

74. 胃癌－間質相互作用機序解明とそれに基づく創薬の研究

小寺 泰弘

名古屋大学 大学院医学系研究科 消化器外科学

Key words : 胃癌, 癌関連線維芽細胞, 微小環境

緒言

近年、癌の治療抵抗性の要因として癌－間質相互作用が注目されているが、癌微小環境を構築する癌間質を標的とした治療が、今後の革新的な癌治療成績向上への鍵となると考えられる^{1,2)}。難治性癌の代表格であるスキルス胃癌に象徴されるように、胃癌は腫瘍の増大に著明な間質増生を伴うことが特徴的であり、特に胃癌間質細胞の大部分を占める癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF) の癌－間質相互作用における役割の解明と制御が重要である³⁾。本研究では、胃癌－間質相互作用の分子生物学機序を解明し、胃癌間質を標的とした新規分子標的治療薬創薬の基盤となる分子を同定するために、胃癌新鮮標本から Flow cytometry を用いて高精度な CAF を分離することを目的とした。活性を有した純粋な CAF における遺伝子発現解析や機能解析を可能とする。

方法

本研究で最も重要なのは、患者検体からの CAF の分離培養である。スキルス胃癌および非スキルス胃癌症例の新鮮切除標本を摘出後速やかに処理し、癌部および非癌部組織から線維芽細胞を分離培養した。癌部から得た培養線維芽細胞を対象に FACS Aria™ を用いた細胞分離を行った。生細胞の状態での CAF を選別しうる表面マーカーとして fibroblast activation protein (FAP) を用い、分離後の線維芽細胞活性度の評価には α SMA による免疫細胞染色を用いた。分離された CAF より、total RNA、培養液上清 (Conditioned media: CM) を抽出した。CAF からの CM 付加の有無による胃癌細胞株の増殖能の変化を検討した。

結果

13 例の胃癌患者から得た癌部および非癌部の新鮮切除標本を細切・培養し、線維芽細胞を得た (図 1)。8 例は限局型胃癌、5 例はスキルス胃癌であった。

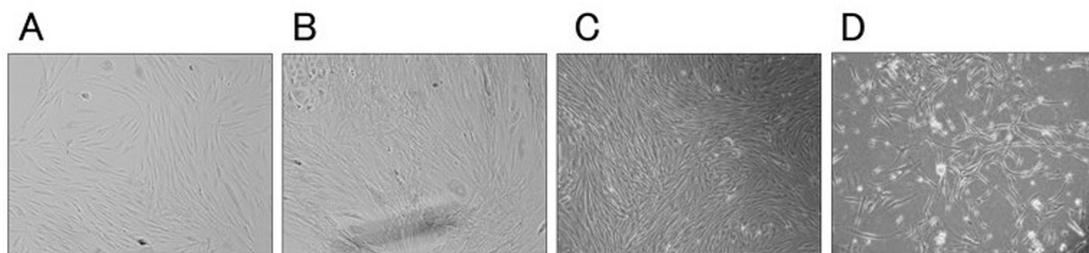


図 1. 新鮮切除標本からの線維芽細胞の培養

腫瘍形成型胃癌：癌部組織 (A)、非癌部組織 (B)、浸潤型胃癌：癌部組織 (C)、非癌部組織 (D) のいずれから、平均 21 日で線維芽細胞が分離培養された (200 倍にて観察)。

細胞表面マーカー FAP の発現度で線維芽細胞を Sorting し、活性型 CAF を分離した (図 2)。

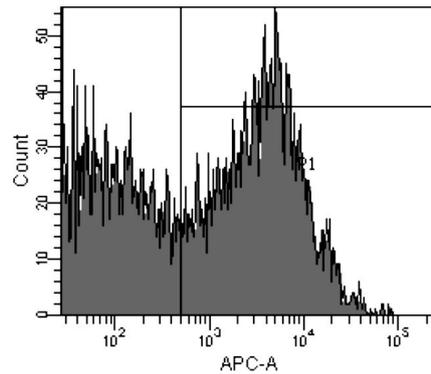


図 2. 細胞表面マーカー FAP を用いた活性型 CAF の細胞分離

培養線維芽細胞を FAP をマーカーとした Cell sorting で、活性型 CAF を生細胞のまま分離した。

分離後の線維芽細胞は培養可能であり、FAP 陽性 CAF 群では有意に α SMA 陽性率が高かった (図 3)。

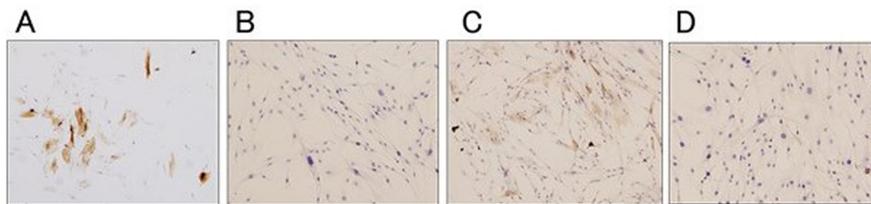


図 3. Cell sorting 後の α SMA 細胞染色

FAP をマーカーとして細胞分離した生細胞を活性型 CAF マーカーである α SMA で細胞染色した。癌部組織由来；FAP 陽性 (A)、FAP 陰性 (B)、非癌部組織由来；FAP 陽性 (C)、FAP 陰性 (D) いずれにおいても、FAP 陽性細胞群においては、 α SMA 陽性細胞が多く認められた (200 倍にて確認)。

FAP 陽性 CAF から得た CM 添加により、スキルス胃癌由来細胞株 (KATO-III、NUGC4) の増殖能が増加した (図 4)。

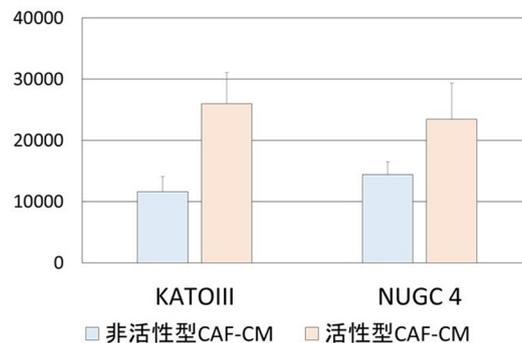


図 4. 分離後 CAF-CM の細胞増殖能への影響

FAP 陽性 CAF から得た CM 添加により、スキルス胃癌由来細胞株の増殖能が増加した。

考 察

胃癌新鮮切除標本からの CAF を分離培養し、Flow cytometer を用いた細胞分離により活性型 CAF を高精度に収集した。活性型 CAF は共存するスキルス胃癌細胞の増殖を促進した。活性型 CAF で特異的で発現亢進する新規分子の同定のために、網羅的遺伝子発現解析を行っていく。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学医学部附属病院消化器外科二の神田光郎、清水大および田中晴祥である。

文 献

- 1) Kanda M, Nomoto S, Oya H, Takami H, Shimizu D, Hibino S, Hashimoto R, Kobayashi D, Tanaka C, Yamada S, Fujii T, Nakayama G, Sugimoto H, et al. The Expression of Melanoma-Associated Antigen D2 Both in Surgically Resected and Serum Samples Serves as Clinically Relevant Biomarker of Gastric Cancer Progression. *Ann Surg Oncol*. 2016; 23 Suppl 2:214-21. doi: 10.1245/s10434-015-4457-8.
- 2) Kanda M, Shimizu D, Fujii T, Sueoka S, Tanaka Y, Ezaka K, Takami H, Tanaka H, Hashimoto R, Iwata N, Kobayashi D, Tanaka C, Yamada S, et al. Function and diagnostic value of Anosmin-1 in gastric cancer progression. *Int J Cancer*. 2016; 138:721-30. doi: 10.1002/ijc.29803.
- 3) Kanda M, Shimizu D, Tanaka H, Shibata M, Iwata N, Hayashi M, Kobayashi D, Tanaka C, Yamada S, Fujii T, Nakayama G, Sugimoto H, Koike M, Fujiwara M, Kodera Y. Metastatic pathway-specific transcriptome analysis identifies MFSD4 as a putative tumor suppressor and biomarker for hepatic metastasis in patients with gastric cancer. *Oncotarget*. 2016 Feb 8. doi: 10.18632/oncotarget.7269.