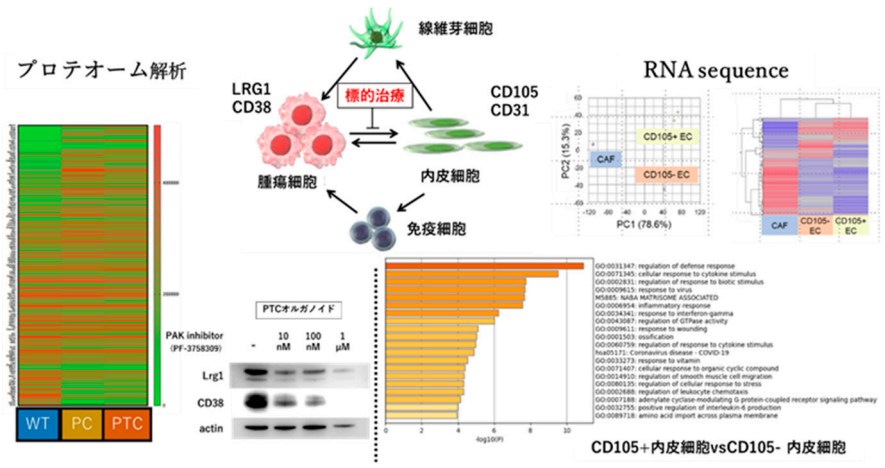
186　印環細胞型胃癌のスキルス性獲得機序解析と標的治療	畑　昌宏

【目的】本研究では印環細胞型胃癌でみられる著明な線維化、いわゆるスキルス性形成のメカニズムにおいて、血管内皮細胞の異常活性化によって誘導される機構をオミクス解析により解析し、新規治療標的を提示することを目的とした。

【方法】スキルス胃がんマウスモデルとして、独自に樹立した *Tff1*-Cre; LSL-*p53* ^{R172H}; *Tgfb* r2 $^{F/F}$; *Cdh1* $^{F/F}$（T1-PTC）マウスを用いた。腫瘍免疫微小環境の解析を行うため、マウス胃腫瘍組織を用いて FACS を施行し、血管内皮細胞・線維芽細胞を選択的に回収し、各々の RNA シークエンスを施行した。具体的には、先行実験により T1-PTC マウス胃腫瘍細胞で *Lrg1* 遺伝子が高発現していることが判明しており、Lrg1 により誘導される CD105 陽性血管内皮細胞と CD105 陰性血管内皮細胞における遺伝子発現の差異を比較した。また、粘膜内の印環細胞癌を発症するものの浸潤傾向を示さず、長期生存が可能である *Tff1*-Cre; LSL-*p53* ^{R172H}; *Cdh1* $^{F/F}$（T1-PC）マウスと T1-PTC マウスにおける線維芽細胞の遺伝子発現の差異も比較した。さらに、先行実験により T1-PTC マウスに対する新規治療標的候補として CD38 を特定しており、CD38 特異的抗体による治療を行ったマウス胃腫瘍組織からも FACS を用いて線維芽細胞を回収し、治療前後の RNA 発現を比較した。加えて、WT・PC・PTC 変異胃オルガノイドを樹立し、3 種についてリン酸化プロテオーム解析を行い、PTC 腫瘍オルガノイドに特異的な活性化 pathway を検索した。

【結果】T1-PTC マウス胃腫瘍内の CD105 陽性血管内皮細胞と CD105 陰性血管内皮細胞の遺伝子発現の差異を比較した結果、CD105 陽性血管内皮細胞においては Myc・Tgf-β シグナル関連遺伝子群の高発現を認め、また血管新生亢進に関連する遺伝子群の高発現が確認された。さらに *CSF3*・*MADCAM1*・*SELP* といった白血球遊走に関連する遺伝子の上昇を認め、CD105 陽性血管内皮細胞による血管新生のポジティブフィードバック機構や白血球遊走亢進による炎症誘導機序の存在が示唆された。次に線維芽細胞について解析を行ったところ、T1-PTC マウスの胃腫瘍内線維芽細胞は T1-PC マウスの線維芽細胞に比し、ケモカインを中心としたサイトカイン関連遺伝子が高発現しており、T1-PTC マウスにおいては CD105 陽性血管内皮細胞と線維芽細胞は協調して白血球遊走と炎症を誘導し、腫瘍優位の腫瘍免疫微小環境を形成していると考えられた。さらに、CD38 特異的抗体による治療を行った T1-PTC マウスの胃腫瘍組織内線維芽細胞においては、白血球遊走関連遺伝子群の高発現が一部キャンセルされていたことから、CD38 は血管内皮細胞を誘導するのみならず、スキルス胃癌においては線維芽細胞による炎症の誘導にも関連する可能性が有り、CD38 を抑制することで腫瘍免疫微小環境全体の形成機序を抑制しうる可能性が示唆された。一方、胃腫瘍オルガノイドのリン酸化プロテオーム解析の結果、PTC 腫瘍オルガノイドにおいて PAK 蛋白のリン酸化が亢進していた。そこで PTC 胃腫瘍オルガノイドに *in vitro* で PAK 阻害剤の投与を行ったところ、腫瘍オルガノイドで高発現している CD38 を抑制した。したがって、PAK 阻害剤はスキルス胃癌における血管内皮細胞誘導機序を抑制する可能性があり、新規治療薬候補として考えられた。

腫瘍細胞のプロテオーム解析と内皮細胞・線維芽細胞の RNA シークエンスによる腫瘍免疫微小環境解析



186. 印環細胞型胃癌のスキルス性獲得機序解析と標的治療

畑　昌宏

東京大学 医学部 消化器内科学

Key words：胃癌，スキルス胃癌，腫瘍免疫微小環境，血管内皮細胞，Tgf-β

緒　言

消化器癌、特に胃癌は我が国の癌死亡の上位を占める罹患率・死亡率の高い疾患である。一般的な胃癌は *Helicobacter pylori* 感染による慢性胃炎を母地として発生するが、本邦では衛生環境の改善や除菌治療により *Helicobacter pylori* の感染者が減少していることにより胃癌の発症者は減少傾向である。さらに、内視鏡検査の普及による病変の早期発見率上昇や治療技術開発（ESD、腹腔鏡手術など）といった医学的発展もあり、胃癌による死亡者数も減少傾向となっている。しかしながら、本邦における進行胃癌患者の 5 年生存率は依然低い状況（Stage Ⅳ患者において 10%以下）が続き、世界においても胃癌は死亡原因として悪性腫瘍の中で 3 番目に多いとされている。切除不能進行胃癌に対する化学療法などの全身治療は年々進歩しているものの、その予後延長効果は未だ不十分であり、近年使用可能となった HER2 及び VEGFR を標的とした分子標的治療や、PD-L1 などを標的とした抗腫瘍免疫治療の効果も、他種の癌に対する効果に比し良好でないと考えられている。

胃癌の中でも特に予後不良とされるのが、いわゆるスキルス（印環細胞型）胃癌である。スキルス胃癌では、癌細胞がびまん性に胃壁内を浸潤し、早期に全身への転移を来し、切除不能となることが多い。また、スキルス胃癌は高頻度に胃拡張不良を誘因とした経口摂取不良による悪液質を引き起こし、腹膜播種による腸管蠕動不良・腸閉塞に至ると経口摂取がほぼ不能となり、患者の QOL を著しく低下させる。腸型胃癌に比し進行が速いことから、早期に悪液質や経口摂取不能により治療困難な状態に陥ることも予後不良となる一因であり、さらに治療に至った場合も化学療法への反応が一般的に芳しくないため、スキルス胃癌に対する病態解明や新規治療の発見は、現在も尚、喫緊の課題で在り続けている。

かくして我々は印環細胞型胃癌のスキルス性獲得機序の解明と新規治療の発見を志向した。

我々は、ヒトの印環細胞型胃癌、いわゆるスキルス胃癌を模倣する独自のマウスモデル（*Tff1*-Cre; LSL-*p53*^{R172H}; *Tgfbr2*$^{F/F}$; *Cdh1*$^{F/F}$、T1-PTC マウス）を樹立しており、その胃腫瘍組織と胃腫瘍オルガノイドの RNA sequence の解析結果から、腫瘍細胞特異的に発現する *Lrg1*・*Cd38* という遺伝子に注目した。いずれも血管内皮細胞を誘導する蛋白であるが、特に LRG1 が特異的に結合する CD105 陽性内皮細胞の遺伝子発現解析を施行し、CD105 陽性内皮細胞において血管新生亢進や白血球遊走・炎症誘導に関連する遺伝子群が高発現していることを発見した。また、T1-PTC マウスで増生している線維芽細胞についても遺伝子発現解析を施行し、ケモカインを中心としたサイトカイン関連遺伝子の高発現を確認した。すなわち、T1-PTC マウスにおいては CD105 陽性血管内皮細胞と線維芽細胞は協調して白血球遊走と炎症を誘導し、腫瘍優位の腫瘍免疫微小環境を形成していると考えられた。我々の先行実験で CD38 特異的抗体による治療が T1-PTC マウスの胃腫瘍の浸潤を抑制することを確認しているが、同治療を行ったマウス胃腫瘍組織の線維芽細胞の遺伝子解析において、複数のサイトカイン関連遺伝子の高発現がキャンセルされていることが判明した。CD38 は血管内皮細胞を誘導する蛋白と考えられているが、この結果よりスキルス胃癌において血管内皮細胞の誘導を抑制することで炎症を介した腫瘍免疫微小環境全体の形成機序を抑制しうる可能性が示唆された。一方、胃腫瘍オルガノイドのリン酸化プロテオーム解析により、PTC オルガノイドにおける PAK 蛋白のリン酸化亢進が判明した。PTC オルガノイドに *in vitro* で PAK 阻害剤を投与すると、PTC オルガノイドの CD38 発現を抑制した。したがって、PAK 阻害剤はスキルス胃癌における腫瘍免疫微小環境形成機序を抑制する可能性があり、新規治療薬候補として考えられた。

方法および結果

1. RNA sequence of FACS-sorted cell

マウスの胃腫瘍組織を可及的に細分した後、dispase・collagenase の混合液に入れ、37℃で約 30 分間撹拌した後、フィルター濾過をなどの処理を行い、蛍光標識抗体を用いて FACS を施行した。FACS により $CD45^{-}$／$Epcam^{-}$／$CD31^{+}$／$CD105^{+}$細胞（CD105 陽性内皮細胞）、$CD45^{-}$／$Epcam^{-}$／$CD31^{+}$／$CD105^{-}$細胞（CD105 陰性内皮細胞）、$CD45^{-}$／$Epcam^{-}$／$CD31^{-}$／$CD105^{+}$細胞（線維芽細胞）をそれぞれ回収し、RNA を抽出し網羅的遺伝子発現解析を行った。

マウスはスキルス胃癌を呈する T1-PTC マウスに加え、印環細胞を呈するものの粘膜下浸潤を伴わず、長期生存が可能である T1-PC マウスを使用した。また、線維芽細胞については、先行実験において腫瘍の粘膜下浸潤を抑制した CD38 特異的抗体を投与した T1-PTC マウスからも回収し解析に加えた。

T1-PTC マウス胃腫瘍においては CD105 に結合する LRG1 が腫瘍細胞で高発現しており、CD105 特異的抗体が同マウスの粘膜下浸潤を抑制することが先行実験により判明していたため、初めに T1-PTC マウスにおける CD105 陽性内皮細胞と CD105 陰性内皮細胞における遺伝子発現を比較した。そのエンリッチメント解析の結果、CD105 陽性血管内皮細胞においては Myc・Tgf-β シグナル関連遺伝子群の高発現を認め（GSEA）、また血管新生亢進に関連する遺伝子群の高発現が確認された（Metascape）。さらに *CSF3*・*MADCAM1*・*SELP* といった白血球遊走に関連する遺伝子の上昇を認め（GSEA）、CD105 陽性血管内皮細胞による血管新生のポジティブフィードバック機構や白血球遊走亢進による炎症誘導機序の存在が示唆された（図 1）。

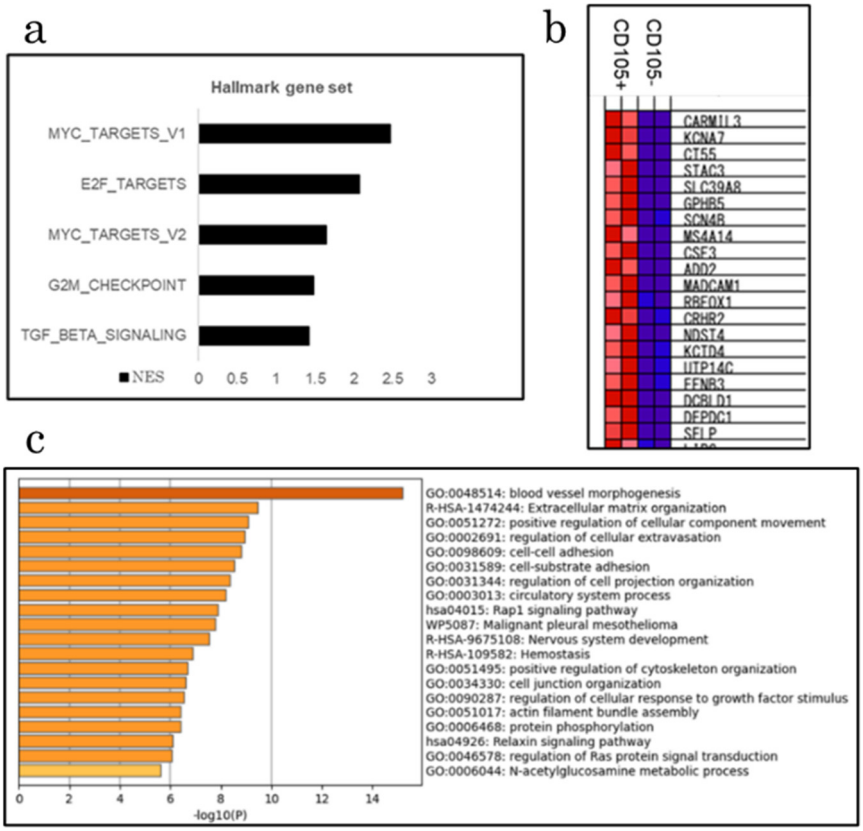


図 1. CD105 陽性・陰性血管内皮細胞の遺伝子発現解析

a）CD105 陽性内皮細胞対 CD105 陰性内皮細胞の GSEA 解析、いずれも FDR q＜0.25。

b）CD105 陽性・陰性内皮細胞の Heat map の一部抜粋。

c）Metascape を用いたエンリッチメント解析。

次に線維芽細胞についての解析を行った。まず T1-PC マウスと T1-PTC マウスにおける線維芽細胞の遺伝子発現の差異を解析したところ、T1-PTC マウスの線維芽細胞においてはケモカインを中心としたサイトカイン関連遺伝子（*Ccl8*、*Ccl12*、*Ccl24*、*Cxcl4*、*Cxcl9*、*Cxcl16*、*Il12b*、*Il18bp*、*Il33* など）が高発現しており、エンリッチメント解析で免疫細胞に関わる遺伝子群が高発現していることが判明した（図 2）。すなわち、T1-PTC マウスにおいては CD105 陽性血管内皮細胞と線維芽細胞は協調して白血球遊走と炎症を誘導し、腫瘍優位の腫瘍免疫微小環境を形成していると考えられた。次に CD38 特異的抗体で治療を行った T1-PTC マウスの線維芽細胞のデータを加えて解析すると、無治療マウスにおいて特徴的であった炎症誘導関連遺伝子の高発現がキャンセルされており、CD38 は CD31 陽性血管内皮細胞を誘導する蛋白と考えられているが、スキルス胃癌に対する CD38 特異的抗体治療は、血管内皮細胞誘導の抑制のみならず、白血球遊走・炎症誘導をも抑制することで、腫瘍免疫微小環境全体の形成を阻害し得ることが示唆された（図 2）。

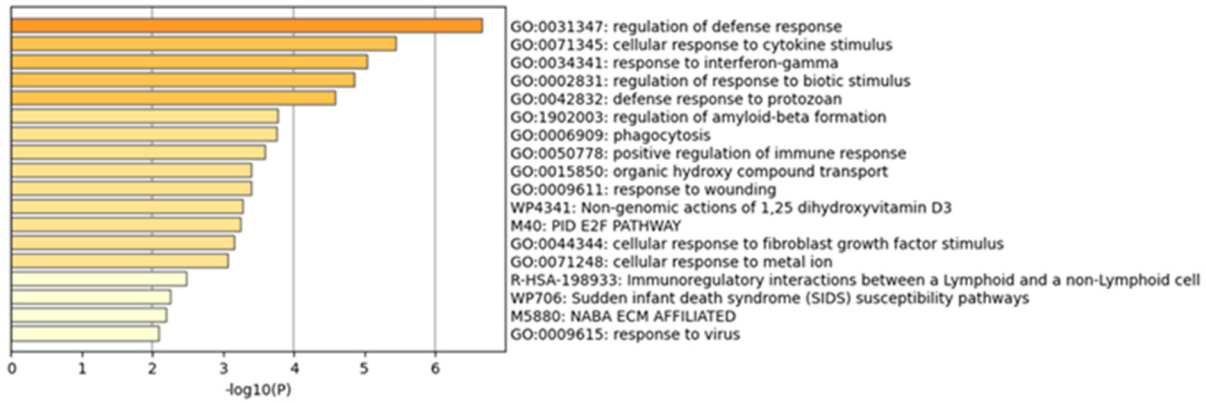


図 2. T1-PTC マウス胃腫瘍内線維芽細胞の遺伝子発現エンリッチメント解析
T1-PTC マウス胃腫瘍内線維芽細胞において、T1-PC マウスに比し発現上昇しており、かつ CD38 特異的抗体により発現が抑制された遺伝子群によるエンリッチメント解析（Metascape）の結果。炎症やケモカインに関するシグナルが列挙された。

2. 腫瘍オルガノイドのリン酸化プロテオーム解析

胃オルガノイドは野生型マウス、PC マウス、PTC マウスの胃粘膜より作製し、『EF1a-Cre-2A-GFP-puro lentivirus vector』の感染と puromycin による選別により、遺伝子改変胃腫瘍オルガノイドを樹立した。PTC オルガノイドはヌードマウスに皮下移植すると腫瘤を形成し、印環細胞を伴う未分化型胃癌の組織像を呈した（先行実験）。この 3 種のオルガノイドについてリン酸化プロテオーム解析を施行した（図 3a）。検出された蛋白のうち、深部浸潤に関わる Tgfbr2 欠失によるものを特定するため、「PTC＞WT かつ PTC＞PC」であり、かつ「PC＞WT でない」ものを抽出すると、PAK2・PAK6 が検出された（図 3b）。そこで PAK 阻害剤を *in vitro* で PTC オルガノイドに濃度別に投与したところ、PAK 阻害剤濃度依存的に PTC オルガノイドにおける CD38 の発現が抑制されることが Western-blotting により確認された（図 3c）。したがって、PAK 阻害剤はスキルス胃癌における腫瘍免疫微小環境形成機序を抑制する可能性があり、新規治療薬候補として考えられた。

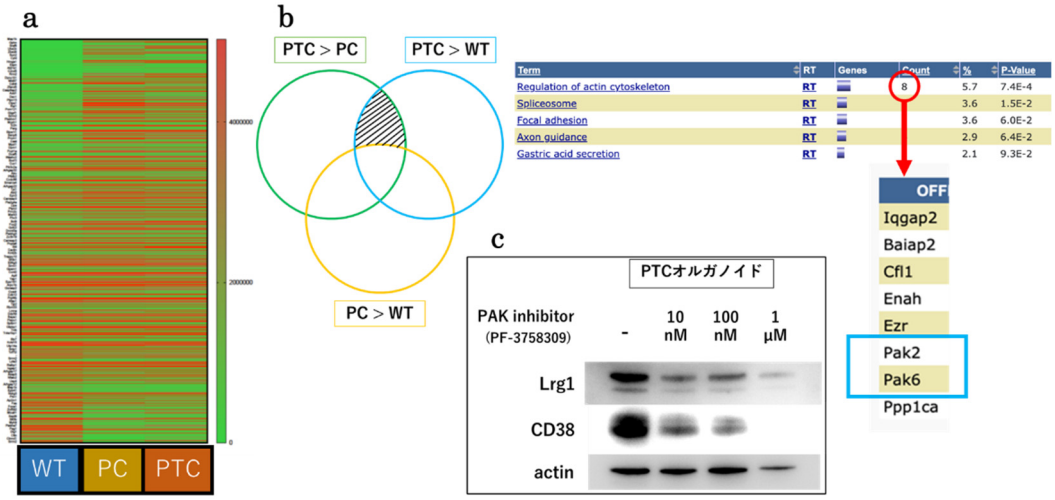


図 3. スキルス胃癌オルガノイドのリン酸化プロテオーム解析

a）リン酸化プロテオーム解析の Heat map。

b）ベン図の網掛け領域に含まれる遺伝子群のエンリッチメント解析。

c）PAK 阻害剤投与下の PTC オルガノイドを用いた Western-blotting。

考　察

胃癌に関連する遺伝子変異についての代表的な報告として、The Cancer Genome Atlas（TCGA）データベースによる胃癌における網羅的遺伝子変異解析の結果が 2014 年に発表された［1］。TCGA データベース内において、胃癌は Epstein-Barr virus（EBV）型、microsatellite instability（MSI）型、genomically stable（GS）型、chromosomal instability（CIN）型の 4 つのサブタイプに大別され、それぞれに特徴的な遺伝子変異やエピジェネティックな変化が指摘されている。未分化型（スキルス）胃癌は GS 型で高率に見られる傾向にあり、また GS 型では *CDH1* 遺伝子変異が高頻度であることが示された。GS 型ではその他に *TRP53*、*RHOA*、*SMAD4*、*TGFBR2* 遺伝子などの変異も指摘されている。我々の樹立した T1-PTC マウスはヒトのスキルス胃癌で高頻度に見られる 3 種の遺伝子変異を有し、その表現型も印環細胞型癌細胞が粘膜下・筋層浸潤を生後 3 週からきたし、食餌摂取不良・他臓器直接浸潤をきたして生後 8 週までに癌死に至るという、極めてヒトのスキルス胃癌に類似した経過を示すマウスモデルである。スキルス胃癌のマウスモデルは、*Atp4b*-Cre; *Cdh1*$^{F/F}$; *p53*$^{F/F}$マウス［2］や *Anxa10*-Cre^{ERT2}; *Cdh1*$^{F/F}$;LSL-*Kras*^{G12D}; *Smad4*$^{F/F}$マウス［3］が報告されているが、腫瘍免疫微小環境の解析などは為されておらず、微小環境を標的とした新規治療に照準している点が本研究の新規性と重要性であると考えている。T1-PC マウスではみられない印環細胞型胃癌細胞の粘膜下浸潤が T1-PTC マウスで確認されたことから、Tgf-β経路がスキルス胃癌の増殖進展において重要であると考えられた。腫瘍発生初期には Tgf-β は腫瘍増殖を抑制しているが、腫瘍の増殖に伴い役割を変え、腫瘍免疫回避や腫瘍優位微小環境形成に強く関連している［4～6］ことが分かっており、本研究も Tgf-β シグナルの関連が強く推測される。LRG1 は受容体の CD105 に結合して TGF-β シグナル伝達を介して血管新生を促進し［7］、また癌において腫瘍血管を不安定化させ免疫細胞の機能を抑制することが報告されている［8］。これは本報告と合致する内容であり、腫瘍に発現する LRG1 が CD105 血管内皮細胞を誘導することで、免疫細胞遊走や炎症誘導などを引き起こし、微小環境形成に関連しつつ腫瘍進展を支持していると考えられた。また、腫瘍関連線維芽細胞も TGF-β シグナルを介して免疫回避・腫瘍増殖に寄与していることがわかっており［7］、CD38／Lrg1 を介したメカニズムによる遺伝子発現の変動を本研究で確認できた。遺伝子変異のみならずエピジェネティクスにも治療標的を見出す時代となっており、今回はリン酸化プロテオーム解析により PAK 経路の阻害が腫瘍抑制に繋がる可能性を示した。PAK 経路は様々な癌でその関連を指摘され、胃癌における治療標的の可能性も報告されており［9］、今後マウスへの投与実験などを行い、治療効果を確認する必要がある。

共同研究者・謝辞

御指導・御鞭撻を賜りました東京大学消化器内科前教授小池和彦先生、現教授藤城光弘先生に深謝致します。

文　献

1) Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. Nature. 2014 Sep 11; 513(7517): 202-9. Epub 2014 Jul 23. PMID: 25079317 PMCID: PMC4170219 DOI: 10.1038/nature13480

2) Shu Shimada, Ayako Mimata, Masaki Sekine, Kaoru Mogushi, Yoshimitsu Akiyama, Hiroshi Fukamachi, Jos Jonkers, Hiroshi Tanaka, Yoshinobu Eishi, Yasuhito Yuasa. Synergistic tumour suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse-type gastric cancer. Gut. 2012 Mar; 61(3): 344-53. Epub 2011 Aug 24. PMID: 21865403 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300050

3) Therese Seidlitz, Yi-Ting Chen, Heike Uhlemann, Sebastian Schölch, Susan Kochall, Sebastian R Merker, Anna Klimova, Alexander Hennig, Christine Schweitzer, Kristin Pape, Gustavo B Baretton, Thilo Welsch, Daniela E Aust, Jürgen Weitz, Bon-Kyoung Koo, Daniel E Stange. Mouse Models of Human Gastric Cancer Subtypes With Stomach-Specific CreERT2-Mediated Pathway Alterations. Gastroenterology. 2019 Dec; 157(6): 1599-1614.e2. Epub 2019 Oct 1. PMID: 31585123 PMCID: PMC6902245 DOI: 10.1053/j.gastro.2019.09.026

4) Nadauld LD, Garcia S, Natsoulis G, Bell JM, Miotke L, Hopmans ES, Xu H, Pai RK, Palm C, Regan JF, Chen H, Flaherty P, Ootani A, Zhang NR, Ford JM, Kuo CJ, Ji HP. Metastatic tumor evolution and organoid modeling implicate TGFBR2 as a cancer driver in diffuse gastric cancer. Genome Biol. 2014 Aug 27; 15(8): 428. PMID: 25315765 PMCID: PMC4145231 DOI: 10.1186/s13059-014-0428-9

5) Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llergo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, Sevillano M, Ibiza S, Canellas A, Hernando-Momblona X, Byrom D, Matarin JA, Calon A, Rivas EI, Nebreda AR, Riera A, Attolini CS, Batlle E. TGFbeta drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. Nature. 2018 Feb 22; 554(7693): 538-543. Epub 2018 Feb 14. PMID: 29443964 DOI: 10.1038/nature25492

6) Daniele V F Tauriello, Elena Sancho, Eduard Batlle. Overcoming TGFβ-mediated immune evasion in cancer. Nat Rev Cancer. 2022 Jan; 22(1): 25-44. Epub 2021 Oct 20. PMID: 34671117 DOI: 10.1038/s41568-021-00413-6

7) Xiaomeng Wang, Sabu Abraham, Jenny A G McKenzie, Natasha Jeffs, Matthew Swire, Vineeta B Tripathi, Ulrich F O Luhmann, Clemens A K Lange, Zhenhua Zhai, Helen M Arthur, James Bainbridge, Stephen E Moss, John Greenwood. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF-β signaling. Nature. 2013 Jul 18; 499(7458): 306-11. PMID: 23868260 PMCID: PMC3836402 DOI: 10.1038/nature12345

8) Marie N. O'Connor, David M.Kallenberg, Carlotta Camilli, Camilla Pilotti, Athina Dritsoula, Rene Jackstadt, Chantelle E. Bowers, H. Angharad Watson, Markella Alatsatianos, Julia Ohme, Laura Dowsett, Jestin George, Jack W. D. Blackburn, Xiaomeng Wang, Mahak Singhal, Hellmut G. Augustin, Ann Ager, Owen J. Sansom, John Greenwood. LRG1 destabilizes tumor vessels and restricts immunotherapeutic potency. Med. 2021 Nov 12; 2(11): 1231-1252. PMID: 35590198 DOI: 10.1016/j.medj.2021.10.002

9) Xiaodong Li, Funan Liu, Feng Li. PAK as a therapeutic target in gastric cancer. Expert Opin Ther Targets. 2010 Apr; 14(4): 419-33. PMID: 20146633 DOI: 10.1517/14728221003642019