

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791402

研究課題名(和文) 胃癌腹膜播種の微小環境における上皮間葉転換の解明と治療標的の意義

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of Epithelial-Mesenchymal Transition in peritoneal environment of gastric cancer

研究代表者

木下 淳 (Jun, Kinoshita)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：90584855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌腹膜転移側の宿主細胞である腹膜中皮細胞(HPMC)において、TGF- β 1や胃癌細胞との共培養によるEMT(上皮間葉転換)誘導を証明した。またマウス皮下腫瘍モデルを用い、胃癌細胞とHPMCの共投与は腫瘍増殖能や間質線維化の増生に促進的に作用する事を示した。さらにBRM製剤であるPSKは非免疫学的機序である抗TGF β 作用によって、これらのEMT誘導に伴う癌間質の線維化を抑制する事を証明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the mechanism of EMT of Human Peritoneal Mesothelial Cell(HPMC) in peritoneal environment of gastric cancer. We also investigated the inhibitory effect of PSK on the TGF β /Smad signalling pathway and TGF β induced EMT in human HPMCs and gastric cancer cells. In vitro, TGF β increased the expression of E cadherin and decreased the expression of mesenchymal markers in HPMCs and which was suppressed by PSK. PSK suppressed TGF β induced phosphorylation of Smad2 in HPMCs in western blot analysis. In mouse subcutaneous xenograft models, PSK inhibited the tumor fibrosis induced by co-inoculation of gastric cancer cells and HPMCs. PSK might have the potential to reduce TGF β induced activation of HPMCs in the peritoneal microenvironment of gastric cancer.

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：胃癌 腹膜播種 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

近年、悪性腫瘍の浸潤、転移、線維化に **Epithelial-mesenchymal transition(EMT)** が重要な役割をはたしている事が明らかになった。これまで細胞運動や浸潤性における癌細胞側の EMT に関する報告は多いが、転移側のホスト細胞の EMT 誘導に関する報告はまれである。このホスト細胞の EMT 誘導も転移形成における重要な要素であり、さらには癌間質の線維化にも深く関与する事が推察される。このため腹膜転移のホスト細胞である腹膜中皮細胞 (HPMC : human peritoneal methothelial cells) と胃癌細胞との相互作用に着目する事で、腹膜転移の形成、進展にいたるメカニズム解明の新たな知見が得られると考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

腹膜転移のホスト細胞である腹膜中皮細胞 (HPMC : human peritoneal methothelial cells) に着目し、胃癌細胞との相互作用における EMT 誘導と、転移、線維化の進展との関連性を検討する事を目的として本研究を立案した。さらに代表的な **Biological Response Modifier(BRM)** 製剤のひとつである PSK の抗 TGF- β (Transforming growth factor- β) 作用に着目し、EMT および線維化の抑制効果を検証した。

3. 研究の方法

- (1) 術中に採取した大網から HPMC を分離培養した。HPMC に TGF- β 1 を添加し、位相差顕微鏡にて形態学的評価を行った。
- (2) TGF- β 1 添加による HPMC の上皮系・間葉系マーカー (E-cadherin, α SMA) の発現と PSK による EMT marker の発現抑制の有無を蛍光 2 重免疫染色で評価した。
- (3) 同様に TGF- β 1 添加による HPMC の上皮系・間葉系マーカー (E-cadherin, α SMA、

vimentin) の発現と PSK による EMT marker の発現抑制の有無を western blot 法で評価した。

(4) TGF- β 1 誘導の EMT シグナル伝達経路の解析として、TGF- β 1 刺激下と PSK 添加による HPMC の P-Smad2 の発現変化を western blot 法にて解析した。

(5) 最後に、ヒト胃癌細胞株 OCUM-2MD3 または OCUM-2MD3 + HPMC のマウス皮下播種モデルの作成し、PSK 含有固形飼料投与における腫瘍増殖、線維化、EMT marker の発現変化を in vivo において検討した。

4. 研究成果

(1) 術中に採取した大網から分離培養した HPMC に TGF β 1 10ng/ml を添加した結果、類円型の細胞から、紡錘型細胞に形態変化し、細胞間接着も低下した。PSK の単独投与では、HPMC の細胞形態に変化は認めなかったが、TGF β 1 との共投与において、TGF β 1 刺激による形態変化を抑制した [Fig. 1]。

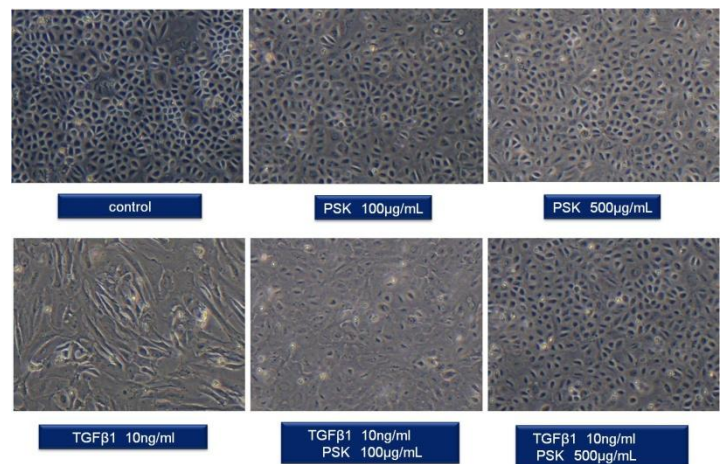


Fig.1 Morphological changes of HPMCs

(2) TGF- β 1 添加による HPMC の上皮系・間葉系マーカー (E-cadherin, α SMA) の発現と PSK による EMT marker の発現抑制の有無を蛍光 2 重免疫染色で評価した結果、control に比較して、TGF β 1 刺激により E-cadherin の発現減弱と α SMA の発現増強を認め、PSK の添加によりこの変化は抑制された [Fig. 2]

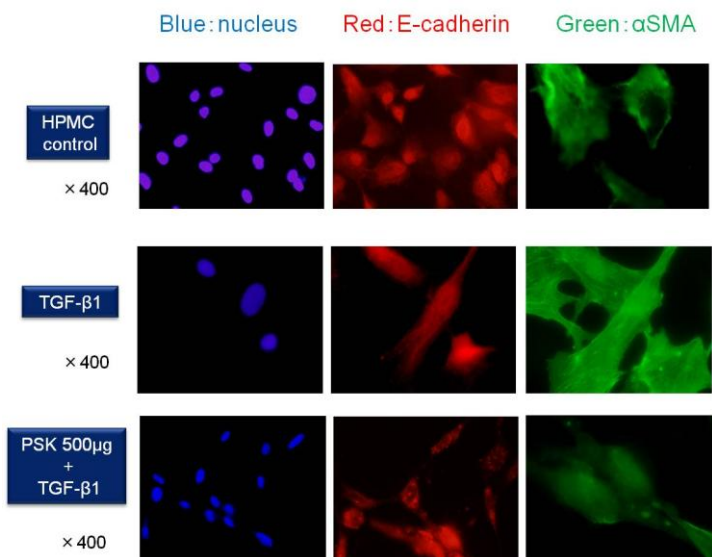


Fig.2 The expression of EMT markers in HPMC (immunofluorescence assay)

(3) 同様に western blot 法においても、TGF β 1 刺激により上皮系マーカー (E-cadherin) の発現減弱、間葉系マーカー (vimentin, α SMA) の増強を認めた [Fig. 3]。

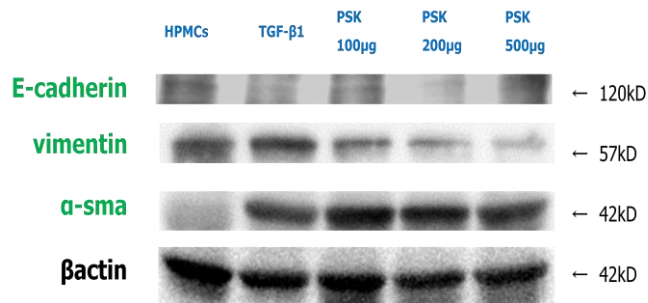


Fig.3 The expression of EMT markers in HPMC (western blot analysis)

(4) TGF β 1 刺激により、HPMC における P-Smad2 の発現が亢進し、PSK により、Smad2 のリン酸化が抑制される事を western blot 法にて確認した [Fig. 4]。

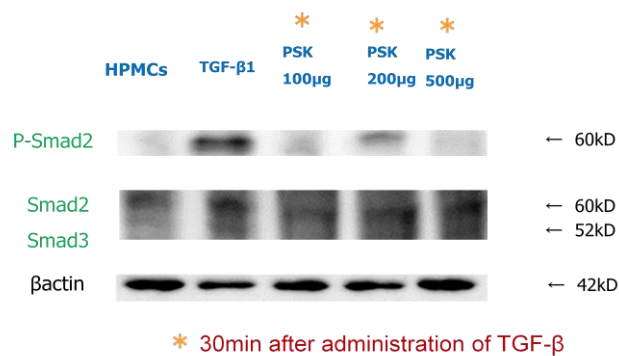


Fig.4 Effect of PSK on Smad2 phosphorylation in HPMCs

(5) マウス皮下移植モデルとして、① OCUM-2MD3 単独投与 ② OCUM-2MD3 単独投与 +PSK ③ OCUM-2MD3+HPMC 共投与 ④ OCUM-2MD3+HPMC 共投与+PSK の 4 群を作製し、皮下腫瘍容積を経時的に測定した。移植 14 日目において胃癌細胞株と HPMC の共投与群の皮下腫瘍サイズは胃癌細胞株単独投与群に比較し有意に増加したが、PSK 投与による縮小効果は明らかではなかった [Fig. 5A]。しかしながら、腫瘍間質中の線維化を Azan 染色で評価すると、HPMC の共投与により、線維間質の増生を認めたが、PSK 投与によってこの腫瘍間質の線維化は抑制されていた ($p < 0.01$) [Fig. 5B, C]。また OCUM-2MD3+HPMC の共投与群の皮下腫瘍は、OCUM-2MD3 単独投与群に比較し、上皮系マーカー (E-cadherin) の発現減弱、間葉系マーカー (Vimentin, α SMA) の発現増強を認め、PSK による EMT 抑制効果を in vivo においても証明した。

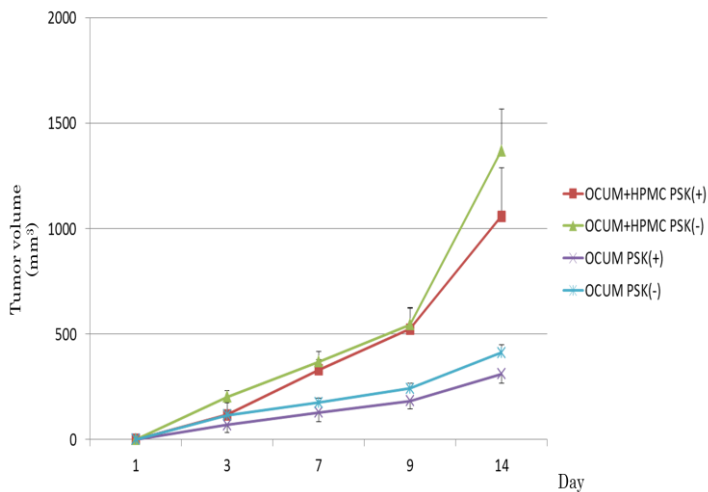


Fig.5A The transition of the volume of subcutaneous tumor

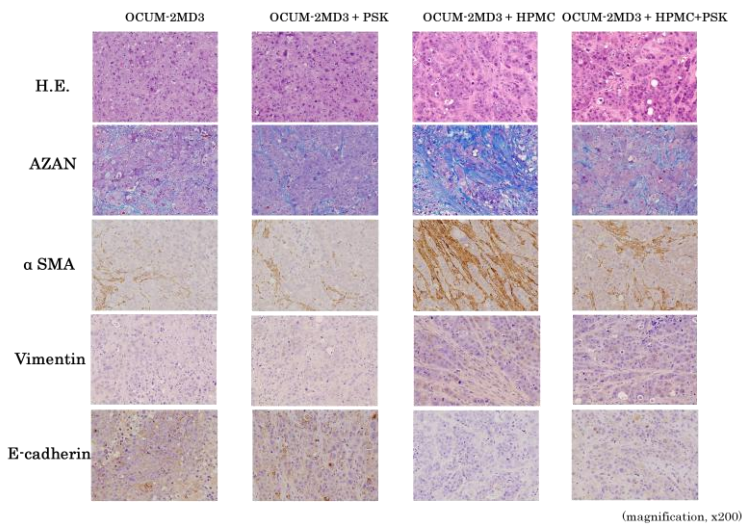


Fig.5B The expression of collagen and EMT markers in subcutaneous tumor

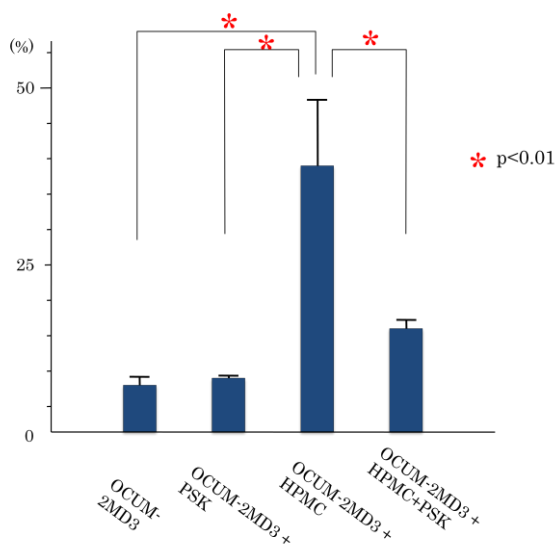


Fig.5C Quantitative analysis of the area of fibrotic tissue in AZAN staining

(6)まとめ

胃癌腹膜転移側の宿主細胞である腹膜中皮細胞においても、TGF-βによる Smad 経路を介した EMT 誘導を証明した。さらに BRM 製剤である PSK は非免疫学的機序によりこの EMT 誘導を抑制した。また、マウス皮下腫瘍モデルを用いた in vivo においても、胃癌細胞と HPMC の共投与によって、細胞間相互作用による腫瘍間質の線維化と EMT marker の発現亢進を証明し、PSK による抑制効果を確認した。腹腔内に遊離した胃癌細胞は、腹膜微小環境において腹膜中皮細胞との相互作用によって EMT を誘導し、転移形成や間質線維化を促進すると考えられる。PSK は抗 TGF-β 作用により、腫瘍間質における EMT を抑制する事で、胃癌腹膜転移に対する新たな標的治療薬となる可能性が示された。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1. 2013 年 10 月 5 日 第 72 回日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜)

Effects on TGF-β induced epithelial to mesenchymal transition in peritoneal microenvironment of gastric cancer.

木下 淳 伏田 幸夫 太田 哲生、他.

6. 研究組織

(1)研究代表者

木下 淳 (JUN KINOSHITA)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号： 90584855