

# がん微小環境ネットワーク解析に基づく HGF/HB-EGF を軸とした胃癌標的治療法の開発

研究代表者

金沢大学 がん進展制御研究所 腫瘍内科 研究分野

金沢大学附属病院 がん高度先進治療センター

安本 和生

## 1. はじめに

胃癌性腹膜炎は、再発症例の半数を占める最も予後不良な難治性の病態である (Duarte I, et al. *Human Pathol* 1981)。しかしながら、本病態の成立機序はいまだ明らかにされていない。本症の特徴として、早期診断が非常に困難であるため病態が完成して初めて治療が開始されるのが実状である。現在、新規抗癌剤の使用や多剤併用療法、投与方法の新たな試みとしての腹腔内投与ならびに点滴・経口投与方法との併用などがさまざまな試みが行われているが、治療効果においては限界があり、いまだ十分な効果は得られていない。本病態の発症進展を効果的に阻止するには、本質的に関わる因子の同定とその制御に基づく新規標的治療法の開発が急務の重要課題である。本症 (胃癌性腹膜炎) は、高度に間質増生を伴うびまん性浸潤発育という特徴的な発育形態を持つ胃癌 (とくにスキルス胃癌) に高頻度に発症するが、発症成因は不明である。機序解明には、癌性腹膜炎指向性胃癌細胞の解析のみならず癌微小環境を形成する間質細胞との特異的かつ相互の発現誘導分子種の中で、本病態を形成する真の責任分子の同定とその関与を明らかにする必要がある。

われわれは初めて、CXCR4/CXCL12 axis が、さらに ErbBR family/EGFR ligands、amphiregulin and HB-EGF axis が、しかも互いに相互促進作用しながら、本病態形成に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた (Yasumoto K, et al. *Cancer Res* 2006, *Clin Cancer Res* 2011)。本研究では、癌の微小環境の新たな視点に基づき癌間質誘導性 Hepatocyte Growth Factor (HGF) を主な標的として、その誘導の鍵を握る EGFR ligand HB-EGF との相互作用の検討から、真の胃癌標的治療法の確立を目指す。

## 2. 材料と方法

- ①ヒト胃癌細胞株ならびに初代培養線維芽細胞 (当科樹立) における EGFR/MET 発現ならびに培養上清中の HB-EGF/HGF 蛋白産生誘導の有無を検討した (Western blot 法, ELISA 法)。
- ②胃癌性腹水中 HB-EGF/HGF 蛋白濃度を ELISA 法により測定した。
- ③ HGF/HB-EGF 両因子による生物活性 (増殖/遊走) 誘導の有無をヒト胃癌細胞株ならびに線維芽細胞において検討した (MTT assay, Migration assay)。

## 3. 結果

- ①癌性腹膜炎指向性 CXCR4高発現胃癌細胞 NUGC4 は EGFR ならびに MET を高発現している。

腹膜播種指向性で CXCR4を高発現する胃癌細胞株 NUGC4は、マウス腹腔内に移植すると早期に血性腹水を伴うヒト癌性腹膜炎と類似した癌性腹膜炎を発症する (Yasumoto, et al. *Cancer Res* 2006)。また、癌微小環境を形成する間質細胞である線維芽細胞が癌の増殖に深い関連性があることが知られている (Karnoub et al. *Nature*, 2007)。そこで、本胃癌細胞 NUGC4ならびに当科樹立初代培養線維芽細胞を用いて EGFR ならびに MET の発現を検討した結果、NUGC4では EGFR ならびに MET が高発現していることが判明した。一方、線維芽細胞においては、EGFR の発現は認められるものの MET の発現は確認されなかった。興味深いことに、EGFR のほか、ErbB4 の発現が認められた。

HGF 蛋白の産生誘導について、胃癌細胞ならびに線維芽細胞の細胞培養上清中の濃度を市販の ELISA kit を用いて検討した結果、NUGC4では、測定感度以下であったが、線維芽細胞では 1 ng/mL 以上の培養

上清中での HGF 蛋白の存在が明らかとなった。さらに、HB-EGF についても同様に検討した結果、胃癌細胞ならびに線維芽細胞両者の培養上清中には HB-EGF 蛋白の存在は認められなかった。

②胃癌性腹水中には高濃度の HGF ならびに HB-EGF が存在する。

胃癌腹膜播種は高頻度に胃癌性腹水を合併する（胃癌性腹膜炎）が、その腹水中には多くの増殖因子が存在することが知られている。そこで、胃癌性腹膜炎を発症した胃癌性腹水中の HGF ならびに HB-EGF 蛋白濃度を ELISA 法により測定した。HGF は平均1.5 ng/mL と胃癌性腹水中に高濃度に存在した。HB-EGF 蛋白は、348 pg/mL と非胃癌性腹水に比して7倍と高濃度に存在した。

③ HGF 刺激は、Akt, ERK のリン酸化の亢進を伴って胃癌細胞 NUGC4 の増殖・遊走（運動性）を強力に増強する。

HGF の CXCR4 発現ヒト胃癌細胞 NUGC4 に対する高い増殖活性が用量依存的に起こることが確認され、これら活性の亢進は、細胞生存シグナルである Akt ならびに ERK の活性化（リン酸化）を伴っていた。また、この反応は非常に早い時期（刺激後10分）から起こることも判明した。

癌の進展には癌間質反応の増強を伴うことが知られている。これまでの検討でヒト線維芽細胞より HGF の産生誘導が起こることが判明したが、MET を発現しない線維芽細胞には、HGF による増殖促進作用（オートクリン作用）は認められなかった。興味深いことに、EGFR リガンドである HB-EGF の刺激により、線維芽細胞から2倍を超える HGF 蛋白の産生誘導が起こることが判明した。さらに、胃癌性腹水中に高濃度に存在する CXCL12 ならびに EGFR ligands の amphiregulin や HB-EGF の線維芽細胞に対する増殖・遊走活性の有無を検討したところ、HB-EGF 刺激により、HGF 蛋白の産生誘導ばかりでなく、Akt ならびに ERK の活性化（リン酸化）を伴う増殖・遊走活性の有意な亢進をもたらし、とくに遊走活性において顕著であった。さらに、SiRNA の検討から、HB-EGF

による線維芽細胞の増殖活性増強は、EGFR よりも ErbB4 が主に関与し、また遊走活性増強には EGFR/ ErbB4 両受容体が関与することが明らかとなった。

#### 4. 考察

癌間質増殖が癌の悪性度や患者の予後と相関することが知られている。胃癌においてもスキルス胃癌に代表されるび浸潤発育胃癌は高頻度に胃癌性腹膜炎を発症する特徴がある。癌細胞のび浸潤と間質増殖の機序を解明し効果的な標的治療法を確立することこそが急務の課題である。

今回、癌細胞の運動（scatter）に関与する HGF の本病態への関与を検討した結果、パラクリン機序で線維芽細胞より産生誘導され、胃癌細胞 NUGC4 の増殖活性ならびに運動性を強力に高めた。癌細胞はその受容体 MET を発現しておりパラクリン機序によりそれら活性化がもたらされると考えられた。興味深いことに、胃癌性腹水中にも高濃度の HGF が存在していることが判明し、高度な繊維化を伴う胃癌性腹膜炎の発症・進展にも関与することが推察された。

HGF 発現には、EGFR ligand である HB-EGF が強力な誘導増殖因子のひとつであることも判明し、両因子の関与が推察された。癌細胞の運動能（scatter）には、HB-EGF とともに HGF の関与が示唆されている（Singh AB et al. J Cell Sci 2003; 117:1365-79）ことから興味深い発見であった。線維芽細胞には EGFR のみならず ErbB4 レセプターも存在しており HB-EGF はこのレセプターをも介することで増殖・運動性の誘導が起こることが今回明らかとなった。

胃癌性腹膜炎の新たな発症進展機序に cMET/ HGF axis の関与、HB-EGF 産生誘導・活性化機序ならびに両者の癌微小環境での相互促進作用の存在ならびに今後の詳細な解明は、胃癌性腹膜炎発症、ひいてはスキルス胃癌発症メカニズムの解明につながり、スキルス胃癌・胃癌性腹膜炎に対する革新的で画期的な胃癌標的治療法開発への発展が期待される。