

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21015

研究課題名(和文)新規微小管作用薬による胃癌腹膜播種線維化抑制についての実験的検討

研究課題名(英文)Effect of eribulin, a new microtubule dynamics inhibitor, for tumor progression and fibrosis in peritoneal dissemination of gastric cancer

研究代表者

柄田 智也(Tsukada, Tomoya)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：90642356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌腹膜播種は高度の浸潤能と線維化を伴い化学療法抵抗性を示す。今回、新規微小管重合阻害剤であるエリブリンが胃癌の進展やEMT様変化を抑制するか検討すると同時に、5FUとの併用効果についても検討した。

in vitroでは、エリブリンは低濃度で胃癌細胞株MKN45の増殖とEMT様変化を抑制し、5FUとの相乗効果を認めた。in vivoでは、マウスヒト胃癌細胞移植腫瘍(MKN45 + HPMC ヒト腹膜中皮細胞)の増殖と線維化を抑制した。以上より、エリブリンは胃癌腹膜播種の新しい治療戦略ツールとなりうる

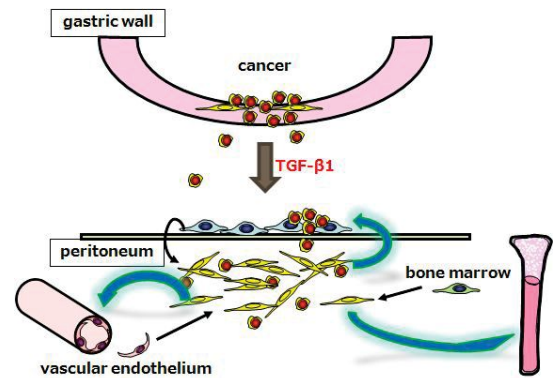
研究成果の概要(英文)：Peritoneal dissemination of gastric cancer is characterized by aggressive invasion, extensive stromal fibrosis, and resulting drug-resistant tumors. We examined whether eribulin, which is a newly microtubule dynamics inhibitor, could inhibit progression and EMT changes in gastric cancer and act synergistically with 5FU. Eribulin significantly suppressed gastric cancer cell proliferation, as well as EMT changes in MKN45 gastric cancer cells and HPMCs induced by their interaction in vitro. EMT inhibition by eribulin was observed at much lower concentrations than its IC50 and resulted, at least partly, from downregulation of TGF- $\beta$ /Smad signaling by interruption of Smad2 phosphorylation. Eribulin also suppressed tumor progression and fibrosis in a mouse fibrotic tumor xenograft model. Furthermore, its administration with 5FU brought about synergistic antitumor effects. Eribulin demonstrates the potential to be a key treatment for peritoneal dissemination of gastric cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 腹膜播種 上皮間葉転換 線維化 低濃度エリブリン TGF- $\beta$  / smad シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌腹膜播種の治療成績は1年生存率40%と極めて不良であるため、抗癌剤に対する治療抵抗性を克服するとともに腹膜播種の確立や増生にかかわる分子機構を解明し、それらを標的とした新たな治療法の確立が急務である。腹膜播種の重要な病態として腫瘍内の癌細胞は周囲に線維芽細胞やコラーゲンファイバーを誘導し、胆管や腸管および尿管の壁肥厚と内腔狭窄による閉塞性黄疸や腸閉塞、水腎症により死に至らしめる。近年、肝線維化に中心的に働く伊藤細胞が炎症細胞などから分泌される TGF- $\beta$  により活性化され細胞外マトリックス成分を増生する一方、伊藤細胞はアンジオテンシン 1 型 (AT - 1) 受容体を発現しており、アンジオテンシン が TGF- $\beta$  を介してコラーゲン産生を促進することが明らかとなり、われわれも腫瘍 (播種巣) 内で産生されるアンジオテンシン がアンジオテンシン 型受容体を介して増殖・進展に関与していることを証明し、高血圧治療薬の1種である ARB (アンジオテンシン 型受容体ブロッカー) による腹膜播種治療の可能性について報告した (Int J Oncol 2009) が、線維化にいたるメカニズムは十分解明されずにいた。すなわち、癌細胞から放出される TGF- $\beta$  によって腹膜中皮に細胞間隙を生じさせ基底膜に接着し浸潤することが知られているが、腹膜中皮細胞自体が播種巣の増生・線維化にどのように関与しているかは明らかでなかった。そこで我々は、in vitro および in vivo において腹膜中皮細胞が TGF- $\beta$  により間葉系細胞様に変化する (epitelial-mesenchymal transition: EMT) ことや癌細胞との共培養により腫瘍の増殖能を促進し、腫瘍の線維化も誘導することを証明した (Int J Oncol 2012)。



癌微小環境下における EMT の制御として、TGF シグナル阻害を介して CAF の誘導を阻害し、動物モデルでの腫瘍の線維化を免疫賦活剤であるクレスチンやアンジオテンシン 型受容体ブロッカーを用いて抑制することを報告してきた (Oncology Rep 2015, Cancer Lett 2014)。特にパクリタキセルは、抗腫瘍効果を示さない低用量において TGF シグナルをその下流の smad2/3 のリン酸化を阻害することでブロックし EMT が抑制されることを証明した (Int J Oncol 2013)。今回、非タキサン系の微小管重合阻害薬であるエリブリンが、EMT 抑制などパクリタキセルと同様な機能を有するか検討した。

## 2. 研究の目的

胃癌細胞を用いてエリブリンによる抗腫瘍活性を明らかにする。

胃癌細胞株と腹膜中皮細胞との共培養により、引き起こされる胃癌細胞株および腹膜中皮細胞の EMT 様変化をエリブリンにより抑制しうるかどうか検討する。

既存の汎用抗癌剤である 5FU との併用効果について検討する。

## 3. 研究の方法

胃癌細胞株 MKN45, MKN74, MKN7, OCUM2MD3 を用いて、エリブリンの増殖抑制効果を MTT アッセイにて検討する。

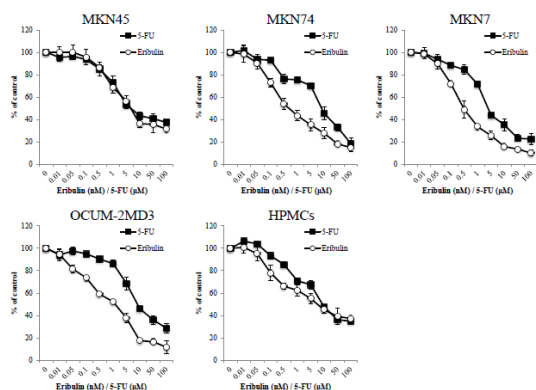
胃癌細胞株と腹膜中皮細胞との共培養による EMT 様変化を位相差顕微鏡を用いた形態的变化や免疫蛍光染色やウェスタンブロット法、invasion アッセイにて機能的変化を

検討する。

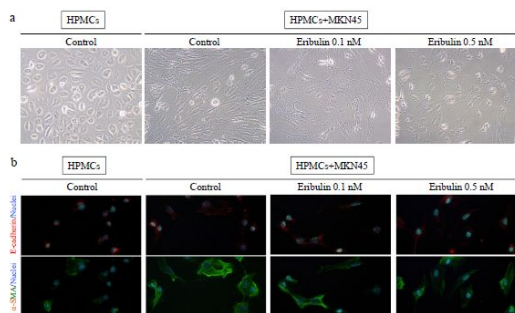
エリブリンと 5FU の併用効果につき、MTT アッセイやマウス皮下移植線維化腫瘍を用いて検討する。

#### 4. 研究成果

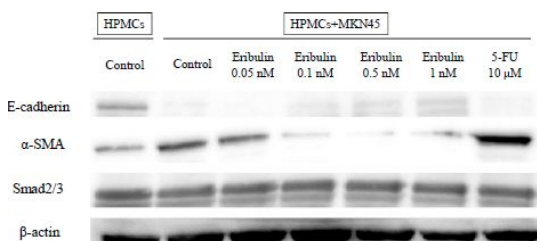
エリブリンおよび 5FU は濃度依存性に胃癌細胞株および腹膜中皮細胞の増殖を抑制した。



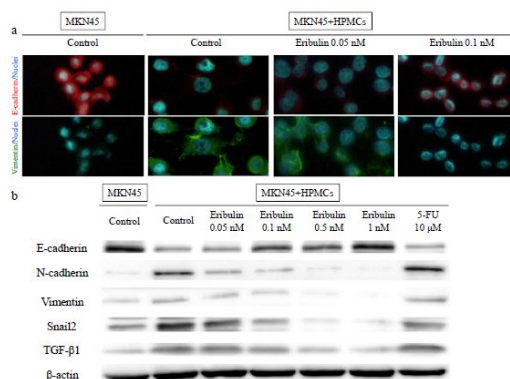
胃癌細胞株 MKN45 と腹膜中皮細胞 (HPMC) を共培養すると、HPMC は敷石様から紡錘様に形態変化を示し、蛍光免疫染色では筋線維芽細胞に特徴的な SMA を発現した。これらの変化は細胞増殖抑制をきたさない低濃度 (0.5 nM) のエリブリンで阻害された。



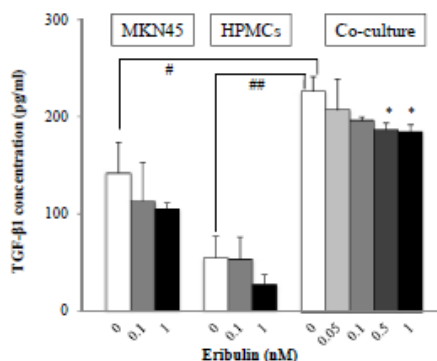
以上の低濃度エリブリンによる HPMC の EMT 様変化の阻害は下図に示す如く、ウェスタンブロットにおいても証明された。



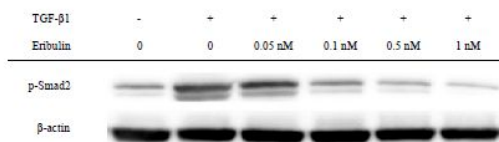
HPMC と共培養後、分離回収した MKN45 における検討では、共培養により上皮系マーカーである E カドヘリンの発現は減弱し、間葉系マーカーである Vimentin や N カドヘリン、Snail2 の発現が増強した。これらの変化は低濃度エリブリンで阻害された。



共培養による HPMC および MKN45 の一連の EMT 様変化は、それぞれ単独培養に比し、共培養における相互作用において両者の TGF の発現が亢進したことが原因と考えられた。

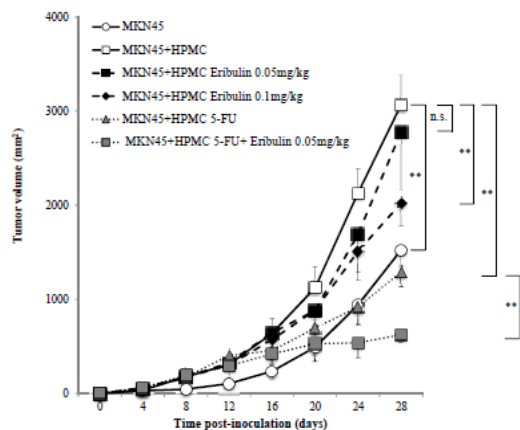


また、低濃度エリブリンによる EMT 様変化阻害作用は、エリブリン添加による TGF 発現抑制によるものでなく、TGF の下流シグナルである Smad2 のリン酸化が抑制されたためであることが明らかとなった。

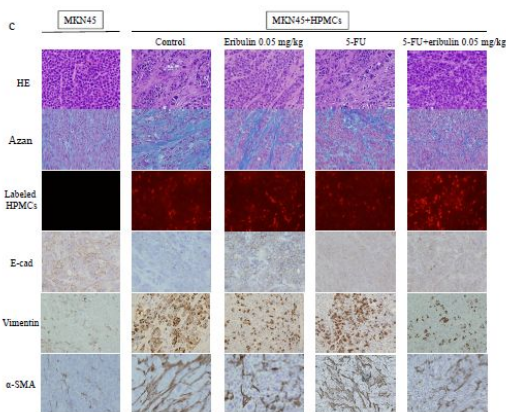


胃癌細胞株 MKN45 と腹膜中皮細胞 (HPMC) を共培養した後、ヌードマウス皮下に移植す

ると、高度の線維化を伴った腫瘍を形成する。その際に、低濃度 (0.05mg/kg) エリブリンを投与すると、腫瘍体積にはほとんど影響を与えないが、抗腫瘍効果を示す 5FU に併用すると、5FU 単独よりも有意に腫瘍体積は減少した (相乗効果)。



これらのモデルを犠牲死させ、腫瘍部分を用いて免疫組織学的に検討した。MKN45 単独移植では間質をほとんど伴わない solid type の腫瘍であったが、HPMC と共移植すると、高度な線維化 (Azan) と HPMC による SMA の高発現および MKN45 による Vimentin の抗発現を認めた。また、低濃度エリブリン投与ではこれらの変化は阻害された。一方、5FU 投与ではこれら一連の EMT 様変化は阻害されなかった。



今回の検討により、低濃度エリブリンは単独では細胞増殖を阻害しないが、TGF シグナル伝達系における Smad2 のリン酸化を抑制することで EMT 様変化を阻害し、腫瘍の浸潤能や線維化を抑制することが明らかとなった。

さらに、胃癌治療で汎用される 5FU との併用によって、その感受性を増強することも明らかとなった。

以上より、低濃度エリブリンを用いた多剤併用療法は、高度な線維化を伴った治療抵抗性のスキルス胃癌や腹膜播種の新しい治療法となりうると考えられた。

## 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 12 件)

1. Establishing a xenograft mouse model of peritoneal dissemination of gastric cancer with organ invasion and fibrosis.

Okazaki M, Fushida S, Harada S, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, Miyashita T, Ninomiya I, Ohta T.

BMC Cancer. 2017 Jan 5; 17(1):23.

2. Valproic acid inhibits irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like characteristics in esophageal squamous cell carcinoma.

Kanamoto A, Ninomiya I, Harada S, Tsukada T, Okamoto K, Nakanuma S, Sakai S, Makino I, Kinoshita J, Hayashi H, Oyama K, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Fushida S, Ohta T.

Int J Oncol. 2016 Nov; 49(5):1859-1869.

3. Metformin inhibits the radiation-induced invasive phenotype of esophageal squamous cell carcinoma.

Nakayama A, Ninomiya I, Harada S, Tsukada T, Okamoto K, Nakanuma S, Sakai S, Makino I, Kinoshita J, Hayashi H, Oyama K, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Fushida S, Ohta T.

- Int J Oncol. 2016 Nov; 49(5):1890-1898.
4. Expression status of CD44 and CD133 as a prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy followed by radical esophagectomy.  
Okamoto K, Ninomiya I, Ohbatake Y, Hirose A, Tsukada T, Nakanuma S, Sakai S, Kinoshita J, Makino I, Nakamura K, Hayashi H, Oyama K, Inokuchi M, Nakagawara H, Miyashita T, Hidehiro T, Takamura H, Fushida S, Ohta T.  
Oncol Rep. 2016 Dec; 36(6):3333-3342.
  5. Paclitaxel plus valproic acid versus paclitaxel alone as second- or third-line therapy for advanced gastric cancer: a randomized Phase II trial.  
Fushida S, Kinoshita J, Kaji M, Oyama K, Hirono Y, Tsukada T, Fujimura T, Ohta T.  
Drug Des Devel Ther. 2016 Jul 25; 10:2353-8.
  6. Effects of rabeprazole on bone metabolic disorders in a gastrectomized rat model.  
Yamasaki Y, Fujimura T, Oyama K, Higashi Y, Hirose A, Tsukada T, Okamoto K, Kinoshita J, Nakamura K, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Ninomiya I, Fushida S, Ohta T.  
Biomed Rep. 2016 Jul; 5(1):118-124.
  7. Concentration-dependent radiosensitizing effect of docetaxel in esophageal squamous cell carcinoma cells.  
Miyanaaga S, Ninomiya I, Tsukada T, Okamoto K, Harada S, Nakanuma S, Sakai S, Makino I, Kinoshita J, Hayashi H, Nakamura K, Oyama K, Nakagawara H, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Fushida S, Ohta T.  
Int J Oncol. 2016 Feb; 48(2):517-24.
  8. Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination.  
Yamaguchi T, Fushida S, Yamamoto Y, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, Miyashita T, Tajima H, Ninomiya I, Munesue S, Harashima A, Harada S, Yamamoto H, Ohta T.  
Gastric Cancer. 2016 Oct; 19(4):1052-65.
  9. Elevated alpha1-acid glycoprotein in gastric cancer patients inhibits the anticancer effects of paclitaxel, effects restored by co-administration of erythromycin.  
Ohbatake Y, Fushida S, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, Hayashi H, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Ninomiya I, Yashiro M, Hirakawa K, Ohta T. Clin Exp Med. 2016 Nov; 16(4):585-592.
  10. Inhibitory effects of valproic acid in DNA double-strand break repair after irradiation in esophageal squamous carcinoma cells.  
Makita N, Ninomiya I, Tsukada T, Okamoto K, Harada S, Nakanuma S, Sakai S, Makino I, Kinoshita J, Hayashi H, Oyama K, Nakagawara H, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Fushida S, Ohta T.  
Oncol Rep. 2015 Sep; 34(3):1185-92.
  11. Efficacy of conversion gastrectomy following docetaxel, cisplatin, and S-1 therapy in potentially resectable stage IV gastric cancer.

Kinoshita J, Fushida S, Tsukada T,  
Oyama K, Okamoto K, Makino I,  
Nakamura K, Miyashita T, Tajima H,  
Takamura H, Ninomiya I, Ohta T.  
Eur J Surg Oncol. 2015 Oct;  
41(10):1354-60

12. Randomized Phase II trial of paclitaxel  
plus valproic acid vs paclitaxel alone as  
second-line therapy for patients with  
advanced gastric cancer.

Fushida S, Kaji M, Oyama K, Hirono Y,  
Nezuka H, Takeda T, Tsukada T,  
Fujimoto D, Ohyama S, Fujimura T,  
Ohta T.

Onco Targets Ther. 2015 Apr 23; 8:939-41

〔学会発表〕(計 1 件)

1.Tsukada T, Fushida S, Kurata T,  
Kinoshita J, Oyama K, Okamoto K,  
Ninomiya I, Ohta T. Effects of eribulin  
mesilate for tumor progression and fibrosis  
in gastric cancer.

第75回日本癌学会学術集会、2016年10月6  
日～8日パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔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〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柄田智也 (TSUKADA Tomoya)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：90642356