山梨県若手研究者奨励事業

研究成果報告書

山梨大学大学院総合研究部医学域

外科学講座第 1 教室

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

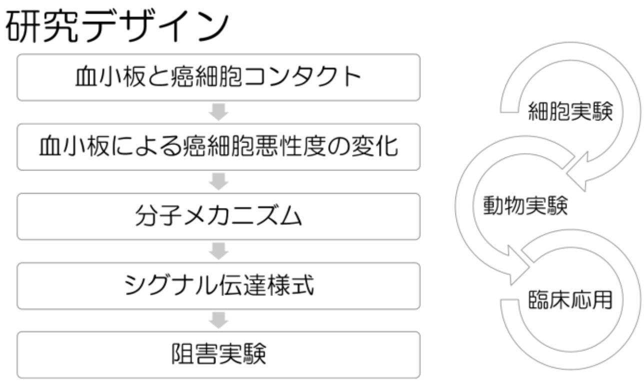
験している。腹膜播種の病態は、血行性転移やリンパ節転移と比べると未解明の部分が多いが、近年、癌転移における血小板の重要性がクローズアップされていることから、腹膜播種においても血小板と癌細胞の相互作用が関与しているのではないかとの仮説を立て、本研究を計画した。

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　対象と方法

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

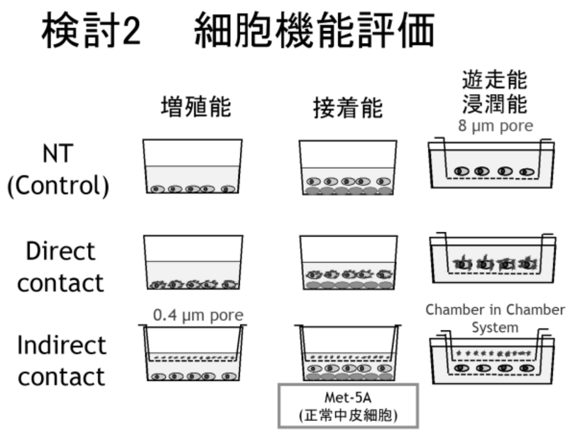
発を目的とした実験を計画した。実験に用いる血小板は、当科にて治療を行う進行胃癌患者から、治療介入まえに採血して、精製した。細胞株は胃癌細胞株として NUGC-3 と MKN74、正常中皮細胞株として Met-5A をそれぞれ購入し用いた。本研究は山梨大学医学部倫理委員会の承認を受け（承認番号 2159)、ヘルシンキ条約に則って実施された。また臨床データと検体の使用、および採血に関して、全ての対象患者から文書による同意を得た。



検討 1：電子顕微鏡撮影

まず、胃癌細胞株 NUGC-3 と血小板を 15 分共培養したのち、余剰血小板を洗浄除去し固定、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る。具体的には、進行胃癌患者由来血小板を反応させた胃癌細胞株（GC）と、血小板を反応させない胃癌細胞株(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。増殖能は 24 時間と 48 時間時点で評価した。

遊走能と浸潤能は 8.0µm の小孔を通過する細胞数をカウントする、トランスウェルアッセイにて評価した。浸潤能評価ではさらに細胞外基質であるマトリゲル®を用いて、これを含めて透過する細胞をカウントした。細胞接着能は、中皮細胞への接着細胞をカウントした。すなわち、まず正常中皮細胞を単層一層の飽和状態になるまで前培養した。その上に、あらかじめ蛍光色素 Hoechst を用いて前標識した胃癌細胞を播種し、90 分反応させる。その後、非接着細胞を穏やかに洗浄除去し、接着した癌細胞のみを蛍光顕微鏡にて観察しカウントした。そ

れぞれの実験系は、血小板を用いないコントロール群（NT)、血小板を直接混合する直接接触系（D)、そして血小板不透過膜（0.4μm の小孔）を用いた間接接触系（I）の 3 群で評価した。これにより、血小板による胃癌細胞の悪性度増強作用の評価を行い、さらに直接接触と間接接触（タンパクなどの液性因子による作用を想定）の比較評価を行なった。

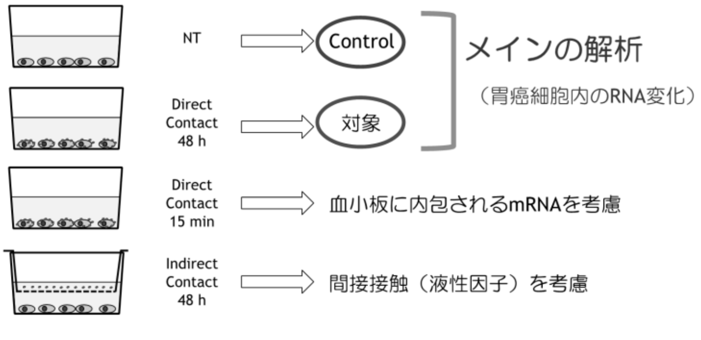
検討 3：分子メカニズム解析

続いて、胃癌細胞から RNA を抽出し、分子メガニズムの解析を行う。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、着目した分子については、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、前述のコントロール群、

検討３　分子メカニズムの解析

1. マイクロアレイ解析によりmRNA変化を網羅的に評価する。
2. Enrichment解析(DAVID)を行い解析する。
3. 着目したmRNAについてRT-qPCR法にて検証を行う。
4. タンパク発現について、Western Blottingにて検証する。



直接接触群、関節接触群に加え、もとも

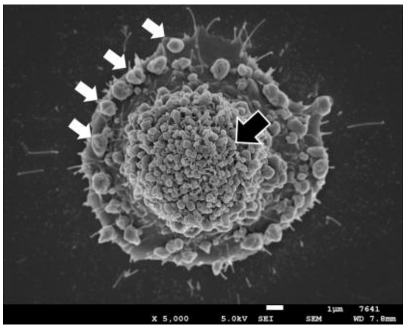
と血小板に内包あるいは表面に発言し

ている分子を考慮し 15 分の短時間接触

により複合体のみを形成した系も評価

した。

4　結果



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（黒矢印➡）の

周囲に接着する多数の血小板(白矢印⇨)が観察され、

複合体形成の様子が視覚的に確認された。

結果 2：細胞機能評価

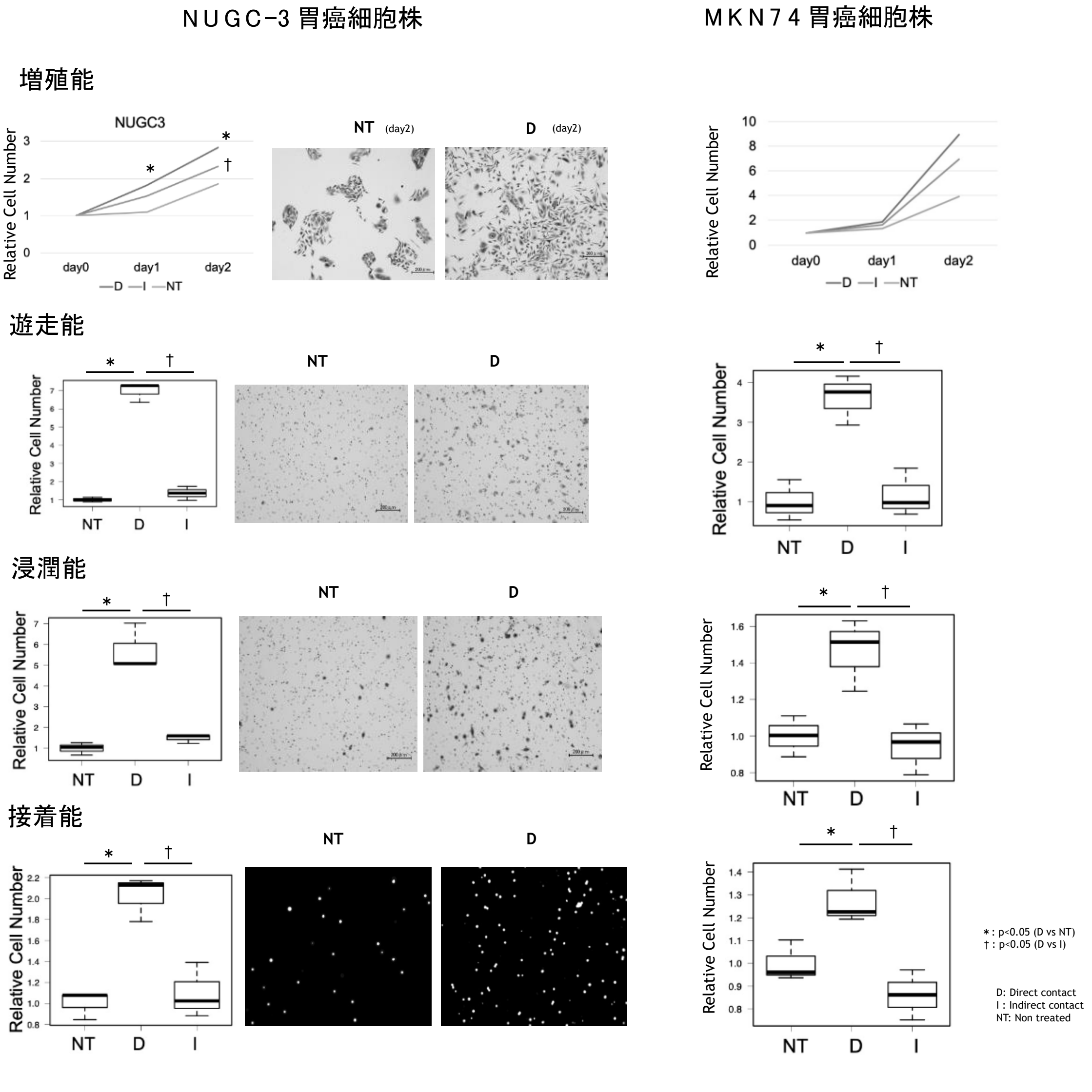
血小板の接触による癌細胞の悪性度の変化を、各種アッセイを用いて評価した。

まず細胞増殖能は、血小板の触接接触（D）により高度に、また間接接触（I）に

おいては中等度に、それぞれコントロール（NT）と比べ増強された。遊走能お

よび浸潤能は、血小板直接接触（D）により顕著に増強されたが、間接接触（I）においては有意な変化は認められなかった。中皮細胞への接着能は、血小板直接接触（D）により軽度ではあるが有意に増強され、一方間接接触（I）では変化は認められなかった。

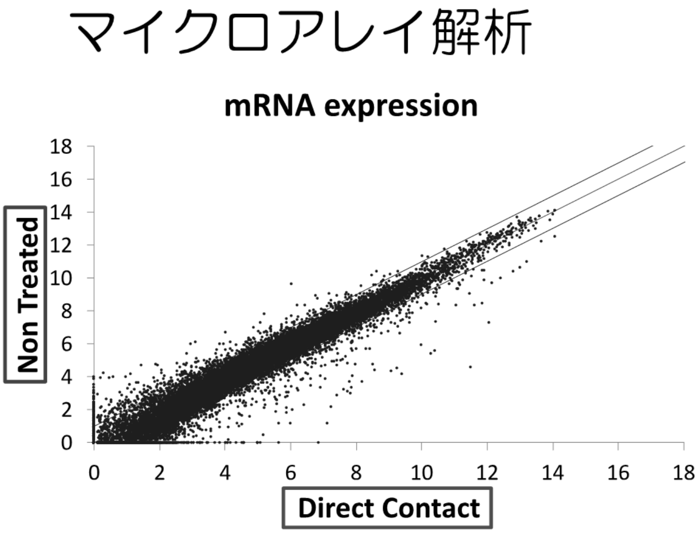
以上より、血小板との直接接触により胃癌細胞の悪性度が増強され、特に遊走能



および浸潤能における変化が顕著であることが明らかとなった。一方で、血小板由来の液性因子を介した間接接触ではその変化はわずかであった。

結果 3：分子メカニズム解析

分子メカニズム解析として、まず血小板の接触により胃癌細胞内に起こる RNA 発現の変化を評価した。NT、48 時間直接接触（D）および間接接触（I)、さらに、短時間接触の 4 系統で RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行なった。その結果、とくに血小板直接接触（D）において、コントロール（NT）と比較しさまざまな分子の変動が起こっていることが明らかとなった。大半は発現上昇をきたしていたが、一部で発現が低下する分子も認められた。



Upregulated mRNAs（Top20）	ratio (Direct/NT)
HBD	73.8
IFI27	38.0
MX2	22.5
IFI44	20.0
HSD11B1	17.8
OASL	17.1
TGFBI	17.0
IFI6	16.8
IFIT1	16.8
C4orf26	15.8
MX1	15.8
CLDN14	15.5
SERPINE1	14.7
AMTN	14.2
SAMD9	13.9
MX2	13.7
STEAP1	13.7
CMPK2	13.0
MMP9	10.7
IFI44L	10.5

図中の各ドットが一つ一つの RNA を示しており、X 軸が直接接触系（D）における発現強度、Y 軸がコントロール（NT）における発現強度を示している。発現上昇を認めた上位 20 分子を示す。

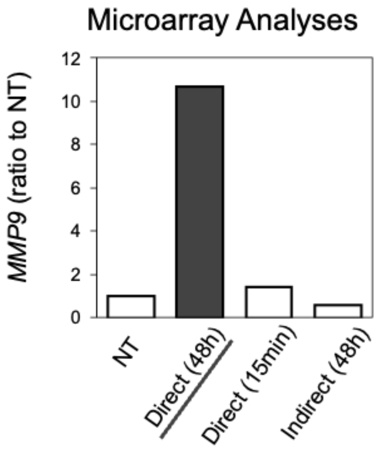
続いて、発現上昇または低下が高度であった分子を抽出し、DAVID®の解析ソフトを用いて Enrichment 解析（統合解析）を行なった。その結果、様々な RNA 発現の変化を反映して多様なパスウェイの存在が示唆されたが、細胞機能評価の結果を裏付けるように遊走能、細胞増殖、あるいは細胞接着に関連したパスウェイの存在も示唆された。

今回は、細胞機能評価の結果から、特に変動が顕著であった遊走能、浸潤能の変化に着目した。これらの細胞機能には、EMT 関連分子が強く関与していることが明らかとなっており、マイクロアレイ解析の結果から EMT 関連分子を抽出しその変動を評価した。その結果、やはり EMT 促進的に変動している分子が多く存在することが明らかとなった。

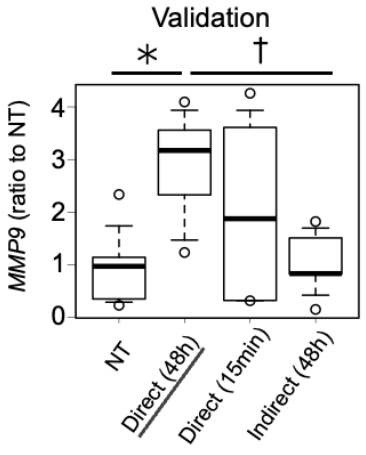
EMT関連分子の変動

mRNA		rate to NT
Gene symbol	description	
	Upregulated	
MMP9	**matrix metallopeptidase 9**	**10.69**
ITGA5	integrin subunit alpha 5	3.72
CTGF	connective tissue growth factor	1.91
JAG1	jagged 1	1.86
FN1	fibronectin 1	1.62
NET1	neuroepithelial cell transforming 1	1.60
SNAI2	snail family zinc finger 2	1.18
	Downregulated	
CLDN1	claudin 1	0.16
KRT18	keratin 18, type I	0.54
TJP1	tight junction protein 1	0.71
CDH1	cadherin 1	0.77
VIM	vimentin	0.81
SDC1	syndecan 1	0.84

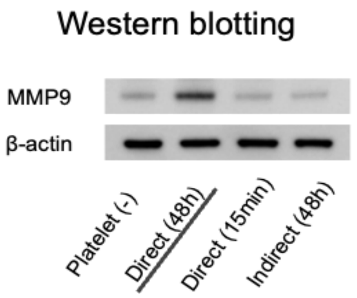
これら EMT 関連分子の中で、matrix metallopeptidase (MMP9)の発現上昇が顕著であったため、この分子に着目して validation を行うこととした。まずマイクロアレイ解析の結果を、反応系ごとに見ると、MMP9 mRNA は直接接触系においてのみ有意に発言が上昇しており、間接接触系や短時間接触系において変動は認められなかった。



続いて、さまざまな胃癌患者から採取した血小板を用いて、多数例における validation を行なった。その結果、短時間接触系では一部で発現上昇を認める症例も存在したものの、やはり同様に直接接触系における変動が顕著であり、間接接触系では変動は認められなかった。



最後に、各アッセイ系において胃癌細胞からタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティング法により発現強度を評価した。その結果、MMP9 タンパクは直接接触系においてのみ発現が増強しており、直接接触系や短時間接触系では発現強度の変化は認められなかった。



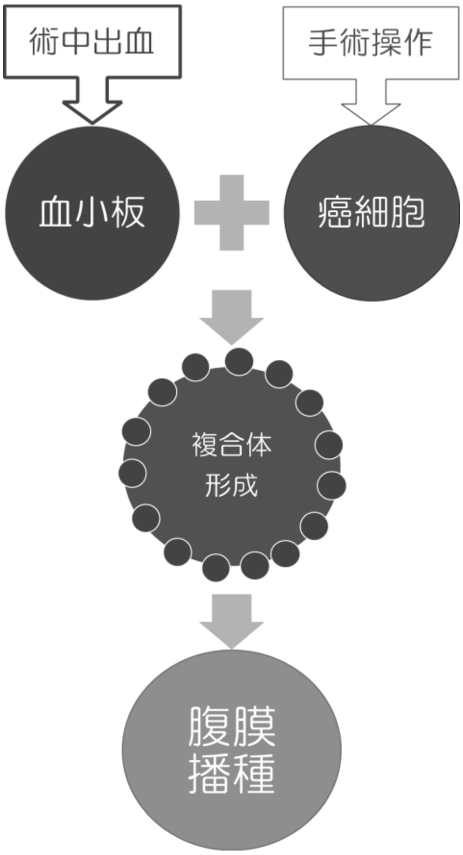
以上の検討の結果、血小板の直接接触により様々な分子の変動が誘導されており、一部で EMT 関連機序の関与が示唆された。MMP9 に着目した検証では RNA

およびタンパクレベルで発現が増強していることが確認された。

5　考察

近年、術後合併症の存在が、癌患者の術後予後を不良にすることが明らかとされ、世界的にもコンセンサスを得ている。その詳細機序は未だ不明な点も多いが、術後合併症による抗腫瘍免疫の抑制などが一因として示唆されている。

一方我々消化器外科医の関心事として、術中の出血量が多いとやはり術後の予後が不良であり、特に胃癌においては腹膜播種再発が多いことが報告されている。この原因としても、免疫状態の関与が示唆されているが、腹膜播種再発が多い理由としては、出血に伴う腹腔内の高炎症状態のほか、血液構成成分の関与が考えられる。一方、血小板と癌進展に関連する報告や、抗血小板剤による抗腫瘍効果（抗転移効果）が示唆されていることから、我々は血液構成成分の中でも



血小板に着目し、本研究を計画した。すなわち、手術操作に伴う出血により供給される血小板と、同じく手術操作に伴いリンパ液中や漿膜露出面等から供給される癌細胞が、腹腔内で複合体を形成し、腹膜播種形成に関与しているのではないか、という仮説を立てた。この仮説を検証すべく、胃癌細胞株と、実際の胃癌患者から採血し精製した血小板を用いて、研究を行なった。

本検討ではまず、胃癌細胞と血小板の複合体形成の様子を電子顕微鏡にて観察した。わずか 15 分の接触でも、複合体を形成する様子が観察された。細胞機能評価では、腹膜播種形成において関連する細胞機能として、増殖能、遊走/浸潤能、中皮細胞への接着能を評価した。増殖能評価においてのみ、間接接触系でも中等度の増殖能増強を認めた。このことから、血小板由来の液性活性因子が、胃癌細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。血小板には本来の止血作用に関連し、細胞内にアルファ顆粒や濃縮顆粒といった、活性因子を含む構造物を

有しており、血小板の活性化に伴い放出され、次々と血小板活性化と活性因子の放出を起こすことが明らかとなっている。また近年では血小板内に含まれる、癌細胞由来の遊離核酸の存在も着目されており、癌細胞への情報伝達や悪性刺激の伝達、あるいは癌バイオマーカーとしての役割に焦点を当てた研究など、幅広く展開されている。

また、細胞機能評価でもっとも顕著な変動を示したアッセイは、遊走/浸潤能であった。これらは癌細胞が局所進展あるいは転移を形成する上で重要な因子であるが、その過程で上皮間葉転換（Epithelial-Mesenchymal transition; EMT）を起こすことが知られている。すなわち、EMT 形質を獲得することで癌細胞は局所にとどまらず周囲へ浸潤あるいは遠隔転移を形成していくのである。本研究において、血小板との直接接触が癌細胞の EMT のスイッチを入れることが示された。この変化は間接接触では見られなかった。すなわち、液性因子を介した反応ではなく、直接接触が EMT 能獲得に重要であることが示唆されている。癌細胞表面には、遺書生に発言するものも含め、様々なタンパク、受容体が発現している。それらの中で、血小板と特異的、あるいは非特異的に結合する分子がいくつか示唆されている。これらの分子のいずれか、または複数の受容体を介した

シグナルが、癌細胞の EMT 能増強に関与していると考えられる。またこれらは癌進展や、腹膜播種をはじめとする癌転移に対する治療標的としての可能性を有していると考えられる。

一般に、EMT の過程において、細胞接着あるいは細胞間接着が減弱し、遊走/浸潤能を獲得すると考えられている。一方で血小板には本来の凝集・止血作用を果たすために種々の接着分子を発現、あるいは内包し、活性化に伴い表面に発現するようになる。また癌細胞の表面にも血小板と結合しうる分子が種々発言していることも指摘されており、これらを介した結合が、中皮細胞への接着を増強させた可能性が考えられる。しかし、血小板、癌細胞、中皮細胞の間でどのような結合が起こり、あるいは血小板による中皮細胞自体の変化など、不明な点も多く存在しており、今後の検討課題である。以上、血小板による様々な影響の結果、細胞増殖能、遊走/浸潤能、そして中皮細胞への接着能が増強されることが示されており、これらはいずれも腹膜播種形成に対して促進的に作用している可能性が考えられる。

5　今後の展望

現在は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を明らかにすべく、各分子を標的とした阻害実験を行なっている。また実験動物における検証も実施している。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）

本研究の内容は British Journal of Cancer 誌に掲載された。

Saito R, Shoda K, Maruyama S, Yamamoto A, Takiguchi K, Furuya S, Hosomura N, Akaike H,

Kawaguchi Y, Amemiya H, Kawaida H, Sudo M, Inoue S, Kono H, Suzuki-Inoue K and Ichikawa D: Platelets enhance malignant behaviours of gastric cancer cells via direct contacts. Br J Cancer 124(3): 570-573, 2021. PMID: 33110200. DOI: 10.1038/s41416-020-01134-7

また国内外の学術集会にて発表し、今後も発信する予定である。