

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：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461972

研究課題名(和文) スキルス胃癌の癌間質増生と癌性腹膜炎発症機構の本態解明

研究課題名(英文) Elucidation of essential molecular mechanism by which cancer stroma cause the development of peritoneal carcinomatosis into scirrhous gastric cancer.

研究代表者

安本 和生 (YASUMOTO, Kazuo)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90262592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌の増殖や進展における癌関連間質細胞の重要性は報告があるものの、その起源と生物活性は十分に明らかにされていない。難治性疾患の代表格であり著しい発育と癌性腹膜炎の高頻度合併を特徴とするスキルス胃癌は、間質細胞の異常な増生を特徴とする。間質の異常増生こそが本病態形成の鍵を握ると考えられる。

本研究により、スキルス胃癌病態特異的な間質特性としてHGF高産生性 -SMA+・FAP+ 活性化線維芽細胞からなることが初めて明らかとなり、スキルス胃癌細胞とHGF高産生線維芽細胞が構成する癌微小環境解明が本疾患の革新的標的治療法開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)： Cancer associated fibroblasts (CAFs) play a crucial role for tumor progression in a variety of malignancy. Activated CAFs frequently express -smooth muscle actin (SMA) and are classified as myofibroblasts. However, the role and significance of CAFs in gastric cancer progression is still unknown. We investigated the biology of CAFs in human gastric cancers, in particular scirrhous gastric cancer characterized by intense stromal fibroblasts.

We demonstrated that the CAFs in primary site of scirrhous gastric cancer are composed of HGF-producing and both SMA- and fibroblast activation protein (FAP)- expressing activated fibroblasts. Thus, targeting marked HGF production in SMA+ and FAP+ CAFs of scirrhous gastric cancer may result in a clinically effective reduction of tumor progression and dissemination.

研究分野：胃癌 癌性腹膜炎 形成機序解明 新規治療法開発

キーワード：胃癌 スキルス胃癌 癌性腹膜炎 癌間質線維芽細胞 HGF/MET axis

1. 研究開始当初の背景

スキルス胃癌は、胃癌全体の 10%を占め、スキルス胃癌細胞からなるいわゆる硬癌とも称され、高度癌間質増生による急速進展壁硬化所見を特徴とするびまん性発育浸潤胃癌である。殊に悪性腹水を伴う癌性腹膜炎を高頻度に発症することで知られ、その予後は極めて不良である(Duarte I, et al. *Human Pathol* 1981;12:237-42)。しかしながら、本病態形成の成因ならびに高頻度に合併する悪性腹水を伴う癌性腹膜炎の形成機序はいまだ十分に明らかにされていない。また、早期診断は非常に困難で、ほとんどの患者は病態が完成して初めて医療機関を受診するのが実状である。さらに根治術の適応はなく、合併する癌性腹膜炎に対する治療に止まるが、効果的な治療法は見出されておらずいまだ治療効果においても限界がある。近年、胃癌領域においてわが国主導による新たな標準療法(TS-1+CDDP療法)の確立・導入やHER2分子を標的とした分子標的治療の臨床導入がなされ、一定の効果が得られているものの、スキルス胃癌ではHER2発現頻度は低く効果は期待できない。

胃癌転移には臓器選択性があり、スキルス胃癌は腹膜転移を発症しやすい。実験的臓器選択性転移にケモカインの関与が報告され(Muller A, et al. *Nature* 2001; 410:50-6)、申請者らは、胃癌性腹膜炎形成におけるケモカインの役割について検討を開始した。興味深いことに、スキルス胃癌は選択的にCXCR4を高発現し、転移臓器である腹膜(中皮細胞にリガンドCXCL12が高発現し、癌性腹水中にも高濃度に存在)に選択的に転移増殖するというCXCR4/CXCL12 axisの胃癌臓器選択性腹膜転移への重要な関与を臨床的にも動物モデルを用いた治療実験でも明らかにした(Yasumoto K, et al. *Cancer Res* 2006; 66:2181-7)。

さらに、悪性腹水貯留が急速な病態進展をもたらすことから、腹水中増殖因子に着目した解析を行った結果、EGFRリガンドのAmphiregulin, HB-EGFが腹水中には多量に存在し、オートクリン誘導Amphiregulinは癌細胞自身を、パラクリン誘導HB-EGFは線維芽細胞を、運動能・増殖能ともに著明に活性化すること、さらにHB-EGFは、Amphiregulinの相乗的産生、CXCR4発現誘導などCXCR4/CXCL12 axisとも相互促進作用を発揮する事を明らかにした。EGFRリガンドAmphiregulin, HB-EGFは癌性腹膜炎の急速進展増悪に深く関与し、有効なバイオマーカー

となることを報告した(Yasumoto K, et al. *Clin Cancer Res* 2011“ Highlightsで紹介”)。

さらには、MET増幅のないスキルス胃癌細胞のみが腹水を伴う癌性腹膜炎を形成することをマウスへの移植実験から見出し、HGF/MET axisの悪性腹水産生を伴うスキルス胃癌癌性腹膜炎形成への関与を明らかにした。すなわち、スキルス胃癌特異的に、癌間質HGF産生誘導(パラクリン機序)ならびにHGFによる強力な増殖活性誘導を確認し、さらにMET経路阻害は、実験的腹水貯留癌性腹膜炎病態を著明に改善し大幅な予後延長をもたらす、手術不能進行スキルス胃癌に対するMET阻害の臨床応用への可能性を報告した(Yasumoto K, et al. *Cancer Sci* 2013“ Highlightsで紹介”)。

急速に進展増悪する高度な癌間質増生は、スキルス胃癌発症進展ひいては癌性腹膜炎合併の鍵を握ると考えられる。これまでの申請者らの知見から、スキルス胃癌では、癌間質における特異的HGF高産生ならびにHB-EGF高産生性Mの存在、間質活性化因子HB-EGFによる線維芽細胞からの著明なHGF産生誘導(3倍増強)ノックアウトマウスの検討から、MyofibroblastsやPericytes形成に深く関与し、HB-EGFと相互作用を有する血小板由来増殖因子(PDGF)は、スキルス胃癌より産生誘導されMからのHB-EGF産生誘導を促進、スキルス胃癌の癌間質の主体は、Myofibroblastsとは異なる α -SMA発現(-)の活性化線維芽細胞集団からなる等の、予備的結果を得ている。

本病態の発症進展を効果的に阻止するには、本病態の特徴でもある癌間質の急激な増生機序解明を通して間質を中心とした治療のパラダイムシフトが必要と考えられる。癌微小環境の新たな視点に基づく、すなわちスキルス胃癌間質細胞の成り立ちと増生機序ならびにその真の役割について、本病態形成に本質的に関わる因子の同定とその制御に基づく新規の胃癌標的治療法の開発が急務の重要課題である。

2. 研究の目的

スキルス胃癌は、びまん性癌浸潤発育と急速広範な癌間質増生を特徴とし、高頻度に悪性腹水を伴う癌性腹膜炎を発症する極めて予後不良な胃癌である。本病態特異的な発育進展、とくに高度な癌間質増生と癌性腹膜炎発症の成因は不明であり今なお効果的な治療法がない。本研究課題では、癌微小環境の新たな視点に基づく解析、すなわちスキルス

胃癌特異的癌間質細胞の眞の成り立ちとその役割をスキルス胃癌細胞との相互作用解明の中で明らかにすることにより新たなスキルス胃癌標的治療法を確立する。

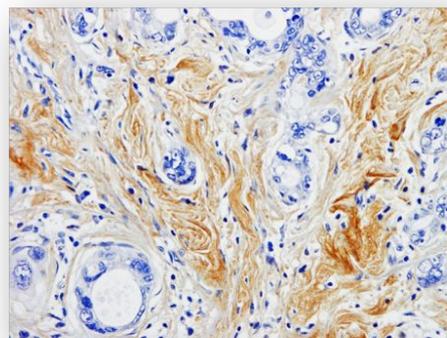
3. 研究の方法

スキルス胃癌特異的癌間質高度増生と癌性腹膜炎(悪性腹水伴う)形成の分子病態基盤を明らかにし、新たな標的療法構築のために、スキルス胃癌癌間質の特性(成り立ちとその性状)を非スキルス胃癌との対比から免疫組織化学的ならびに分子生物学的に検討する。すなわち、癌性腹膜炎発症びまん性胃癌原発巣(P群)(n=24)と肝転移発症腸型胃癌原発巣(H群)(n=20)を用い、原発巣における α -SMA、fibroblast activation protein(FAP)、HGFならびに α -SMA陽性myofibroblast産生増強作用が報告されているgalectin-1の発現を免疫組織学的に比較検討した。さらには、癌間質関連活性化因子HB-EGFが著明な線維芽細胞増殖ならびにHGF産生誘導能を有することが明らかとなり、癌微小環境を構成するマクロファージ等からのHB-EGF産生の有無を検討する。

4. 研究成果

胃癌組織における腫瘍関連間質、とくに線維芽細胞CAFのびまん性胃癌組織における特性(Originとbiology)を明らかにするために、活性化因子の発現検討を免疫組織化学的に行った。結果、(1) α -SMA発現において、P群での陽性率は19/24(79.2%)であったのに対し、H群では20/20(100%)陽性で陽性の占める割合が高かった。(2)FAP発現では、P群での陽性率が21/24(87.5%)、H群では19/20(95%)と両群ともに高発現していた。(3)HGF発現では、P群での陽性率が21/24(87.5%)と高値であったのに対して、H群ではその発現は軽微で、胃正常粘膜と同様、陽性と判断可能な症例は認めなかった(0/20(0%))。(4)galectin-1発現は、P群7/24(29.1%)と低発現であったのに対し、H群では15/20(75%)と陽性の比率が高かった。腫瘍組織内の線維芽細胞以外のマクロファージ、とくに、HB-EGFが線維芽細胞の細胞増殖やHGF産生等の活性化に深く関与することが判明したので、HB-EGF産生に主に関与するM2マクロファージの胃癌組織内の分布様式やHB-EGF産生について免疫組織学的に検討した。その結果、P群・H群でそれぞれ12/24(50%)、8/20(40%)と組織内陽性細胞数(50~100 cells/fields以上を陽性とした)にほ

とんど差は認めなかったが、びまん性胃癌組織ではびまん性胃癌細胞周囲に寄り添うように近接して存在していた。また、びまん性胃癌に浸潤するCD163陽性M2腫瘍浸潤マクロファージの一部からHB-EGF蛋白を産生することが免疫組織学的にも確認された



(写真)びまん性胃癌原発巣におけるHGF高発現像

【結論】胃癌転移形成における原発巣腫瘍組織の癌間質形質の違いが明らかとなった。本研究により、びまん性胃癌の代表で、悪性腹水を伴うスキルス胃癌ステージ4症例を対象とした検討で、スキルス胃癌原発巣の線維芽細胞は、病態特異的な間質特性としてHGF高産生性で、 α -SMA陽性ならびにFAP陽性の活性化線維芽細胞からなることが初めて明らかとなり、これら病態特異的活性化HGF+SMA+FAP+CAF産生に中心的役割を果たすと考えられるHB-EGFの重要な役割も明らかとなった。M2マクロファージが産生するHB-EGFが、スキルス胃癌特異的病態形成に深く寛容することが判明した。HB-EGF産生を軸とするスキルス胃癌細胞とHGF高産生線維芽細胞が構成する癌微小環境の制御が本疾患の革新的標的治療法開発につながるものと期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

安本 和生、Characterization of cancer stromal fibroblasts in primary sites of metastatic gastric cancer.

第75回日本癌学会学術総会、2016年10月6日、「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」

安本 和生、Characterization of cancer stromal fibroblasts in primary sites of gastric cancer. 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日、「名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）」

安本 和生、Novel targeting therapy in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日、「パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安本 和生 (YASUMOTO, Kazuo)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：90262592

(2) 研究分担者

矢野 聖二 (YANO, Seiji)
金沢大学・がん進展制御研究所・教授
研究者番号：30294672