2015年度「プロジェクト未来」研究進捗状況報告書

研究課題名:中皮細胞の鎮静化による消化管癌の浸潤・播種抑制療法の開発

研究者:田中正光

所属:秋田大学大学院医学系研究科 分子生化学講座

### 【研究成果の概要】

中皮細胞蛍光可視化マウスを用いて、腹膜播種と胃癌の局所浸潤における中皮細胞の解析を行った。胃癌細胞の腹膜転移では、癌細胞の腹壁浸潤に先行して腹膜中皮細胞の組織内侵入が確認された。また胃粘膜下層に移植した胃癌細胞の局所浸潤に際しては、胃漿膜の中皮細胞が胃壁内に侵入し、癌細胞の漿膜下への深部浸潤を誘導する組織ニッチを形成する様子が見られた。その機構として、胃癌細胞の産生する細胞外小胞に含まれるWnt3aが漿膜中皮細胞の胃壁内浸潤を引き起こす事、その機序の一つとして中皮細胞でALDHの活性化が亢進する事を見出した。中皮細胞は腹膜転移だけでなく、胃癌局所の深部浸潤(深達度)の促進作用から癌の進行に関わる事が強く示唆される。

## 【研究の背景】

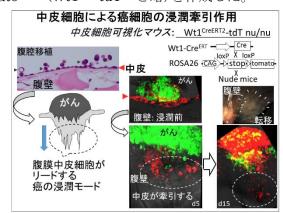
癌組織には多くの間質細胞が含まれ、がんの進展に促進的に働く作用が知られている。これまでに線維芽細胞(CAF)や中皮細胞が癌細胞の浸潤をリードする機構について解析してきた。胃癌の腹膜播種では、腹膜の中皮細胞が癌組織の先進フロントを形成する事を観察してきた事から、中皮細胞が癌細胞を牽引する事を in vivo で検証するために中皮細胞が赤色蛍光を発するヌードマウス Wt1<sup>CreERT2</sup>-tdTnuを作成した。同マウスを用いて、腹膜播種および胃癌の局所浸潤における中皮細胞の動態および機能解析を進めた。

# 【研究の主な結果】

1. 腹膜播種における中皮細胞の動態:

赤色蛍光 tdTomato の ROSA レポーターマウスと中皮細胞に発現特異性の高い WT1 遺伝子プロモーター制御下の Cre マウスを交配し、さらにヒト胃癌細胞の移植実験のためヌードマウスとの交配を進め、 $Wt1^{CreERT2}$  tdTomatonu/nu ( $Wt1^{Cre-t}dTnu$  と略)を作成した。

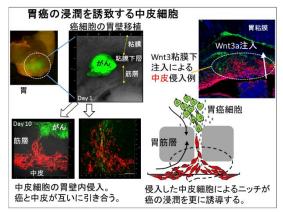
まずヒトスキルス胃癌細胞を同マウス腹腔に移植すると、腹壁転移部で移植後5日目には中皮細胞が先行して腹壁に浸潤を開始し、癌細胞は腹膜表面にほとんど留まっている状態が見られる。その後、中皮細胞の浸潤範囲は常に癌細胞の浸潤領域より広範囲であり、Lineage tracing の手法により中皮細胞先導型の癌細胞浸潤様式を確認した(右図)。



2. 胃癌の深部浸潤に関わる中皮細胞ニッチ:

胃癌細胞の Wt1<sup>Cre-</sup>tdTnu 胃壁内移植において、漿膜中皮細胞が胃壁内に侵入し癌細胞の深 部浸潤を誘致する作用を見出した。癌細胞・ CAF と中皮細胞は互いに胃壁内で引き合い、 胃の外表から胃壁内に侵入した中皮細胞は 癌・線維芽細胞を引き寄せる事で癌の深部浸 潤を促進する。漿膜中皮細胞が癌の進展を促 進する新たな作用として、担癌胃壁内部に侵 入して癌の深部浸潤を誘致するニッチを形成 する事を示した。(右図)

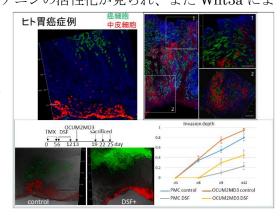
# 中皮ニッチ形成の機構:



ヒト胃癌標本でも中皮細胞の反応性増殖と侵入を伴う症例が観察され、漿膜中皮細胞が胃 癌組織内に深く侵入し粘膜内にまで及んでいるケースも見られた(下図上段)。

中皮ニッチ形成の機構として、CD63 陽性の細胞外小胞が胃癌細胞から放出され、マウス胃 壁内で広範囲に分布している事をイメージングし、その細胞外小胞に含まれる蛋白質とし て Wnt3a を同定した。Wnt3a の胃壁内注入でも同様の中皮細胞ニッチの形成が見られる。 一方、胃癌移植マウスの漿膜中皮細胞ではβ-カテニンの活性化が見られ、また Wnt3a によ

り発現上昇する事が報告されている ALDH1の 活性化が認められた。胃癌細胞の胃移植に伴う 中皮細胞ニッチ形成は、胃癌細胞の Wnt3a 発 現抑制や Wnt-β-カテニン経路の阻害、および ALDH1 のインヒビターである Disulfiram (DSF)経口投与によって抑制された。それに伴 い、胃癌細胞の胃壁内深達度も軽減される結果 が得られた(右図下段)。



#### 【考察】

癌に伴う中皮細胞の新しい機能として、胃癌の局所浸潤で胃壁内に侵入した中皮細胞が癌 細胞の深部浸潤を誘致する組織ニッチを形成する事を示した。マウスとヒトの胃壁では厚 さに差があるため、マウスで観察されたような癌細胞の細胞外小胞の分散がヒトでどの程 度の範囲に生じるかは不明であるが、ヒト症例でも中皮ニッチの見られるケースが確認さ れた事から胃癌の進行に関与する事が示唆される。現在、中皮ニッチ細胞の分子特性に基づ く癌の浸潤抑制ツールの作製を試みている。

\*以上の結果は Cancer Research (2016 Nov 28. pii: canres.0964.2016)に報告された。