

200924008A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略事業

がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 落合 淳志

平成22(2010)年5月

目 次

I	総括研究報告書	1
	がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく 診断・治療法の開発に関する研究	3
	落合 淳志	
II	分担研究報告書	9
	1. MMP/ADAM の癌病態での作用と評価法の開発 ：ADAM28 を中心にして	11
	岡田 保典	
	2. 病理材料・in vivo モデルを用いたがんの発育進展機構の解明	17
	坂元 亨宇	
	3. 消化管腫瘍の病理組織像に対する Wnt シグナルと TGF- β シグナルの作用	21
	加藤 光保	
	4. がん組織の階層構造の解明と起源細胞の可視化	23
	平尾 敦	
	5. がん間質における宿主免疫	27
	深澤 由里	
	6. グライコームの解析に基づくがんの診断法、治療応答性 ・転移再発予測法の開発	31
	神奈木 玲児	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	35

I 総括研究報告書

がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に関する研究

落合 淳志

がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に関する研究

研究代表者 落合 淳志 独立行政法人 国立がん研究センター東病院臨床開発センター
臨床腫瘍病理部・部長

研究要旨：本研究は、がん病理・病態学的特性をがん細胞と間質細胞を含めたがん組織全体の分子機構として明らかにすることにより、浸潤・転移やがん患者予後に関わる癌生物像に関わるがん細胞と間質細胞の相互作用やがん微小環境を明らかにするものである。また、がん組織において特徴的な、がん細胞と間質細胞の相互作用やがん微小環境を標的とした新しい診断法・治療法を見出すことを目的とするものである。本年度は以下の研究成果を得た。1) 膵臓がんの神経浸潤モデルを作製し、神経浸潤距離に相関してマウスの食餌量の減少を伴わない体重減少と疼痛の増加が認められた。また、神経浸潤と血清中のIL-6量が強い相関があることが示された。2) 分化型ヒト扁平上皮がん幹細胞マーカーであるポドプラニンの機能を阻害すると、がん幹細胞としての機能が阻害されることより、ポドプラニンは機能を有するがん幹細胞マーカーであることを示した。3) 血管周囲外膜より培養した間質線維芽細胞はヒト肺腺癌細胞の免疫不全マウスにおける生着に関わることを示したが、この間質線維芽細胞の産生するポドプラニンの働きが、同時に移植したがん細胞の生着能を変化させることを示した。4) 神経浸潤モデルで見出された膵がん患者のIL-6のシグナルを阻害する抗IL-6受容体抗体治療の第一相臨床試験を膵臓がん患者に対して行った。

A.研究目的

がんの生物像はがん細胞の遺伝子変化の蓄積に規定されるのではなく、がん細胞とがん組織を構築する間質線維芽細胞とが創り出すがん微小環境により大きく影響を受ける。特にがん組織に特徴的な病理形態・病態はがんの悪性度と強い相関を示し、これら病理・病態学的変化はがんの生物像を規定する分子基盤に関わっていることが強く推察される。今年度はこれまで作製された動物モデルを基に以下の結果を得た。

1) 膵臓がんの神経浸潤モデルを作製し、神経浸潤距離に相関してマウスの食餌量の減少を伴わない体重減少と疼痛の増加が認められた。また、神経浸潤と血清中のIL-6量が強い相関があることが示された。2)

分化型ヒト扁平上皮がん幹細胞マーカーであるポドプラニンの機能を阻害すると、がん幹細胞としての機能が阻害されることより、ポドプラニンは機能を有するがん幹細胞マーカーであることを示した。3) 血管周囲外膜より培養した間質線維芽細胞はヒト肺腺癌細胞の免疫不全マウスにおける生着に関わることを示したが、この間質線維芽細胞の産生するポドプラニンの働きが、同時に移植したがん細胞の生着能を変化させることを示した。4) 神経浸潤モデルで見出された膵がん患者のIL-6のシグナルを阻害する抗IL-6受容体抗体治療の第一相臨床試験を膵臓がん患者に対して行った。

B.研究方法

1) 膵臓がんの神経浸潤モデルを用いて、マウスの食餌量と体重変化ならびに疼痛の変化を調べた。また、脊髄の組織における分子発現を免疫組織学的に行った。

2) 分化型ヒト扁平上皮がん幹細胞マーカーであるポドプラニンの機能明らかにする目的で、ポドプラニン発現するA431細胞のポドプラニン発現をshRNA法により抑制し、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能を確認した。また、同時に薬剤耐性能などが幹細胞の機能を検索しポドプラニンが機能性分子として何に働いているかを検討した。

3) 血管周囲外膜より培養した間質線維芽細胞はヒト肺腺癌細胞の免疫不全マウスにおける生着に関わることを示したが、この間質線維芽細胞の産生するポドプラニンの発現を変化させ、ヒト肺線がん細胞株A549の免疫不全マウスへの腫瘍形成能を確認した。また、試験管内におけるコロニー形成能における間質線維芽細胞の、同時に移植したがん細胞の生着能を検討した。

4) 神経浸潤モデルで見出された膵がん患者のIL-6のシグナルを阻害する抗IL-6受容体抗体治療の第一相臨床試験を膵臓がん患者に対して行った。

C.研究結果

1) 膵臓がんの神経浸潤モデルにおいて、坐骨神経におけるがん細胞の神経浸潤距離に相関してマウスの食餌量の減少を伴わない体重減少と疼痛の増加が認められた。これは、膵臓がん患者におこる悪液質の新しい動物モデルとして意義があると考えられた。同時に、神経浸潤マウスではがん細胞を移植した反対側の足における知覚が変化しており、ヒト癌における異痛を示しているものと考えられた。ヒト膵がん細胞を移植した坐骨神経の起始部における脊髄組織を観察したところ、腫瘍細胞を移植した坐骨神経側の脊髄にグリア細胞の活性化が高く認められた。また、本動物モデルにおける血中のサイトカインを検索すると、マウ

スおよびヒトの血清中のIL-6量が強い相関があることが示された。

2) 分化型ヒト扁平上皮がんA431細胞を用いてがん幹細胞マーカーであるポドプラニンの機能を阻害すると、A431細胞の免疫不全マウスにおける腫瘍形成が低下した。また、ポドプラニン発現が変化することで、抗癌剤に対する薬剤耐性能も変化することが示された。これらの結果は、ポドプラニンは機能を有するがん幹細胞マーカーであることを示している。

3) 血管周囲外膜より培養した間質線維芽細胞はヒト肺腺癌細胞の免疫不全マウスにおける生着に関わることを示したが、この血管外膜由来線維芽細胞の発現するポドプラニンを抑制すると、同時に移植したヒト肺腺癌細胞株A549の免疫不全動物への腫瘍形成能が抑制された。また、試験管内コロニー形成能を調べたところ、ポドプラニンを発現する線維芽細胞とともに形成されたコロニー数は、発現抑制線維芽細胞により形成されるコロニー数より低下することを示した。間質線維芽細胞の産生するポドプラニンの働きが、同時に移植したがん細胞の生着能を変化させることを示した。

4) 神経浸潤モデルで見出された膵がん患者のIL-6のシグナルを阻害する抗IL-6受容体抗体治療の第一相臨床試験を膵臓がん患者に対して行った。

D.考察

1) 膵臓がんの神経浸潤モデル

本神経浸潤モデルが、ヒト膵臓がん患者の病態である悪液質および異痛のモデルとして利用できる可能性が示された。ヒトがん患者の悪液質モデルはこれまで報告があるが、神経浸潤で悪液質が起こる報告は初めてであり、今後このモデルを用いた分子基盤の解明により、新しい膵がん悪液質の機構が明らかになるとともに、その治療標的も検討できると考えられる。また、がん性疼痛は膵臓がん患者だけでなく、様々ながん患者に起こり、患者のQOLに関わる重

要なテーマである。今回、がんの神経浸潤によりがん性疼痛が強くなるのが初めて動物モデルで示されたが、これら疼痛機構の解明と、現在のがん性疼痛の治療における変化を検討するためには極めて重要なモデルになりえると考えられる。今後、このモデルを用いて、がん性疼痛の分子機構を明らかにするとともに、新しいがん性疼痛の治療法を開発する予定である。

2) 分化型ヒト扁平上皮がん幹細胞の同定と機能解析

分化型扁平上皮がん幹細胞マーカーであるポドプラニンの機能は腫瘍形成ならびに薬剤耐性機構に重要な役割を果たしていることが明らかになった。これまでのがん幹細胞マーカーは機能性分子ではなかったが、今回の研究で、ポドプラニン発現するA431細胞のポドプラニン発現をshRNA法により抑制し、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能を確認し、また、薬剤耐性能などがん幹細胞の機能にもポドプラニンが重要な役割を果たしていることが明らかになったが、これまで作ったモデルを用いてがん幹細胞の分子機構を明らかにできると考えられる。

3) 血管周囲外膜より培養した間質線維芽細胞はヒト肺腺癌細胞の免疫不全マウスにおける生着に関わることを示したが、この間質線維芽細胞の産生するポドプラニンの発現を変化させ、ヒト肺線がん細胞株A549の免疫不全マウスへの腫瘍形成能を確認した。これらの結果は、がん組織を形成する間質線維芽細胞が、腫瘍形成能を変化させることを示しており、ヒトがん細胞とヒト間質細胞の構成するがん微小環境ががん生物像を規定することを初めて示したものと考える。

4) 神経浸潤モデルで見出された膵がん患者のIL-6のシグナルを阻害する抗IL-6受容体抗体治療の第一相臨床試験を膵臓がん患者に対して行った。これは、本研究班で行ってきた動物モデルから明らかになった分子機構を標的とした新しい治療法を実際のヒト治療に応用したトランスレーショナル研究であるとともに、膵がんにおける初め

ての分子標的治療になりうると考えられる。

E. 結論

今年度の成果により、がん生物像に関わる新しい分子基盤の研究がすすみ、その一部は臨床への応用がすすめられた。今後、その他の分子機構に関してもモデル作製で得た情報を基に治療への応用を展開できると考えられる。

F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべきものはありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito T, Ishii G, Nagai K, Nagano T, Kojika M, Murata Y, Atsumi N, Nishiwaki Y, Miyazaki E, Kumamoto T, Ochiai A. Low podoplanin expression of tumor cells predicts poor prognosis in pathological stage IB squamous cell carcinoma of the lung, tissue microarray analysis of 136 patients using 24 antibodies. *Lang Cancer* 2009;63:418-424.
2. Shichuan Zhang, Hayashi R, Fujii M, Hasegawa Y, Yoshino K, Fukayama M, Ochiai A. Total Microvessel Perimeter Per Tumor Area Is a Predictor of Radiosensitivity In early-Stage Glottic Carcinoma. *Int.J.Radiation Oncology Biol.Phys* 2009;73:1104-1109.
3. Maeda H, Yonou H, Yano K, Ishii G, Saito S, Ochiai A. Prostate-specific antigen enhances bioavailability of insulin-like growth factor by degrading insulin-like growth factor binding protein 5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;381:311-316.
4. Kim Y, Ishii G, Goto K, Ota S, Kubota

- K, Murata Y, Mishima M, Saijo N, Nishiwaki Y, Ochiai A. Expression of breast cancer resistance protein is associated with a poor clinical outcome in patients with small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009;65:105-111.
5. Shirasu M, Nagai S, Hayashi R, Ochiai A, Touhara K. Dimethyl Trisulfide as a Characteristic Odor Associated with Fungating Cancer Wounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(9):2117-2120, 2009.
6. Shimada Y, Ishii G, Nagai K, Atumi N, Fujii S, Yamada A, Yamane Y, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Ikeda N, Ochiai A. Expression of podoplanin, CD44 and p63 in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Sci.* 2009;100(1):2054-9.
7. Kojika M, Ishii G, Yoshida J, Nishimura M, Hishida T, Ota SJ, Murata Y, Nagai K, Ochiai A. Immunohistochemical differential diagnosis between thymic carcinoma and type B3 thymoma: diagnostic utility of hypoxic marker, GLUT-1, in thymic epithelial neoplasms. *Mod Pathol.* 2009;22(10):1341-50.
8. Shomori K, Ochiai A, Akimoto S, Ito Y, Shudo K, Ito H, Hirohashi S. Tyrosine-phosphorylation of the 12th armadillo-repeat of beta-catenin is associated with cadherin dysfunction in human cancer. *Int J Oncol.* 2009;35(3):517-24.
9. Horimatsu T, Sano Y, Kaneko K, Ikematsu H, Katagiri A, Yano T, Fukui M, Muto M, Fujii S, Ochiai A, Yoshida S. Relationship between MVD and meshed-capillaries using magnifying NBI colonoscopy in colorectal precursor lesions. *Hepatogastroenterology.* 2009;56(90):372-7.
10. Fujimoto H, Sangai T, Ishii G, Ikemura A, Nagashima T, Miyazaki M, Ochiai A. Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression. *Int J Cancer.* 2009;125 (6): 1276-84.
11. Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T, Saito N, Ochiai A, Tomita M, Esimi H, Soga T. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res.* 2009;69(11):4918-25.
12. Nakano M, Ishii G, Nagai K, Kawase A, Kenmotsu H, Kon-No H, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Ochiai A. Prognostic significance of carbonic anhydrase IX expression by cancer-associated fibroblasts in lung adenocarcinoma. *Cancer.* 2009;115(12):2732-43.
13. Ito TK, Ishii G, Saito S, Yano K, Hoshino A, Suzuki T, Ochiai A. Degradation of soluble VEGF receptor-1 by MMP-7 allows VEGF access to endothelial cells. *Blood.* 2009;113(10):2363-9.
14. Ota S, Ishii G, Goto K, Kubota K, Kim YH, Kojima M, Murata Y, Yamazaki M, Nishiwaki Y, Eguchi K, Ochiai A. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. *Lung Cancer.* 2009;64(1):98-104.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特にありません。
1. 特許取得

国際

発明の名称:神経浸潤抑制剤

出願番号:PTC/JP/2009/060314

落合淳志、他1名

発明の名称:上皮性癌の患者の処置方法

出願番号:61/247,002

落合淳志、他1名

国内

発明の名称:特異的膜抗原に対する抗体を
選択的に認識する抗体含有
する癌治療剤

出願番号:特願2009-165458

落合淳志、他1名

II 分担研究報告書

1. MMP/ADAM の癌病態での作用と評価法の開発：ADAM28 を中心にして
岡田 保典
2. 病理材料・in vivo モデルを用いたがんの発育進展機構解明
坂元 亨宇
3. 消化管腫瘍の病理組織像に対する Wnt シグナルと TGF- β シグナルの作用
加藤 光保
4. がん組織の階層構造の解明と起源細胞の可視化
平尾 敦
5. がん間質における宿主免疫
平岡 伸介
6. グライコームの解析に基づくがんの診断法、治療応答性・転移再発予測法の開発
神奈木 玲児

MMP/ADAMの癌病態での作用と評価法の開発：ADAM28を中心にして

分担研究者 岡田 保典 慶應義塾大学医学部病理学教室 教授

研究要旨：ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 分子は、MMP (matrix metalloproteinase) とメタロプロテアーゼドメインを共有するMMP近縁遺伝子ファミリーであり、がん組織内微小環境因子代謝を介してがん細胞の増殖・進展に作用すると考えられている。我々の研究グループは、ADAM遺伝子ファミリー分子のうち、ADAM28がヒト肺癌や乳癌において癌細胞特異的に発現し、これら癌細胞の増殖・浸潤・転移に関わる可能性を報告するとともに、ADAM28のアッセイ系の開発により、肺癌患者血清中のADAM28濃度は、病期の進行、リンパ節転移、腫瘍径に相関することを明らかにしてきた。本研究では、ADAM28の新規基質としてvon Willebrand factor (VWF)を見出し、その切断部位を決定した。また、VWFはADAM28非発現性癌細胞株ではアポトーシスを誘導するのに対し、ADAM28発現性細胞株ではADAM28によるVWF分解によりアポトーシスを回避し、肺血管内での生存延長により肺転移が促進することを明らかにした。一方、Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cellsを多種類のがん遺伝子で形質転換することにより、ADAM28はv-Srcによる形質転換で特異的に誘導されることを示した。

A.研究目的

ADAM遺伝子ファミリーは、癌組織内微小環境因子代謝を介して癌細胞の増殖・浸潤・転移に関わると考えられている。我々は、独自のデータに基づき、本遺伝子ファミリー分子の中でもADAM28がヒト乳癌と肺癌において癌細胞特異的に発現し、癌細胞の増殖・転移と正の相関を示すことを報告してきた。また、ADAM28は増殖因子代謝により乳癌細胞の増殖に重要な役割を果たすことを明らかにした。しかし、ADAM28による転移促進作用機構に関しては不明であり、癌細胞特異的発現を来すメカニズムに関しても全く情報はない。そこで、本研究課題では、ADAM28の新規基質を探索するとともに、その基質分解と癌細胞転移との関連を検討するとともに、ADAM28の遺伝子発現メカニズムをがん遺伝子導入による形質転換との関連から検討した。

B.研究方法

ADAM28の新規基質の探索と特異的結合の証明:ADAM28の disintegrin-like/cysteine-rich /secreted-specific

ドメインをbaitにして、yeast two-hybrid systemにより、ヒト肺cDNAライブラリーよりADAM28結合候補分子をスクリーニングした。また、候補分子に対するADAM28の結合ドメインをyeast two-hybrid assayにより検討した。さらに、タンパク質レベルでの結合を調べるために、結合候補分子の一つであるvon Willebrand factor (VWF) タンパク質をプレート上に固相化し、¹²⁵Iで標識したリコンビナントADAM28とインキュベートし、ADAM28のVWFへの結合能を検証した。さらに、特異的結合能を証明するために、抗VWF抗体 (Dako 社) 処理や過剰量の非標識ADAM28添加による結合阻害実験を行った。

ADAM28によるVWF分解と切断部位の決定: グアニジン塩酸存在・非存在下で、精製ヒト血漿由来VWFを活性型ADAM28で37℃、18時間反応後、SDSアガロースゲル電気泳動法でマルチマー解析を行った。また、ADAM28によるVWFの切断部位を分解産物のN末端アミノ酸シーケンスにより決定し、ADAMTS13 (VWF-cleaving protease) によるVWF切断部位と比較・検

討した。さらに、活性型ADAM28とADAMTS13の分解活性を後者に対する蛍光標識基質(FRETS-VWF73:ペプチド研究所)を用いて比較した。

VWFによるアポトーシス誘導と

ADAM28の作用解析: ADAM28を高発現する癌細胞株(PC-9、MDA-MB231、Caki-2)と非発現癌細胞株(MCF-7、HepG2)を種々の濃度のVWF存在・非存在下で培養し、DNA fragmentation ELISAアッセイ法(Roche社)とTunnel染色により、アポトーシス細胞を検出した。また、ADAM28高発現肺癌細胞株(PC-9細胞)を用いて、ADAM 阻害剤、ADAM28の中和抗体、ADAM28 siRNA処理によりADAM28の発現や活性を抑制後、VWF処理によるアポトーシス誘導活性を検討した。同時に、上記細胞の培養上清中のVWFの分解を還元状態で電気泳動(SDS-PAGE; 5-20% グラディエントゲル)し、抗VWF抗体を用いたイムノプロット法で検出した。VWFによるアポトーシスがVWF-インテグリン系を介しているかを調べるために、細胞を抗インテグリン($\beta 3$ 、 αv 、 αIIb)抗体処理し、VWF誘導性アポトーシスを検討した。VWF-インテグリンによる癌細胞のアポトーシスにおける細胞内シグナルを検証するために、cleaved caspase-3とp53のリン酸化をそれぞれの特異的抗体を用いてイムノプロット法で検討し、そのシグナルが抗インテグリン($\beta 3$ 、 αv 、 αIIb)抗体やADAM阻害剤処理により抑制されるかを調べた。

バイオイメーキング法を用いた転移モデルの開発とADAM28癌転移促進作用の検証: ADAM28高発現肺癌細胞株(PC-9細胞)にレンチウイルスを用いてVenus(GFPの改変体)とルシフェラーゼを恒常的に発現させる安定細胞株(PC-9^{Venus-Luc}細胞)を作製した。その細胞をNOD/SCIDマウスの尾静脈へ注入し、ルシフェリンの腹腔内投与後に癌細胞転移をXengogen-IVIS100 cooled CCD optical macroscopic imaging system (SC BioScience Corporation)を用いてバイオイメーキング法によりリアルタイムにモニターした。また、同細胞におけるADAM28の発現をshRNAで恒常的にノックダウンさせた細

胞(PC-9^{Venus-Luc-shRNA})を作製し、PC-9^{Venus-Luc}とPC-9^{Venus-Luc-shRNA}のマウス肺転移能と転移腫瘍の大きさをバイオイメーキング法と病理組織学的手法で比較・検討した。同様に、PC-9^{Venus-Luc}をマウス尾静脈注入後、ADAM28のsiRNAとアテロコラーゲン(Atelo Gene)複合体を数回投与し、肺転移能や転移腫瘍の大きさを比較・検討した。さらに、マウス肺組織中の転移癌細胞におけるADAM28の発現レベル、アポトーシスの程度(Tunnel染色とcleaved caspase-3染色)、浸潤形態を病理組織学的に解析した。

ADAM28の形質転換によるADAM28

発現: Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells にがん遺伝子であるv-Src、LMP1、ErbB2、Ha-Ras、c-Fos でトランスフォーメーションした細胞を金沢大学がん研究所の佐藤博教授から供与を受けた。次いで、これらの細胞株のADAM28遺伝子発現をRT-PCRで検討し、形態学的変化とADAM28タンパク質発現をADAM28特異的抗体を用いて免疫染色とイムノプロット法にて検討した。さらに、v-Srcによりトランスフォームした細胞株v-Src/MDCK細胞については、Srcインヒビター(PP2)やPI3 kinaseインヒビター(LY294002)およびMEKインヒビター(PD98059)で細胞を処理し、ADAM28発現抑制効果をRT-PCRとイムノプロット法で検討した。また、ADAM28を高発現する癌細胞株(PC-9、MDA-MB231、Caki-2)と非発現癌細胞株(MCF-7、HepG2)においてc-Srcのリン酸化をリン酸化特異的抗体を用いてイムノプロット法で検討し、Srcインヒビター処理後のADAM28発現を調べた。

倫理面への配慮: 組み換えDNA分子の生細胞への導入、マウスを用いた実験は、遺伝子組み換え・動物実験に該当することから、これらの実験に当たっては法令を遵守し、安全対策と動物への苦痛排除など十分な注意を払って行った。以上の実験は、慶應義塾大学遺伝子組み換え実験安全委員会と動物実験委員会の承諾を得て行っている。

C. 研究結果

1. ADAM28新規基質VWFの同定と切断部位の決定

Yeast two-hybrid systemによりADAM28結合候補分子としてVWFをクローニングした。Binding assayによりADAM28はVWFと特異的に結合し、yeast two-hybrid assayのデータより、ADAM28のsecreted-specificドメインでの結合が示唆された。活性型ADAM28とVWFをインキュベートすると、ADAM28はグアニジン塩酸の存在に関係なくVWFマルチマーを低分子化した。N末端アミノ酸シークエンスにより、ADAM28はVWFのD3-A1ドメインのGly¹²⁴²-Leu¹²⁴³ボンド間とA1-A2ドメインのLeu¹⁴⁸²-Leu¹⁴⁸³ボンド間の2か所で切断することが明らかとなった。一方、既に報告されているように、ADAMTS13はA2ドメインにあるTyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ボンド間の1か所で切断したが、本活性はグアニジン塩酸存在下でのみ認められた。また、ADAMTS13は蛍光標識基質(FRETS-VWF73)を時間および濃度依存的に分解するのに対し、ADAM28は本基質を全く分解しなかった。

2. VWFによる癌細胞のアポトーシス誘導とADAM28によるVWF誘導性アポトーシス回避

ADAM28高発現癌細胞株(PC-9、MDA-MB231、Caki-2)と非発現癌細胞株(MCF-7、HepG2)を培養下でVWF処理したところ、後者の細胞株でアポトーシスが誘導されたが、前者ではアポトーシスは観察されなかった。一方、ADAM28高発現PC-9細胞においては、ADAM阻害剤、ADAM28の中和抗体、ADAM28 siRNA処理すると、VWF処理によりアポトーシスが出現した。また、本アポトーシス活性はVWFの分解と逆相関していた。インテグリン抗体を用いた実験および細胞内シグナルの検討結果から、VWFは癌細胞膜上にあるインテグリン $\alpha v\beta 3$ に結合し、p53のリン酸化やcaspase-3の活性化を介してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、ADAM28高発現癌細胞では、ADAM28によるVWF分解によりVWFの細胞結合阻害の結果、アポトーシスが回避されることが示された。

3. ADAM28発現あるいは活性阻害によるマ

ウス癌転移抑制作用

ADAM28高発現安定細胞株(PC-9^{Venus-Luc})をマウス尾静脈内注入し、バイオイメージング法で観察したところ、1-2週間で肺転移を形成し、3週以降から頭頸部や腹部での集積像が観察され、病理組織学的に転移が確認された。PC-9^{Venus-Luc}細胞を尾静脈内注入後にADAM28のsiRNA/atelocollagenを投与したり、shRNAによりADAM28の遺伝子発現を抑制したPC-9^{Venus-Luc-shRNA}細胞の注入により、肺転移が有意に抑制された。癌転移を来したマウス肺組織の免疫組織化学的検討の結果、shRNAでADAM28遺伝子発現を抑制した群では、shRNA/mock群に比べてアポトーシス細胞が多い傾向を認めた。

4. v-Srcでの形質転換によるADAM28遺伝子発現

MDCK細胞をv-Src、LMP1、ErbB2、Ha-Ras、c-Fosでトランスフォームした細胞でADAM28の遺伝子発現を検討した結果、v-Src/MDCK細胞のみでADAM28の遺伝子とタンパク質発現の誘導が認められた。また、インヒビターを用いた実験から、v-Src/MDCK細胞におけるADAM28の発現は、PI3 kinaseの系とERKの系が発現に関わることが示された。さらに、ADAM28高発現癌細胞株では、c-Srcのリン酸化が誘導されており、c-Src活性を特異的に阻害するとADAM28の発現が減少することから、ヒト癌細胞におけるADAM28の発現には、c-Srcの活性化が重要であることが示された。

D. 考察

本研究において、ADAM28がsecreted-specificドメインを介してVWFと結合するのみならず、VWFは基質として分解されることが初めて明らかとなった。VWF分解酵素としては、ADAMTS13が知られており、本実験においてもADAMTS13はVWFを効率よく分解した。しかし、ADAM28のVWF分解活性は、VWFが変性・未変性に関わらず切断すること、VWFの2か所で切断すること、さらにはADAMTS13に対する蛍光標識基質への分解活性がないことから、ADAMTS13のVWF分解活性とは明らかに異なっていた。ADAMTS13によるVWF A1ドメイン分解活性はVWFを変性させた条件下でのみ認められ、A1ドメインはshear

stressのない状態では高次構造により隠れているのに対し、D3-A1ドメイン間

(Gly¹²⁴²-Leu¹²⁴³ボンド)とA1-A2ドメイン間 (Leu¹⁴⁸²-Leu¹⁴⁸³ボンド)のリンカー部位は、VWFの分子構造上外側に露出していると推定された。また、これらの所見から、ADAMTS13によるVWF分解は、基質であるVWFの立体的構造変化により主として規定されるのに対し、ADAM28によるVWFの分解は癌細胞の存在する病的な状況下で生じる可能性が考えられる。

VWFは重要な止血因子であり、ADAMTS13遺伝子の突然変異や自己抗体の出現は、VWFの分解低下により血栓性血小板減少性紫斑病を来することが知られている。一方、がん研究分野においては、VWFはマウスのメラノーマ細胞株 (B16-BL6細胞) や肺癌細胞株 (Lewis肺癌細胞) の肺転移を抑制することや、無血清培地でB16-BL6細胞にVWFを添加するとアポトーシスを誘導することが報告されている。これらのデータはマウス細胞株に限定されていたが、種々のヒト癌細胞株においてもVWFはアポトーシスを誘導することが本研究で明らかとなった。また、VWFのアポトーシス誘導活性は、ADAM28によるVWFの分解によって回避されることを初めて示した。VWFは癌細胞の $\alpha v\beta 3$ と $\alpha IIb\beta 3$ インテグリンと結合することが知られているが、本研究では $\alpha v\beta 3$ インテグリンと結合し、その下流でp53のリン酸化とcaspase-3の活性化を介してアポトーシスを誘導することが明らかとなった。さらに、マウス肺転移モデルでの実験から、ADAM28高発現肺癌細胞株の転移はADAM28の発現抑制により有意に低下することが示され、*in vitro*の実験で示されたように、ADAM28はVWF分解によるアポトーシス回避により、血中での癌細胞の生存を延長し、肺転移を促進すると推定された。ADAM28はinsulin-like growth factor (IGF) binding protein-3の分解を通してIGF-Iの局所での有効性を増加させることで癌細胞の増殖に働いていることを我々は報告してきた。本研究データは、ADAM28がVWFの分解を介して血行性転移促進に働くことを示しており、ADAM28による転移促進機構の一旦が明らかになったと考えられる。

我々は、ADAM28がヒト乳癌と肺癌組織において、癌細胞にほぼ選択的に高発現す

ることを報告してきた。これらの発現は、浸潤・非浸潤癌の区別なく、癌の病理組織型にもほとんど相関しないことから、癌細胞におけるADAM28の発現誘導は発癌過程の上流にあると推定された。本仮説に合致して、本研究においては、v-Srcによる形質転換で発現が誘導された。v-Srcによる形質転換時にはPI3 kinase系とERK系のシグナルの活性化が起こるとされているが、本実験においても証明された。また、ヒト癌細胞株においてもc-Srcの活性化が関与する可能性が示された、今後はヒト癌組織におけるさらなる検討が重要と考えられる。

E. 結論

ADAM28の新規基質としてVWFを同定し、ADAM28によるVWFの分解はADAMTS13によるそれとは異なることを初めて示した。ADAM28によるVWFの分解は、VWF誘導性癌細胞アポトーシスを回避へと導き、肺血管内での癌細胞の生存を促し、血行性転移を促進する可能性を示した。また、ADAM28の癌細胞での遺伝子発現は、v-Srcによる形質転換で誘導されることを明らかにした。これらのデータは、ヒト乳癌や肺癌において癌細胞特異的発現により癌転移を促進する機構の一部を説明すると考えられる。

F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべきものはありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hikata T, Takaishi H, Takito J, Hakozaki A, Furukawa M, Uchikawa S, Kimura T, Okada Y, Matsumoto M, Yoshimura A, Nishimura A, Reddy S V, Asahara H and Toyama Y.: PIAS3 negatively regulates RANKL-mediated osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblasts. *Blood* 113:2202-2212, 2009.

Horiuchi K, Kimura T, Miyamoto T, Miyamoto K, Akiyama H, Takaishi H, Morioka H, Nakamura T, Okada Y, Blobel CP, and Toyama Y.: Conditional inactivation of TACE by a Sox9 promoter leads to osteoporosis and increased granulopoiesis via dysregulation of IL-17 and G-CSF. *J. Immunol.* 182:2093-2101, 2009.

Mochizuki S. and Okada Y.: ADAM28 as a target for human cancers. *Curr. Pharm. Des.* 15:2349-2358, 2009.

Mikami S., Katsube K., Oya M., Ishida M., Kosaka T., Mizuno R., Mochizuki S., Ikeda T., Mukai M. and Okada Y.: Increased RANKL expression is related to tumor migration and metastasis of renal cell carcinomas. *J. Pathol.* 218:530-539, 2009.

Hattori N., Mochizuki S., Kishi K., Nakajima T., Takaishi H., D'Armiento J. and Okada Y.: MMP-13 plays a role in migration, angiogenesis and contraction in mouse skin wound healing. *Am. J. Pathol.* 175:533-546, 2009.

2. 学会発表

Yasunori Okada: ADAMs in tumor growth and progression. In Gordon Research Conference on MMPs. Invited speaker. August 30-September 4, 2009. Les Diablerets, Switzerland.

岡田保典：組織内微小環境因子代謝酵素ADAMの性質とヒト癌組織での役割。第20回日本消化器癌発生学会。レクチャー。2009年11月26-27日。広島。

G.知的財産権の出願・登録状況
特にありません。

病理材料・in vivoモデルを用いたがんの発育進展機構解明

分担研究者 坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部病理学教室・教授

研究要旨: 基底細胞がんにおいてEndothenin-2遺伝子が高発現していることを見出し、正常皮膚に比してmRNAレベルで20例中19例において3倍以上、平均で24倍過剰発現を示すことを見出した。EDN2遺伝子のstop codonの下流795-803に典型的なGli1 binding motif が存在することを認め、その発現はHedgehog signalingの転写因子であるGli1に直接制御されていることを示した。異なる転移性を示す肝細胞がん株のクラスター解析から、TGFBR2の発現低下が転移性と関わる可能性が見出された。手術検体を用いた免疫組織染色にて、34/136例(25%)でTGFBR2の発現低下が認められ、腫瘍径、分化度、門脈侵襲、肝内転移、切除後の再発期間と有意に相関し、悪性度の指標となることを示した。

A. 研究目的

ヒトのがん組織は、多段階発がん過程により、あるいはがん間質相互作用などの多様な細胞間相互作用により、多彩な発育進展様式を示す。そして、各臓器がんの病理学的特性は、臨床的特性と対応することが示されてきている。本研究では、病理組織ならびにin vivoモデルを用い相補的に解析を行うことで、多彩な病理像の背景の分子基盤を明らかにすることを目的とする。そして、同定された分子の悪性度診断、予後予測への有用性を検討すると共に、病態特異的治療標的分子としての可能性を検討する。以上の成果をもとに、新規の個別化診断法・分子標的治療法の確立をめざす。

B. 研究方法

卵巣がん・皮膚基底細胞がん・肺腺がん・肝細胞がん・膵管がん・大腸がんを主な対象として、以下の3つのアプローチを統合的に行う。

- (1) 病理材料に発現する遺伝子・蛋白の網羅的解析。
- (2) 病理像を忠実に反映するヒトがんの増殖転移モデル開発と、それを用いた発現解析ならびに機能解析
- (3) 臨床材料・in vivoモデルでの診断・治療への有用性検証。

(1)の遺伝子・蛋白発現解析には、DNAマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析・LC-MSによるプロテオーム解析を行うが、得られた遺伝子・分子群は、in situ hybridization、免疫組織化学による組織での発現の局在、病理像との対応を詳細に検討し病態との関連を絞り込む。

(2)では、免疫不全マウスを用いたがん細胞ないしがん組織の同所移植による増殖転移モデルにつき、既に樹立した系を含めて解析を行う。モデルの腫瘍組織を用いて(1)と同様に網羅的発現解析を行う。また(1)で同定された分子を導入あるいはknock-downし、in vitroとin vivoでの機能解析を行うことで、分子の病態への直接的関与を明らかにする。このモデルを用いた転移の抑制などの治療実験は、前臨床試験として有用であるのみならず、分子の病態への関与をより明らかにすることが期待される。以上の解析で同定された分子群について病態の解明と診断・治療への応用の検討を行うために、(3)臨床材料・in vivoモデルにおける診断・治療への有用性の検証を行い、実際の臨床応用を目指す。治療への応用としては、遺伝子操作以外に、特異的阻害剤、抗体などの利用につき検討する。

(倫理面への配慮)

本研究計画では、がん組織で新たに生じた

遺伝子の変化、発現の変化の解析ならびにがん組織の移植による機能解析を目的としており、三省合同指針にあるヒトゲノム・遺伝子解析研究は含まれない。ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」及び科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当大学の倫理審査委員会の承認を得て実施する(承認番号15-57-2, 15-59, 16-34, 16-90)。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」ならびに「慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン」を遵守する。

C. 研究結果

1) 基底細胞がんを規定する発現遺伝子解析

基底細胞がん20例とそれぞれの正常表皮組織から抽出したRNAを用いてDNA microarray解析を行った結果19/20例において正常表皮に比し癌組織では3倍以上のEndothelin-2 (EDN2: NM_001956)の発現を認めた。定量PCRによる解析では平均値で2.4倍($p < 0.001$)であった。さらに定量PCRによりHedgehog pathwayのマーカー遺伝子であるGli1とEDN2との発現量を測定した結果強い相関が認められた (Pearson correlation coefficient $r = 0.807$ $p < 0.001$)。

EDN2の発現がHedgehog signalingによって制御されているか否かを細胞株を用いて検討した。マウス基底細胞がん株ASZ001を用いてHedgehog signaling阻害剤である cyclopamine処理により内在性EDN2遺伝子発現は有意に抑制された。逆にマウス繊維芽細胞株C3H10T1/2をsonic hedgehog ligandで処理することによりEDN2の発現は有意に促進された。さらに、C3H10T1/2にGli1発現ベクターを導入することによりEDN2の発現は有意に促進された。

EDN2がHedgehog signalingによって直接的に制御されているかをLuciferase reporter assayにより検討した。遺伝子データベースを検索した結果EDN2遺伝子のstop codonの下流795-803に典型的なGli1 binding motif (GBM)が存在することを認めた。そこでGBMを含む配列をpGL3-promoter vectorに

挿入し luciferase reporter gene を作成し Gli1-expressing vector と共に Cos-7 細胞に導入すると luciferase 活性の明らかな増強が認められた。

2) 肝細胞がんの転移能を規定するシグナル伝達異常

免疫不全マウスへの肝細胞がん細胞株同所移植実験における肝内転移能と相関を示す遺伝子を、マイクロアレイ解析によって検索した。高転移株 (Li-7, KYN-2) では、TGF- β receptor II (TGFR2) 遺伝子の発現減少が見られたが、低転移株 (KIM-1, PLC/PRF/5, HepG2) では発現減少を認めず、蛋白レベルでも同様の傾向を認めた。これら細胞株におけるTGF- β への応答性を、in vitroにて検討したところ、TGFR2の発現低下した細胞では、TGF- β 刺激による増殖抑制が見られず、下流遺伝子のひとつSERPINE1の発現誘導も認めなかった。2003~2006年の肝細胞がん手術症例92例(136結節)を用いた免疫組織染色により、がん組織でのTGFR2の発現を調べ、臨床病理学的解析を行った。背景の肝細胞では細胞膜への局在を認めるのに対して、がん部において、34/136結節(25%)でTGFR2の発現低下が認められた。TGFR2の発現低下を認めた症例は、腫瘍径が大きく($P < 0.001$)、分化度が低く($P < 0.001$)、門脈侵襲陽性($P = 0.002$)、肝内転移陽性($P < 0.001$)であり、有意差をもって悪性度が高く、切除術後の臨床経過では再発期間($P = 0.022$)が有意に短いことが示された。

D. 考察

1) 基底細胞がんを規定する発現遺伝子解析

Endothelinは多くの腫瘍において高発現していることが報告されていて、腫瘍形成、悪性度の進展、腫瘍の血管新生に関与していると考えられている。基底細胞がんにおいてはEndothelin 1の高発現は認められず、Hedgehog signalingとの相関も認められなかった。Endothelin 2の基底細胞がんにおける意義は未だ明らかにされていない。我々の研究ではASZ001細胞をEndothelinアンタゴニストで処理をしても細胞増殖速度やマウスにおける浸潤性に変化は認められなかった。しかし、EDN2の高発現はがん組織の微

小環境に影響し、基底細胞がんの特徴的な“arborising vessels”の血管構造の形成などに関与している可能性が考えられる。

本研究では、基底細胞がんにおいてEndothelin-2遺伝子が高発現していること、その発現はHedgehog signalingによって制御されていることが明らかとなった。Hedgehog signalingはcancer stem cellの観点からも重要なpathwayである。EDN2とHedgehog signaling pathwayのさらなる機能解析は基底細胞がんばかりではなくがんと微小環境の観点からも新たな知見を得ることと期待される。

2) 肝細胞がんの転移能を規定するシグナル伝達異常

TGF- β は、肝組織における線維化を促進するが、肝細胞の増殖を抑制することが知られている。肝細胞がんは肝硬変を背景に有することが多く、TGF- β シグナル系が亢進している状態に在るが、肝細胞がんの病理病態への関与はさまざまな報告はあるものの未だ一定の見解は得られていない。今回の検討では、異なる転移性を示す肝細胞がん株のクラスター解析から、TGFBR2の発現低下が転移性と関わる可能性が示された。また、TGFBR2の発現が減少している細胞株では、遺伝子応答および細胞増殖抑制において、TGF β 1に対する感受性が低下していることを確認した。さらに臨床例での解析から、TGFBR2は肝細胞がんの悪性度、特に転移能を評価するバイオマーカーとなり得ることが示唆された。TGFBR2発現低下の機序に関しては、メチル化による発現低下の可能性が示唆されるが、今後検討が必要である。また、TGF β シグナルによるプログレッション特に転移への関与についても不明な点が多いが、今後JNK-SMAD3経路等の関与につき検討する予定である。

E. 結論

病理組織ならびにin vivoモデルを用い相補的に解析を行うことで、多彩な病理像の背景の分子基盤を明らかにし、病態の解明に加えて、臨床応用可能な新しい診断・治療法を開発することを目的に研究を行った。本年度は特に、皮膚基底細胞がんを対象としたShh系の標的分子同定と機能解析、各種臓器がんの転移機構の解析については、順

調に成果が出ており、一層の解明が進むものとする。

F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべきものはありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Effendi K, Mori T, Komuta M, Masugi Y, Du W, Sakamoto M. Bmi-1 gene is upregulated in early-stage hepatocellular carcinoma and correlates with ATP-binding cassette transporter B1 (ABCB1) expression. *Cancer Sci*, in press.
2. Tanese K, Fukuma M, Ishiko A, Sakamoto M. Endothelin-2 is upregulated in basal cell carcinoma under control of Hedgehog signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:486-491.
3. Sakamoto M. Early HCC: diagnosis and molecular markers. *J Gastroenterol*. 2009;44 Suppl 19:108-11.
4. Yamazaki K, Takamura M, Masugi Y, Mori T, Du W, Hibi T, Hiraoka N, Ohta T, Ohki M, Hirohashi S, Sakamoto M. Adenylate cyclase-associated protein 1 overexpressed in pancreatic cancers is involved in cancer cell motility. *Lab Invest*. 2009;89(4):425-32.
5. International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology*. 2009;49(2):658-64.
6. Ojima H, Kanai Y, Iwasaki M, Hiraoka N, Shimada K, Sano T, Sakamoto Y, Esaki M, Kosuge T, Sakamoto M, Hirohashi S. Intraductal carcinoma component as a favorable prognostic factor in biliary tract carcinoma. *Cancer Sci*. 2009;100(1):62-70.
7. Douguchi J, Hashiguchi A, Sakamoto M. Construction of human monoclonal single-chain Fv antibodies against small-cell lung cancer by phage display libraries derived from cell-immunized SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes. *Proteomics Clin Appl*, 2009;3:1265-1272.
8. Hibi T, Mori T, Fukuma M, Yamazaki K, Hashiguchi A, Yamada T, Tanabe M, Aihara K, Kawakami T, Ogiwara A, Kosuge T, Kitajima M, Kitagawa Y, Sakamoto M.

Synuclein-gamma is closely involved in perineural invasion and distant metastasis in mouse models and is a novel prognostic factor in pancreatic cancer. Clin Cancer Res, 2009;15(8):2864-71

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

坂元亨宇、他 2 名。血中のCAP2の測定方法、肝臓疾患の検出方法及び血中CAP2測定用検出キット。特願2009-060966、2009。

消化管腫瘍の病理組織像に対するWntシグナルとTGF- β シグナルの作用

分担研究者 加藤 光保 筑波大学大学院人間総合科学研究科教授

研究要旨

THG1 (TGF- β -Stimulated Clone 22 Domain family 4: TSC22D4) は、多くの扁平上皮がんが発現が亢進し、EGFシグナルの下流で細胞増殖と遊走を促進する組織型特異的ながん遺伝子であることを明らかにした。

A. 研究目的

TGF- β とWntの関連分子が、がんの発生と進展において果たす機能を明らかにし、がんの診断と治療に応用できる標的分子を同定することを目的としている。本年度は、THG1に注目し、がん組織における発現と機能について検討することを目的とした。

B. 研究方法

市販の組織アレイを用いた免疫組織化学によってTHG1の発現について検討した。また、扁平上皮がん細胞等を用いた分子細胞生物学的解析によって、発がんにおけるTHG1の機能について検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験と動物実験は、大学に実験計画を提出し、承認を得て実施した(遺伝子組換え実験承認番号040211, 040212、動物実験承認番号第09-176号)。

C. 研究結果

THG1 (TGF- β -Stimulated Clone 22 Domain family 4: TSC22D4) は、食道がんの80%以上、肺の扁平上皮がんでも60%以上の症例で発現が亢進していることを明らかにした。また、THG1はEGFシグナルによってリン酸化され、ラッフル膜に集積することと、扁平上皮がん細胞の増殖能と遊走能を亢進させ、腫瘍形成能の獲得に関与していることを明らかにした。

D. 考察

THG1が扁平上皮がん特異的ながん遺伝子であることを示した。今後は、がんにおけるTHG1発現亢進の機序、THG1作用の分子メカニズムを明らかにしていくことで、THG1研究の診断・治療への応用が可能になると期待される。

E. 結論

TGF- β シグナル関連遺伝子THG1は、扁平上皮がんの組織型特異的ながん遺伝子であることを見いだした。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka A, Itoh F, Takezawa T, Itoh S and Kato M. bHLH Protein E2-2 inhibits VEGFR2 expression and blocks endothelial cell activation. *Blood in press.*
- 2) Watanabe Y, Itoh S, Goto T, Ohnishi E, Inamitsu M, Itoh F, Satoh K, Wiercinska E, Yang W, Shi L, Tanaka A, Nakano N, Mommaas AM, Shibuya H, ten Dijke P and Kato M. TMPEAI, a transmembrane TGF- β -inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF- β signaling. *Mol Cell* 37: 123-134, 2010
- 3) Itoh F, Itoh S, Carvalho RLC, Adachi T, Ema M, Goumans MJ, Larsson J, Karlsson S, Takahashi S, Mummery CL, ten Dijke P and Kato M. Poor Vessel Formation in Embryos from Knock-in Mice Expressing ALK5 with L45 Loop Mutation Defective in Smad Activation. *Lab Invest* 89: 800-810, 2009.

2. 学会発表

- 1) 加藤光保 大腸粘膜の生理的再生と発がん
第6回日本病理学会カンファレンス
7月31日～8月1日 つくば
- 2) Kato M. TGF- β related genes in early carcinogenesis. International Symposium on TGF- β signaling, Inflammation, and Cancer Prevention
Nov. 20, Incheon, Korea (Invited)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

THG1変異体、抗THG1抗体について特許を出願する予定である。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

がん組織の階層構造の解明と起源細胞の可視化

分担研究者 平尾 敦 金沢大学がん研究所・室長

研究要旨： 幹細胞標識システム(Nucleostemin-GFP)および多型性膠芽腫モデルを構築し、脳腫瘍におけるがん幹細胞の特定に成功した。本脳腫瘍モデルにおけるがん幹細胞は、腫瘍組織の辺縁部、特に血管周囲に位置し、高い運動性や浸潤能を有していることが明らかとなった。

A. 研究目的

生体内におけるがん幹細胞の動態を病理的な観点から理解することを目的とした。脳腫瘍モデルを用いて、脳腫瘍幹細胞の解析を通して、がんの浸潤、増殖、分化御機構を理解し、がんの診断・治療法の開発に寄与することを目指した。

B. 研究方法

昨年度までに作製した幹細胞 GFP 標識システムである Nucleostemin-GFP マウスの神経幹細胞を採取し、がん原遺伝子 Ras をレトロウイルスにて導入後、大脳基底核に注入し、多型性膠芽腫を作製した。腫瘍組織を回収後、FACS を用い、GFP 輝度により腫瘍細胞を分画し、培養あるいは移植により腫瘍形成能を評価した。また、分画した細胞の遺伝子・蛋白発現解析、マトリゲル中での遊走・浸潤能を評価した。

C. 研究結果

脳腫瘍組織を採取し、FACS解析したところ、GFP強陽性および陰性/弱陽性集団の存在が確認された。GFP強陽性集団は、未分化抗原 Nestinの発現が高く、腫瘍スフィア形成能、移

植後の腫瘍形成が高く、がん幹細胞が濃縮されていると考えられた。免疫組織染色解析から、このGFP強陽性細胞は、腫瘍組織の辺縁部に位置し、正常組織中に血管に沿って浸潤していることが観察された。また、この細胞は、HGF受容体が活性化しており、高い運動性や浸潤能を保持していることが判明した。

D. 考察

今回研究の対象とした多型性膠芽腫は、腫瘍周辺正常脳組織への浸潤傾向が顕著であり、手術後、残存した腫瘍細胞が原因となり再発する予後不良の難治がんである。今回の研究成果は、本脳腫瘍におけるがん幹細胞が、高い運動・浸潤能を有していることを明らかにし、脳腫瘍再発メカニズムの解明に寄与したと考えられる。また、本研究により、がん幹細胞集団を特定することができるようになったため、今後、新たな診断・治療法の開発に貢献できることが期待される。

E. 結論

幹細胞標識システムの開発により、がん幹細胞の制御機構の解析が可能になり、脳腫瘍病