

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名	山梨大学大学院総合研究部医学域 外科学講座第1教室
職名・氏名	臨床助教 齊藤 亮 ㊞

1 研究テーマ

血小板からアプローチする癌腹膜播種の解明と新規治療ターゲットの開発

2 研究の目的

癌は、長年にわたり日本全国および山梨県における死亡原因の第1位を占めている。中でも消化器癌は最も罹患率、死亡率が高く、その治療成績の向上は喫緊の課題である。申請者は地域医療の中核を担う大学病院の外科医として多くの消化器癌の治療に携わってきたが、高度進行癌、再発癌でしばしば観察される腹膜播種には有効な治療法がなく、患者の生活の質を著しく低下させることを経験している。腹膜播種の病態は、血行性転移やリンパ節転移と比べると未解明の部分が多いが、近年、癌転移における血小板の重要性がクローズアップされていることから、腹膜播種においても血小板と癌細胞の相互作用が関与しているのではないかと仮説を立て、本研究を計画した。

本研究の目的は、腹膜播種の機序を解明し、最終的には血小板と癌細胞のコンタクトに焦点を当てた新規治療法を開発することである。そのため実験系として、まず腹膜播種の頻度が高い進行胃癌患者から回収した血小板と胃癌細胞株の混合培養系を構築し相互作用を詳細に解析する。さらに擬似腹膜播種モデルやマウスへの移植実験を行い、腹膜播種の病態の全容解明を目指す。得られる知見は幅広い癌種の様々な病態に応用可能であり、治療成績向上のみならず生活の質を維持した癌マネジメントに大きく貢献するはずである。

3 研究の方法

本研究では、今まで報告されている動物を用いた血小板と癌の研究や血行性転移モデルを応用してデザインする。すなわち、ヒト胃癌細胞およびヒト胃癌患者由来血小板を用い、腹膜播種における血小板の関与の解明と、新規治療標的の開発を目的とした実験を計画した。実験に用いる血小板は、胃癌患者から採血して精製する。

検討1：電子顕微鏡撮影

まず、胃癌細胞株と血小板を共培養したのち、走査型電子顕微鏡にて撮影する。これにより、癌細胞-血小板複合体形成の様子を視覚的に確認する。

検討2：細胞機能評価

次に、癌細胞に血小板を直接コンタクトさせる実験系を用いて、癌表現型の変化を評価す

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

る。具体的には、進行胃癌患者由来血小板を 48 時間反応させた胃癌細胞株 (GC) と、血小板を反応させないで 48 時間培養した胃癌細胞株 (NT) をそれぞれ用い、遊走能、浸潤能、増殖能、接着能などについて、比較をおこなう。

検討 2 : 分子メカニズム解析

続いて、GC と NT それぞれから RNA を抽出し、細胞内で起こっている RNA レベルの変化を確認する。ここではマイクロアレイ解析を行い着目すべき遺伝子群を抽出し、解析ソフトを用いて主な関連パスウェイの同定を試みる。さらに、GC と NT それぞれからタンパクを抽出し、タンパクレベルでの変化をウェスタンブロット法にて観察する。

上記の実験系は、血小板を癌細胞に直接作用させる系に加え、血小板不透過膜を介した間接触系を作成し、液性因子による作用も評価する。以上の実験を通して、血小板が癌細胞に及ぼす作用を明らかにする。

4 研究の成果

結果 1 : 電子顕微鏡撮影

走査型電子顕微鏡撮影の結果、癌細胞の周囲に接着する多数の血小板が観察され、複合体形成の様子が視覚的に確認された (図 a)。

結果 2 : 細胞機能評価

血小板と直接混合培養することにより、胃癌細胞 (MUGC-3 および MKN74) の増殖能、遊走能、浸潤能、中皮細胞への接着能が、それぞれ有意に増強されることが確認された (図 b)。とくに遊走能、浸潤能の増強が顕著であった。また、血小板不透過膜を用いて間接触系を作成し同様に評価すると、胃癌細胞の悪性度の変化はわずかであった (図 c)。これらの結果から、血小板との主に直接接触を介して、胃癌の悪性度が増強されている可能性が示唆された。

結果 3 : 分子メカニズム解析

マイクロアレイ解析を用いて、血小板の接触による RNA 変化を評価したところ、EMT 関連分子が顕著に変動していることが明らかとなった。EMT 関連機序の関与は、統合的解析からも示唆された。その中でも特に顕著な変動を示した MMP9 の分子 (EMT や胃癌の悪性度に関与することが明らかとなっている) に着目してさらに検討を行うと、やはり血小板の直接接触によって上昇していることが示された (図 d および e)。さらに、タンパク発現についても検証すると、やはり血小板の直接接触により MMP9 タンパクの発現が顕著に増強されていることが明らかとなった (図 f)。

以上より、血小板が胃癌細胞に直接接触することにより、胃癌細胞の悪性度が増強され、主に EMT 関連機序を介して腹膜播種形成に促進的に作用している可能性が示唆された。

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

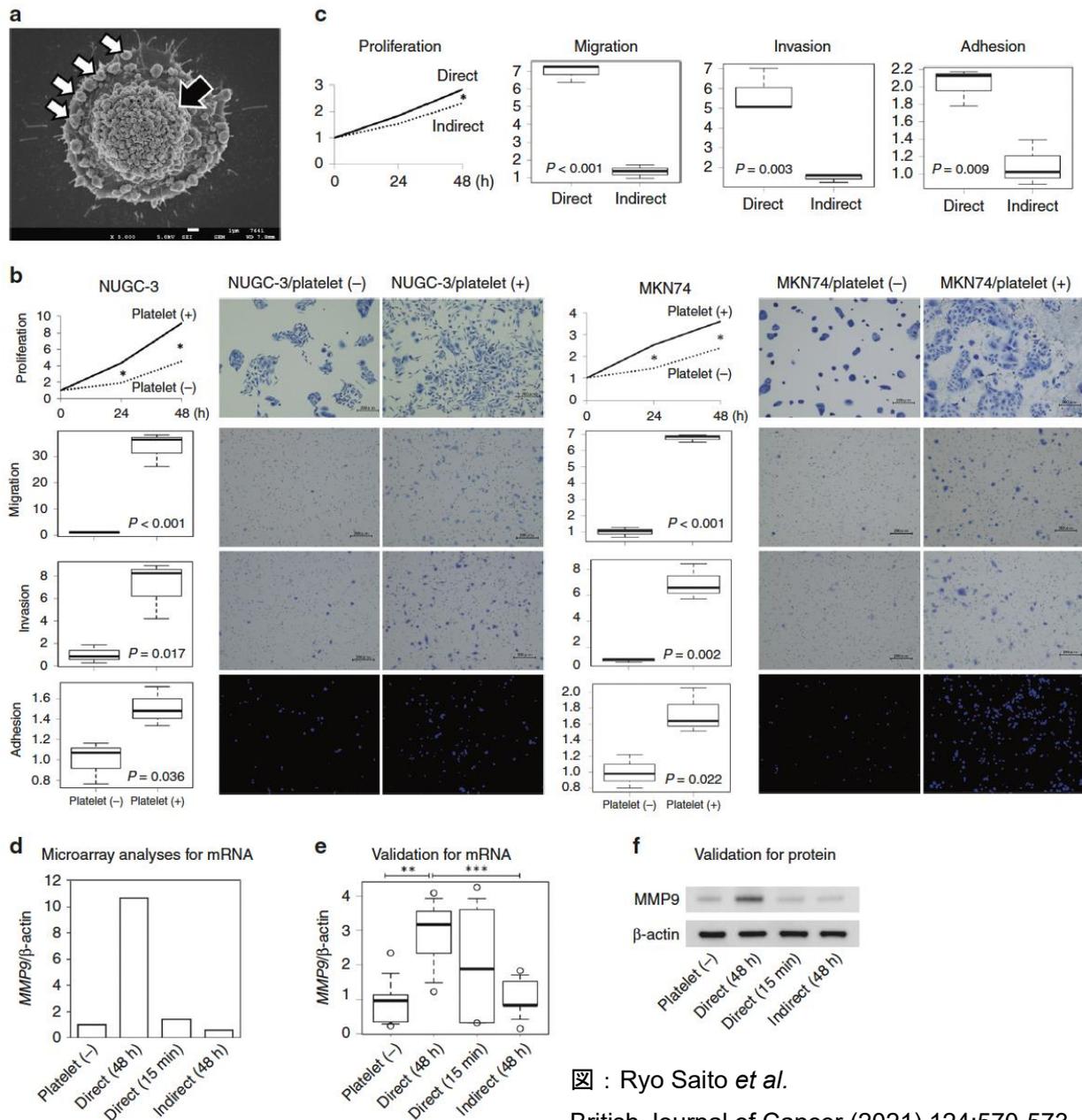


図 : Ryo Saito *et al.*

British Journal of Cancer (2021) 124:570-573 より引用

5 今後の展望

現在は各種阻害実験により、詳細なメカニズムの解明および治療標的となりうる分子が明らかになりつつある。また実験動物を使用した検討も実施している。これらにより、血小板を標的とした、癌の腹膜播種に対する新規かつ有効な治療の臨床応用を目指している。

6 研究成果の発信方法（予定を含む）

British Journal of Cancer 誌（volume 124, pages570–573, 2021）に掲載された。
また国内外の学術集会にて発表され、今後も発信する予定である。

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。