した胃癌細胞 - 脂肪組織(内臓、皮下)解析モデル(図3)を用いて、以下の点を明らかにする。**1)**上記2種類の脂肪組織が、胃癌細胞のアポトー

シス、増殖、浸潤、脂肪滴沈着に与える影響とその相違を解明する。**2)**上記1)の現象を仲介する分子基盤を解明する。標的分子として、アディポカイン、脂肪酸、脂肪酸輸送・合成分子、脂肪滴形成・輸送分子(Perilipin-1, 2, 3)、アディポソーム(Adiposome)、酸化ストレス・小胞体ストレス分子、細胞内情報伝達分子を解析し、脂肪組織誘導性の胃癌の細胞動態制御因子を明らかにする。

3. 研究の方法

1)材料(戸田担当): □胃癌細胞:MKN7(ヒト高分化腺癌細胞株)、MKN45(ヒト低分化腺癌細胞株)、BV9(ラット腺癌細胞株)及び手術材料の胃腺癌より単離した癌細胞(学内倫理委員会の認可症例)を用いる。□脂肪組織:6,12週齢マウス、ラット及びヒト(剖検例や手術症例、学内倫理委員会の認可症例)の内臓、皮下脂肪組織を細切した脂肪組織片を用いる(戸田の文献2-3, 10-11, 18, 21-23, 29)。

2)培養システム(戸田担当):胃癌細胞 - 脂肪組織解析モデルを用いる(図3、戸田の文献2, 3, 18, 21, 29を基盤に考案した)。外皿に、0.5-1 mm径に細切した脂肪組織片(0.5 ml)を5 mlのI型コラーゲン・ゲル内に包埋し、1日間培養する。同時に、底面がニトロセルロース膜から成る内皿に1 mlのコラーゲン・ゲル層を作製し、そのゲル層上に癌細胞(10万個)を播種し、1日間培養する。その後、内皿を外皿に入れて培養する。対照は、癌細胞、脂肪組織片の単独培養である。脂肪組織が癌細胞に与える影響の特異性を検証するために、外皿に線維芽細胞(3T3細胞株、手術例、剖検例より単離した線維芽細胞)を培養した系で、内皿に癌細胞を培養する。培養1, 2, 3週で、癌細胞 - 脂肪組織解析モデルで再現された現象を、ホルマリン及びグルタルアルデヒド固定切片、細胞から抽出した蛋白、遺伝子と細胞培養液を用いて、以下のように解析する。

3)癌細胞の形態、生存、増殖の解析(大谷担当):癌細胞の形態をヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色、電顕で、アポトーシスをssDNAの免疫染色で、増殖を24時間ウリジン(BrdU)摂取率で、比較検討する。以上により、内臓、皮下脂肪組織が胃癌細胞の形態、生存、増殖に与える影響とその相違を解明する。

4)癌細胞のゲル内遊走、浸潤の解析(坂田担当):本解析モデルで、癌細胞のゲル内への遊走や浸潤をH&E染色で形態的に検討する。さらに、遊走関連分子(filamin A, laminin-5, E-cadherinなど)や浸潤関連分子(MMP-1, 2, 9など)を免疫染色、Western blot、real-time RT-PCRを用いて、解析する。以上により、内臓、皮下脂肪組織が胃癌細胞の遊走、浸潤に与える影響とその相違および分子基盤を解明する。

5) 癌細胞 - 脂肪組織相互作用関連分子の解析(戸田担当): 本研究では、脂肪組織関連分子 (Biochim Biophys Acta 1831: 1499-508, 2013) として、以下の分子を解析する。脂肪酸を細胞内に取り込む脂肪酸輸送・合成分子 (FATP-1, -4, -6, CD36; FAS) 脂肪滴形成・輸送分子 (Perilipin-1, 2, 3) 脂質情報伝達分子 (PAF, S1P, LPA) 癌と炎症に關与する脂肪細胞が分泌する機能性膜小胞であるアディポソーム[ExoELISA キット、フナコシ社製] (Metabolism 60:1021-37, 2011) 脂肪酸刺激に伴うストレス応答としてセラミドの発現や酸化ストレス分子 (酸化ストレスマーカー: 8-OHdG, 4-HNE; 酸化ストレスシグナル: NF- κ B, ERK-1/2, p38; 酸化ストレス防御因子: SOD) 小胞体ストレス分子 (アポトーシス促進シグナル: IRE1 α , JNK; 小胞体ストレス防御シグナル: PERK, eIF2 α , ATF6 α , β) の発現を、免疫組織化学、ELISA、Western blot、real-time RT-PCR で比較検討する。さらに、肥満と関連する癌の情報伝達分子 (Obes Res 12: 1063-70, 2011) である MAPK, STAT3 pathway, IGF-1/PI3K/ AKT/mTOR/AMPK pathway, COX-2, HER2 (分子標的療法) の発現を同様に比較検討する。また、癌細胞の脂肪滴沈着の有無をオイルレッド O 染色と透過電顕を用いて検討する。以上により、内臓、皮下脂肪組織が胃癌細胞の脂肪酸輸送/合成・脂肪滴形成/輸送・アディポソーム・酸化ストレス・小胞体ストレス分子、情報伝達分子の発現、脂肪滴沈着に与える影響とその相違を明らかにする。

6) 脂肪組織のアディポカイン・脂肪酸産生の解析(戸田担当): 培養液中のアディポカイン (leptin, adiponectin, nesfatin-1, visfatin, resistin, TNF- α , PAI-1, IGF-1 など) を ELISA キットで (戸田の文献 3, 18, 21) 脂肪酸 (パルミチン酸、リノール酸、オレイン酸、アラキドン酸、DHA、EPA など) [Clin Sci 112:27-42, 2007; 戸田の文献 3] を酵素法 (SRL 社に外注) で測定する。以上により、内臓、皮下脂肪組織のアディポカイン・脂肪酸産生能の相違を比較検討し、脂肪組織が胃癌細胞に与える影響に關与するアディポカイン、脂肪酸を明らかにする。

以上により、胃癌細胞の生存、増殖、浸潤、脂肪滴沈着における内臓、皮下脂肪組織の影響とその相違や制御機構を解明する。正常脂肪組織で影響が見られない場合は、肥満モデル動物の病的脂肪組織を使用する。また、今回の培養系は癌細胞と脂肪組織の細胞接触のない条件で解析しているので、細胞接触のある混合培養系を用いる。

4. 研究成果

1. 皮下、内臓脂肪組織は、胃癌細胞の脂肪滴沈着、増殖を促進する。

2. 上記 2 種類の脂肪組織は、胃癌細胞の

アポトーシスを抑制する。

3. 上記 2 種類の脂肪組織は、胃癌細胞のゲル内浸潤を促進する。

4. 上記 2 種類の脂肪組織は、分子標的療法に使用される HER-2 分子発現を抑制し、胃癌の HER2 治療抵抗性に關与していることが示唆される。

5. 上記現象では、IGF-1/IR pathway や MAPK pathway 關与することが示唆される。

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 19 件)

1. Aoki S, Sakata Y, Shimoda R, Takezawa T, Oshikata-Miyazaki A, Kimura H, Yamamoto M, Iwakiri R, Fujimoto K, Toda S. High-density collagen patch prevents stricture after endoscopic circumferential submucosal dissection of the esophagus: a porcine model. *Gastrointest Endosc.* 2016 Oct 14. pii: S0016-5107(16)30669-1. doi: 10.1016/j.gie.2016.10.012. PubMed PMID: 27751874.

2. Nakayama A, Toda S (他 7 名、最終). Interaction between Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Adipose Tissue in Vitro. *Am J Pathol.* 186:1180-94, 2016

3. Aoki S, Takezawa T, Sugihara H, Toda S. Progress in cell culture systems for pathological research. *Pathol Int.* 66:554-562, 2016

4. Kawasaki-Nanri M, Toda S (他 8 名、最終). Differential effects of adipose tissue stromal cells on the apoptosis, growth and invasion of bladder urothelial carcinoma between the superficial and invasive types. *Int J Urol.* 23:510-9, 2016 査読あり

5. Rumbajan JM, Toda S (他 13 名 9 番目). The HUS1B promoter is hypomethylated in the placentas of low-birth-weight infants. *Gene.* 583:141-6, 2016

6. Yamamoto M, Uchihashi K, Aoki S, Koike E, Kakiyama N, Toda S. Interaction between thymocytes and adipose tissue in vitro. *Pathol Int.* 66:148-57, 2016

7. Aoki S, Noguchi M, Takezawa T, Ikeda S, Uchihashi K, Kuroyama H, Chimuro T, Toda S. Fluid dwell impact induces peritoneal fibrosis in the peritoneal cavity reconstructed in vitro. *J Artif Organs.* 19:87-96, 2016

8. Takeshita E, Sakata Y, Hara M (他 14 名 2 番目). Higher Frequency of Reflux Symptoms and Acid-Related Dyspepsia in Women than Men Regardless of Endoscopic Esophagitis: Analysis of 3,505 Japanese Subjects Undergoing Medical Health Checkups. *Digestion.* 93: 266-71, 2016

9. Fujishiro M, Iguchi M, Sakata Y (他 7 名 5 番目). Guidelines for endoscopic management of non-variceal upper gastrointestinal bleeding. *Dig Endosc.* 28: 363-78, 2016

10. Yamaguchi S, Sakata Y, Iwakiri R (他 14 名 2 番目). Increase in Endoscopic and Laparoscopic Surgery Regarding the Therapeutic Approach of Gastric Cancer Detected by Cancer Screening in

Saga Prefecture, Japan. Intern Med. 55: 1247-53, 2016.

11. Yamanouchi K, Ogata S, Sakata Y, (他 9 名 3 番目). Effect of additional surgery after noncurative endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer. Endosc Int Open. 4: E24-9, 2016

12. Watanabe T, Takeuchi T, Sakata Y. (他 11 名 4 番目), A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of high-dose rebamipide treatment for low-dose aspirin-induced moderate-to-severe small intestinal damage. PLoS One. 10(4):e0122330. doi: 10.1371/journal.pone.0122330, 2015

13. Yamaguchi D, Sakata Y, Tsuruoka N. (他 5 名 2 番目). Characteristics of patients with non-variceal upper gastrointestinal bleeding taking antithrombotic agents. Dig Endosc. 27: 30-6, 2015

14. Itoh M, Toda S (他 8 名 7 番目). Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae. PLoS One, 10, 1111-1120, 2015

15. Aoki S, Takezawa T, Ikeda S, Narisawa Y, Oshikata-Miyazaki A, Miyauchi S, Hirayama H, Sawaguchi T, Chimuro T, Toda S. A new cell-free bandage-type artificial skin for cutaneous wounds. Wound Repair Regen, 23, 819-29, 2015

16. Yasukawa S, Toda S (他 22 名 5 番目). An ITAM-Syk-CARD9 signalling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. Nat Commun. 2014 May 7;5:3755.

17. Takashima T, Toda S (他 7 名 8 番目). Feeding with olive oil attenuates inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis in rat. J Nutr Biochem. 25:186-92, 2014

18. Taniguchi K, Toda S (他 12 名 11 番目). Periostin controls keratinocyte proliferation and differentiation by interacting with the paracrine IL-1 α /IL-6 loop. J Invest Dermatol. 134:1295-304, 2014

19. Aoki S, Toda S (他 8 名, 最終). Epithelial-to-mesenchymal transition and slit function of mesothelial cells are regulated by the cross talk between mesothelial cells and endothelial cells. Am J Physiol Renal Physiol. 306:F116-22, 2014

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

戸田修二 (TODA, Shuji)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：80188755

(2) 研究分担者

大谷顕史 (OOTANI, Akifumi)
佐賀大学・医学部・研究員
研究者番号：30363443

(3) 連携研究者

坂田資尚 (SAKATA, Yasuhis)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：50404158