

氏名	仲山 孝
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工農博4甲 第95号
学位授与年月日	令和6年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	医学専攻
学位論文題名	Inhibition of cancer cell-platelet adhesion as a promising therapeutic target for preventing peritoneal dissemination of gastric cancer (癌細胞と血小板の直接接触に着目した新たな胃癌腹膜播種治療標的の開発)
論文審査委員	委員長 教授 宮澤 恵二 委員 准教授 市川 二郎 委員 講師 久保 智広

学位論文内容の要旨

研究目的

胃癌における腹膜播種は、進行胃癌に対する根治切除後の最も多い転移形式であり、予後不良である。近年腹膜播種形成に関連する様々な分子メカニズムが解明されつつあるが、未だに有効な治療法に乏しく、予後不良の原因となっている。これまでの報告では術中出血量は術後の腹膜播種再発に影響を及ぼすとされているが、詳細な分子メカニズムは明らかとなっていない。そこで我々は血液成分の血小板に着目し、胃癌細胞と血小板の直接接触により、胃癌細胞と血小板の複合体が形成し、それに伴い胃癌細胞の悪性度が増強されることを報告してきた。

今回我々は胃癌細胞と血小板の直接接触により、胃癌細胞の悪性度が増強される分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、胃癌細胞と血小板の直接接触に関わる分子 (Galectin-3 - GPVI, Podoplanin - CLEC-2, fibrinogen - integrin α IIb β 3) に着目した。胃癌細胞の悪性度増強に最も関与している経路を検証し、さらに直接接触を阻害することで胃癌腹膜播種における新規治療標的として応用することを目指した。

方法

胃癌細胞と血小板の相互作用を検証するため以下の項目を検討した。

- ① 胃癌細胞と血小板の直接接触において、胃癌細胞の悪性度増強に最も影響を及ぼす分子の検索
胃癌細胞株 (NUGC-3) を用いて、Galectin-3 - GPVI, Podoplanin - CLEC-2, fibrinogen - integrin α IIb β 3 に対する阻害薬を使用した。NUGC-3 の遊走能・浸潤能は、血小板との直接接触で増強されることを既に我々は報告しているが、血小板による増強効果を最も抑制する阻害薬を検証した。
- ② マウス胃癌細胞株 (YTN16) を用いて、阻害薬の効果を *in vitro* で検証
①において Galectin-3 - GPVI に対する阻害薬 (GB1107, JAQ1) が最も胃癌細胞の悪性度抑制効果を示した。そこで *in vivo* 実験の前段階として、マウスの胃癌細胞株である YTN16 とマウス血小板を用いて GB1107 と JAQ1 の効果を *in vitro* で再確認した。
- ③ マウス胃癌腹膜播種モデルを用いた GB1107 と JAQ1 の効果を検証
YTN16 を用いてマウス胃癌腹膜播種モデルを形成し、血小板が胃癌細胞に及ぼす影響を GB1107 と JAQ1 を用いて抑制できるか検証した。NT群 (コントロール群)、mPLT群 (血小板投与群)、JAQ1群 (血小板+JAQ1投与群)、GB1107群 (血小板+GB1107投与群)、JAQ1+GB1107群 (血小板+JAQ1+

GB1107投与群)の5群間で、腫瘍数、腫瘍総重量を測定し、比較した。

結果

- ① 阻害薬としては GPVI に対して JAQ1、CLEC-2 に対して Cobalt hematoporphyrin (Co-HP)、integrin α IIb β 3 に対して Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro (GRGDSP)を用いた。
NUGC-3 における遊走能評価にて、JAQ1 は血小板による増強効果を 40%程度に抑制した ($p<0.01$)。一方で Co-HP と GRGDSP は有意な抑制効果を認めなかった。
- ② YTN16とマウス血小板を用いて、JAQ1の効果を再検証した。JAQ1はYTN16を用いた遊走能・浸潤能実験においても、血小板の癌細胞に及ぼす影響を有意に抑制した ($p<0.001$)。さらに Galectin-3に対する阻害薬であるGB1107の効果も検証し、遊走能を有意に抑制した ($p=0.044$)。GB1107とJAQ1の併用は最も良好な抑制効果を示した (遊走能: $p=0.003$ 、浸潤能: $p=0.002$)。
- ③ YTN16を用いたマウス胃癌腹膜播種モデルにおいて、JAQ1群はmPLT群と比較して有意に腫瘍数、総腫瘍重量を抑制した ($p=0.043$ 、 $p=0.044$)。JAQ1+GB1107群ではより高い抑制効果を得られた。 ($p=0.042$)

考察

- ① 胃癌細胞と血小板の直接接触阻害は、それらの相互作用を抑制し、癌細胞の悪性度抑制につながる事が示唆された。特に胃癌細胞においてはGalectin-3 - GPVIが癌細胞の悪性度に影響を及ぼしていることが判明した。Galectin-3の阻害は血小板との接触阻害のみならず、癌細胞自体の遊走能浸潤能にも影響を及ぼすと報告があり、Galectin-3とGPVIは共に胃癌細胞と血小板の相互作用においてkey roleを担っている可能性が示唆された。
- ② 今回YTN16を用いた理由としては、JAQ1がマウス血小板に対する抗体であることから、YTN16(マウス胃癌細胞株)、マウス血小板、JAQ1を用いて以後の検討を行った。まずin vitroで遊走能・浸潤能を評価すると、JAQ1単独使用でも有意に血小板による効果を抑制し、異なる胃癌細胞株でも有用性を再確認した。さらにGB1107の併用により、さらに高い抑制効果が得られたのは、①で述べた機序が影響していることが考えられた。
- ③ 最後にin vitroの結果をマウス胃癌腹膜播種モデルにて検証した。in vivoにおいても同様の所見が得られており、腫瘍数・腫瘍重量に有意な差が出ていることから、胃癌細胞と血小板の直接接触が腹膜播種形成・進展において重要な役割を果たしており、さらにkey roleとなるGalectin-3 - GPVIが新規治療標的となり得ることが示唆された。

結論

結論として、Galectin-3 - GPVI に対する阻害薬により、胃癌細胞における血小板誘発性の悪性度増強を抑制することが in vitro と in vivo にて示された。したがって Galectin-3 と GPVI の相互作用は、胃癌患者の腹膜播種を予防するための有望な治療標的となり得る。

論文審査結果の要旨

1. 学位論文研究テーマの学術的意義

本研究は、胃がんの腹膜播種の予防手法の開発を目的とした基礎的検討である。がん細胞と血小板の接触が、がんの悪性度を増強することは以前から報告されていた。本研究では、さらに進んで、胃がん細胞と血小板の接触が腹膜播種による再発に影響する可能性に注目している。まず、胃がん細胞と血小板の相互作用に関与する分子として **galectin-3** (胃がん細胞側) と **glycoprotein VI (GPVI)** (血小板側) を同定した。また、血小板による胃がん細胞の *in vitro* 運動能・浸潤能亢進効果を、GPVI の中和抗体である **JAQ1** が阻害できることを明らかにした。さらに *in vivo* の腹膜播種モデルでも血小板による増悪作用を **JAQ1** が有意に抑制することを証明した。本研究は、術中の出血が腹膜播種につながる可能性を示すとともに、腹膜播種の予防のための分子標的候補を同定したという学術的意義を有する。

2. 学位論文及び研究の争点、問題点、疑問点、新しい視点等

本研究の成果については臨床応用への方向性も期待されるが、現時点では *in vitro* および *in vivo* のモデル系での検討である。実際に胃がん細胞と血小板の接触が術後の腹膜播種に関与しているかどうか、今後は患者検体を用いた免疫組織学的な検証等も必要であろう。また、血小板の胃がん細胞への作用を媒介する因子については、血小板の顆粒成分の一つである **TGF- β** が有力視されている。阻害剤を用いた予備的データも示されているが、*in vitro* 実験は細胞運動性・浸潤能の測定のみにとどまっている。血小板による腹膜播種の促進に直結する細胞応答の解明も重要であり、これに対応した *in vitro* 実験のリードアウトで検証すれば、他の因子の重要性が明らかになる可能性も考えられる。

3. 実験及びデータの信頼性

In vitro での細胞生物学的検討ではコントロール実験が適切であり、堅実な方法で実施されている。また、動物実験も含め、統計処理により有意差検定が行われている。したがって、信頼性は高いものと考えられる。

4. 学位論文の改善点、等々

すでに出版された学位論文の記載に不備があったので、訂正記事の添付を求めた。訂正記事については、最終的に委員長が確認した。