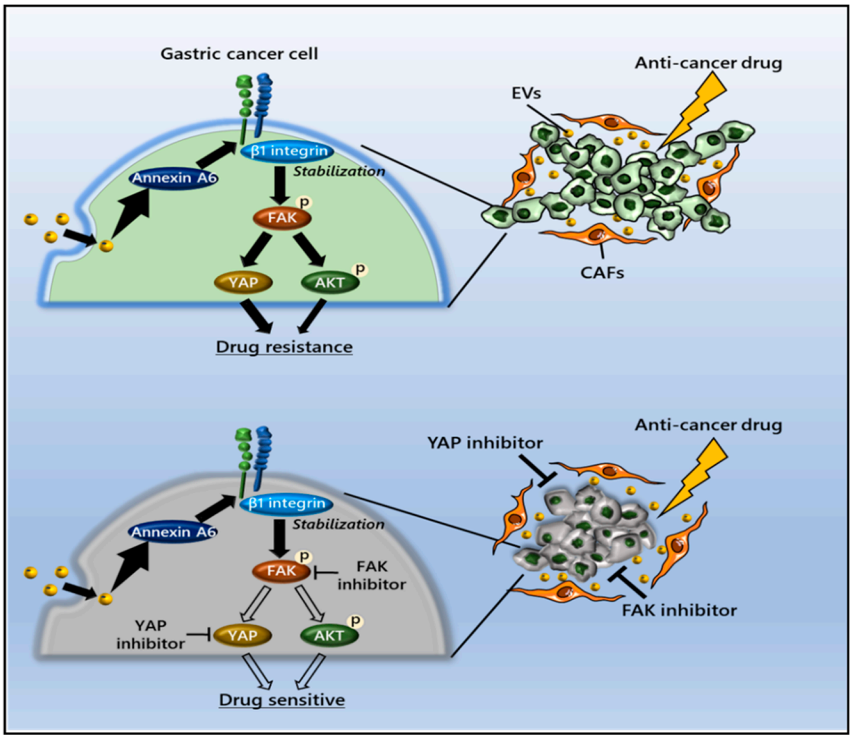
58　胃癌腹膜播種を促進する細胞間クロストーク機構の解明	石本　崇胤

【目的】近年、胃癌に対する薬物療法においてもハーセプチンなどの分子標的薬が認可され従来の抗がん剤との併用によって一定の効果を示しているが、腹膜播種を有する進行・再発胃癌のコントロールは困難である。本研究の目的は、腹膜播種を伴うスキルス胃癌において、がん - ストローマ細胞ネットワークの分子メカニズムについてシングルセルプロテオミクス解析技術を用いて明らかにすることである。

【方法】研究方法の具体的項目は、1. がん性腹水の成分解析、2. 同腹水の細胞分画・活性化シグナル解析、3. 抗がん剤抵抗性に関わる CAFs 由来因子の同定、4. 腹膜播種マウスモデルを用いた *in vivo* 検証を行うことであった。

【結果】現在までに 28 症例の胃がん性腹水サンプルを用いて、LC-MS/MS による網羅的なプロテオミクスを実施した。その結果、肝硬変由来の腹水と比較してがん性腹水において特異的に発現が高い細胞外マトリックスタンパク質を同定した。同時に、マスサイトメトリーを用いたシングルセルプロテオミクスを実施し、がん性腹水中の mesenchymal cell 分画において、老化関連分泌形質（SASP）を呈する P16 high／IL-6 high の細胞群が存在することを確認した。CAFs および胃がん細胞由来エクソソームの網羅的プロテオミクスを行った結果、CAFs 由来エクソソーム特異的に Annexin A6 タンパク質が発現することを明らかにした。Annexin A6 は胃がん組織内においても腫瘍間質のみで発現することを確認した。さらに CAFs 由来エクソソームに含有される Annexin A6 は胃がん細胞のインテグリン β1 タンパク質を細胞膜上に安定化させることで、細胞内で FAK-YAP シグナルを活性化し、マトリックス環境下において抗がん剤抵抗性を促進する。という新しい知見を見出した。

CAFs 由来エクソソームを介した抗がん剤抵抗性分子機構



58. 胃癌腹膜播種を促進する細胞間クロストーク機構の解明

石本　崇胤

熊本大学 生命科学研究部 消化器外科学

Key words：胃癌，腹膜播種，線維芽細胞，シングルセルプロテオミクス

緒　言

近年、胃癌に対する薬物療法においてもハーセプチンなどの分子標的薬が認可され従来の抗がん剤との併用によって一定の効果を示しているが、腹膜播種を有する進行・再発胃癌のコントロールは困難である。またスキルス胃癌は、腫瘍間質（ストローマ）成分が豊富なため周囲微小環境から常に影響を受けていることが知られている。さらに腹膜播種転移を来たした結節内も線維化が著明であり線維芽細胞（Cancer Associated Fibroblasts：CAFs）などの間質細胞との相互作用が強く治療抵抗性の一因となっている［1，2］。我々はこれまでスキルス胃癌由来 CAFs を用いた網羅的ゲノム解析を行い CAFs に依存する胃癌浸潤のメカニズムを明らかにしてきた［3］。

腹膜播種に伴う癌性腹水を用いた研究では癌細胞に焦点を当てた解析が主流であったが、近年シングルセルレベルでのプロテオミクス解析により癌性腹水に含まれる細胞分画の多様性についても解析が可能となった。

本研究の目的は、腹膜播種を伴うスキルス胃癌において、癌 - ストローマ細胞ネットワークの分子メカニズムについてシングルセルプロテオミクス解析技術を用いて明らかにすることである。スキルス胃癌の腹膜播種における CAFs の存在意義と活性化機構を明らかにすることは、現状では制御不能な胃癌腹膜播種をコントロールする治療戦略構築に向けた基盤となり、難治癌であるスキルス胃癌治療法開発への貢献が期待できる。

方　法

1. ヒトがん性腹水の成分解析

胃がん性腹水サンプルを用いて、LC-MS/MS による網羅的なプロテオミクスを実施した。またサイトカインについては ELISA にて測定し肝硬変による腹水との比較解析を行った。

2. ヒトがん性腹水の細胞分画解析・活性化シグナル解析

我々が所属する熊本大学の国際先端医学研究機構（IRCMS）内に Helios マスサイトメーターが設置されている。がん性腹水中の多様な細胞分画・活性化シグナルを同定するための重金属抗体パネルを作製した。

3. 抗がん剤抵抗性に関わる CAF エクソソーム内因子の同定

胃がん切除検体を用いた、腫瘍内 CAFs 含有量の定量化と臨床病理学的検討・予後解析を行った。胃癌細胞および CAFs から超遠心法を用いてエクソソームを抽出し、エクソソーム添加後の胃癌細胞の特性変化について検討を行った。さらに、LC-MS/MS によるエクソソーム内の網羅的なプロテオミクスを実施した。

4. 胃癌細胞と CAFs を用いた腹膜播種マウスモデル

免疫不全マウスへの胃癌細胞と CAFs の胃壁への同所移植、腹腔内移植による腹膜播種結節モデルにおいて、CAFs との共移植により腫瘍・転移形成が促進されることを既に確認している。本研究においては、胃癌進展に関わる腫瘍間質因子が腹膜播種結節の形成に与える影響を生体レベルで検討した。さらに CAFs によって活性化するシグナルの阻害剤と抗がん剤の併用による腫瘍抑制効果について検証を行った。

結　果

1. ヒトがん性腹水の成分解析

肝硬変にともなう腹水をコントロールとして胃がん性腹水サンプルを用いた網羅的なプロテオミクスの結果、胃癌がん性腹水に特異的なタンパク質としてマトリソーム分子を複数同定した。同様に腹水を用いた ELISA により、これまでに胃癌がん性腹水では有意に TGFβ1 の含有量が多いことを見出した。現在は、特定のマトリソーム分子を産生する細胞分画の同定、腹膜播種形成における働きについて機能解析を進めている。

2. ヒトがん性腹水の細胞分画解析・活性化シグナル解析

これまでに 5 症例の進行胃癌患者の腹水を用いてシングルセル解析を行った結果、癌細胞、血球系細胞とともに間葉系細胞のマーカーとして知られる CD90 および PDGFRα陽性の CAFs 分画の存在を証明した。さらに CD90／PDGFRα陽性の CAFs 分画の中に細胞老化マーカーである p16 タンパク質陽性の老化細胞が存在し、炎症性サイトカイン IL-6 を産生することを明らかにした（図 1）。この結果を踏まえると、腹膜播種の進展を防ぐには、播種巣のがん細胞だけでなく、細胞老化を起こした、がん関連線維芽細胞（CAFs）をターゲットとした新たながん腹膜播種の治療戦略が期待できる［4］。

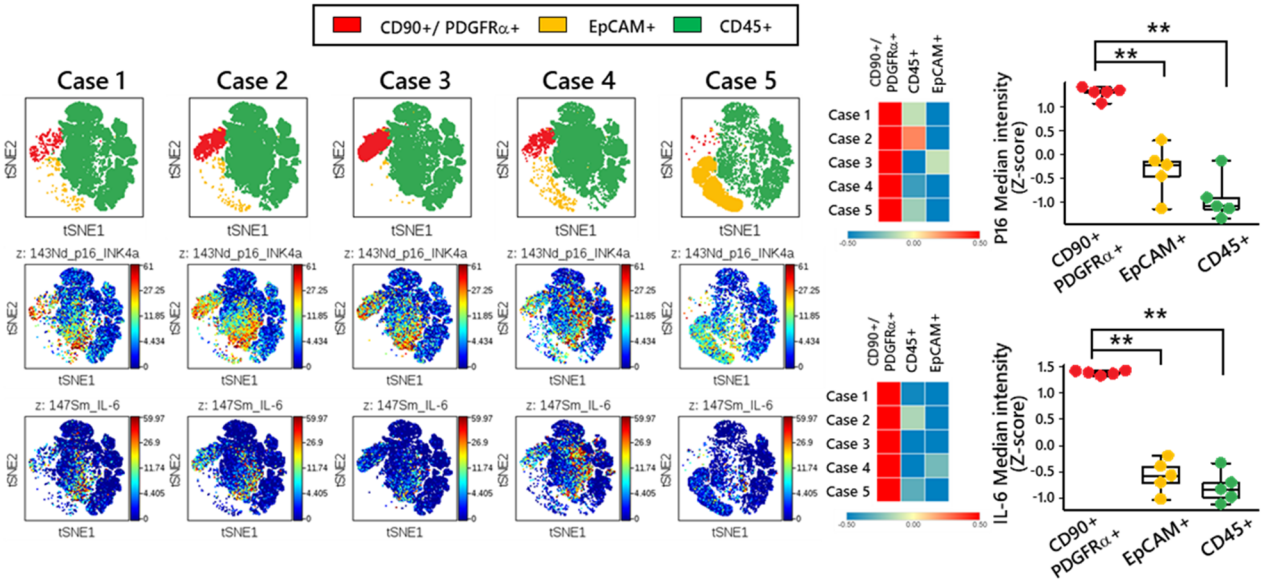


図 1.　胃癌がん性腹水中の老化 CAFs の存在と IL-6 産生

胃癌がん性腹水を用いて、マスサイトメトリーによる細胞分画解析をおこなった。

腹水中に存在する老化 CAFs では IL-6 産生が亢進していることが分かった。

* P<0.01、マン・ホイットニーの U 検定。

3. 抗がん剤抵抗性に関わる CAF エクソソーム内因子の同定

胃切除を施行された臨床サンプルを用いて、CAFs の主要なマーカーであるαSMA の免疫染色・定量化を行い予後との相関を比較したところ、CAFs が多い胃癌症例（CAF-high）では有意に予後不良と相関することを明らかにした。CAF 由来エクソソームを用いた網羅的プロテオミクスの結果、最も特異的に高発現していた AnnexinA6 の存在を見出した（図 2）。さらに機能解析をおこない AnnexinA6 は胃癌細胞膜上の Integrinβ1 を安定化させ、FAK-YAP pathway を介して抗がん剤抵抗性獲得に寄与すること証明した［5］。

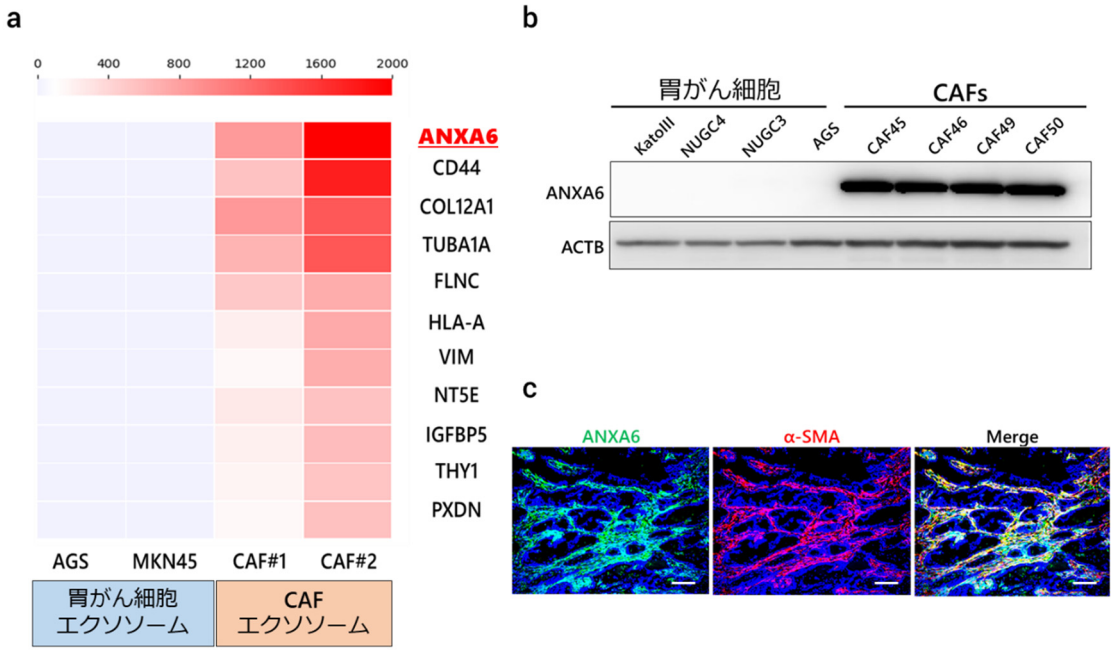


図 2. CAF エクソソーム特異的に含まれるタンパク質（ANXA6）の同定

a) CAF エクソソーム、胃がん細胞エクソソームを用いた網羅的プロテオミクスの結果。

b) 胃がん細胞および樹立した CAFs における ANXA6 発現量。

c) 胃がん組織における ANXA6 発現の局在。スケールバーは 200 μm を示す。

4. 胃癌細胞と CAFs を用いた腹膜播種マウスモデル

免疫不全マウスを用いた腹膜播種結節モデルにおいて、Annexin A6 を含む CAF エクソソームによって播種結節のシスプラチン抵抗性が起こることを明らかにした。さらに FAK 阻害剤もしくは YAP 阻害剤の投与によって、CAF エクソソームによって引き起こされるシスプラチン抵抗性が有意に減弱することを証明した。

考　察

これまでの解析により、腫瘍間質由来のエクソソームが胃癌抗がん剤抵抗性を促進していることが明らかになった。この結果を受けて、癌治療において癌細胞を標的とした抗がん剤に加えて、腫瘍間質（ストローマ）を標的とした抗ストローマ治療の併用が抗がん剤の治療効果を高めることが示唆された。さらに、胃癌がん性腹水を用いたマスサイトメトリー解析によってがん性腹水中の多様な細胞分画が明らかになった。中でも、CD90／PDGFRα陽性の CAFs 分画の中に細胞老化マーカーである p16 タンパク質陽性の老化細胞が存在し、この老化 CAFs 分画の細胞が炎症性サイトカイン IL-6 を産生することを見出した。老化細胞由来の IL-6 は胃がん細胞の STAT シグナル活性化に伴う anti-apoptosis を促進し、腹膜播種結節の増大に繋がることが明らかになった。これまでの研究によって得られた知見は、がん性腹水中の non-malignant cell が腹膜播種形成を促進するメカニズムの一端を明らかにしたと言える。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、熊本大学国際先端医学研究機構（IRCMS）の内原智幸、安田忠仁、小岩麻由、熊本大学大学院消化器外科学の馬場秀夫教授である。この場を借りて深く感謝申し上げます。

文 献

1) Bu L, Baba H, Yasuda T, Uchihara T, Ishimoto T. Functional diversity of cancer - associated fibroblasts in modulating drug resistance. Cancer Sci. 2020 Oct;111(10):3468-3477. PMID: 33044028 DOI: 10.1111/cas.14578.

2) Bu L, Baba H, Yoshida N, Miyake K, Yasuda T, Uchihara T, Tan P, Ishimoto T. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. Oncogene. 2019 Jun;38(25):4887-4901. PMID: 30816343 DOI: 10.1038/s41388-019-0765-y.

3) Ishimoto T, Miyake K, Nandi T, Yashiro M, Onishi N, Huang KK, Lin SJ, Kalpana R, Tay ST, Suzuki Y, Cho BC, Kuroda D, Arima K, Izumi D, Iwatsuki M, Baba Y, Oki E, Watanabe M, Saya H, Hirakawa K, Baba H, Tan P. Activation of Transforming Growth Factor Beta 1 Signaling in Gastric Cancer-associated Fibroblasts Increases Their Motility, via Expression of Rhomboid 5 Homolog 2, and Ability to Induce Invasiveness of Gastric Cancer Cells. Gastroenterology. 2017 Jul;153(1):191-204. PMID: 28390866 DOI: 10.1053/j.gastro.2017.03.046.

4) YasudaT, Koiwa M, Yonemura A, Miyake K, Kariya R, Kubota S, Yokomizo-Nakano T, Yasuda-Yoshihara N, Uchihara T, Itoyama R, Bu L, Fu L, Arima K, Izumi D, Iwagami S, Eto K, Iwatsuki M, Baba Y, Yoshida N, Ohguchi H, Okada S, Matsusaki K, Sashida G, Takahashi A, Tan P, Baba H, Ishimoto T. Inflammation-driven senescence-associated secretory phenotype in cancer-associated fibroblasts enhances peritoneal dissemination. Cell Reports. 2021 Feb 23;34(8):108779. DOI：10.1016/j.celrep.2021.108779.

5) Uchihara T, Miyake K, Yonemura A, Komohara Y, Itoyama R, Koiwa M, Yasuda T, Arima K, Harada K, Eto K, Hayashi H, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Y, Yoshida N, Yashiro M, Masuda M, Ajani JA, Tan P, Baba H, Ishimoto T. Extracellular Vesicles from Cancer-Associated Fibroblasts Containing Annexin A6 Induces FAK-YAP Activation by Stabilizing β1 Integrin, Enhancing Drug Resistance. Cancer Res. 2020 Aug 15;80(16):3222-3235. PMID: 32605995 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3803.