

200924008B

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19年度～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者 落合 淳志

平成22(2010)年5月

目 次

I	総合研究報告書	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	研究成果の刊行に関する一覧表	43

I 総合研究報告書

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：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ものであり、ヒト組織像を模倣する動物モデルおよび試験管内モデルを作製し、これらモデルを用いてがん生物像に関わるがんと間質細胞の相互作用を総合的に検討し、その形態と形態を構成する分子基盤に基づいた新しい診断法および治療標的を見出すことを目的とする。3年間の研究成果を以下に示す。1) がん浸潤性増殖ならびにがん生物像に關する特徴的な病理形態・病態を示す転移モデルの作製と、その分子機構の解明を試みた。特に膵がん神経浸潤モデルでは、悪液質やがん性疼痛のモデルとして有用であることを明らかにした。また、この動物モデルにより、神経浸潤の程度に相関して血中IL-6発現が高くなることを確認し、抗IL-6受容体抗体を用いたヒト膵がん患者治療の臨床第一相試験を開始した。2) MMP13の機能を明らかにした。ADAM28の体液中の測定法の開発とADAM28新規基質を探索し、von Willebrand factor (VWF)を見出し、その切断部位を決定した。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。3) 基底細胞がんにおいてEndothelin-2 (EDN2) 遺伝子が高発現していることを見出し、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。4) TGFBR2の発現低下は肝細胞がんの腫瘍径、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。また、TGF- β により活性化されるTHG1 (TGF- β -Stimulated Clone 22 Domain family 4) が食道がん、肺の扁平上皮がんで発現が亢進し、EGFシグナルにより増殖能と遊走能を亢進し、腫瘍形成能の獲得に関与していることを示した。5) 幹細胞GFP標識システムを用いてGFP強陽性分画に腫瘍源性を持つ細胞を濃縮していることが判明し、この細胞集団が高い運動性や浸潤能を保持している“がん幹細胞”であると考えられた。扁平上皮がん幹細胞の同定と幹細胞の能力を保持するために必要な分子機構にポドプラニン (PDPN) が関わっていることを明らかにした。6) ヒト膵多段階発がん過程における宿主免疫反応性の変化とその分子機序について検討し、腫瘍組織に対する免疫細胞の浸潤様式の解析から、抗腫瘍免疫反応が、前がん病変初期では、確認されるが、進行した病変では、免疫寛容に向かうことを見出した。7) CD44の作用機構を明らかにした。また、悪性リンパ腫や白血病における悪性Bリンパ球と血管内皮とのあいだの細胞接着が、リンパ球側のCD22と、血管内皮側の特異的糖鎖リガンドとの結合によって媒介されていることを明らかにした。

A.研究目的

がん生物像は、がん細胞の遺伝子変化の積み重ねにのみ規定されるだけでなくがん周囲微小環境が重要な役割を果たしている

考えられる。特に、がんの特異的な病理・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。本研究班ではこれらのがん

生物像にかかわる病理・病態の分子基盤と、その分子機構が有する生物学的意義をがん細胞とがん微小環境との相互作用として検討してきた。

3年間の各班員の研究目的を以下に示す。

(落合)

1) がん間質細胞の起源とがん間質細胞の有するがん生物像に関わる意義を明らかにする。2) がんに特徴的な病理・病態学的を示す動物モデルの作製とその分子解析として、がんに特徴的な病理・病態学的を示す病変の代表として膵がんの神経浸潤モデルを作製し、膵がんの特徴的ながん性疼痛や悪液質の分子機構を明らかにする。また、ヒト前立腺がんのヒト骨組織内における増殖に関わるシグナル伝達分子機構を明らかにする。3) がん間質とがん細胞の相互作用としてのがん組織特異的血管新生の分子機構の解明をする。4) がん幹細胞の存在する微小環境(ニッチ)と間質細胞との相互作用を検討し、がん細胞の存在とがん微小環境のかかわりを明らかにする。それに加え、これらの分子機構を標的とした新しい治療法の開発や機能的診断法の開発を目指す。そのため、がん幹細胞/Tumor initiating cellの存在ニッチを明らかにするため、形態学的に腫瘍周辺部にがん幹細胞が存在すると考えられる分化型扁平上皮がんのがん幹細胞マーカー(ポドプラニン)を同定した。このマーカーにより、扁平上皮がんがん幹細胞を採取しその性質を確認した。扁平上皮がんのがん幹細胞はCD44やSHH(sonic hedgehog)の発現が高いことを明らかにした。また、抗がん剤投与によりがん細胞の阻害は抑制され、動物移植により腫瘍形成能が極めて高いことが示された。5) 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。

(6) 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。

(岡田)

1) 細胞外マトリックス分解に主役を演じるMMP遺伝子ファミリーのうちMMP-13

KOマウスを用いて、癌細胞増殖・浸潤・転移における癌間質線維芽細胞由来MMP-13(コラゲナーゼ-3)の役割解析を計画し、MMP-13 KOマウスを独自に開発し、成長に伴う表現型の解析とともに骨折や皮膚創傷後の治癒過程における作用を調べた。(H19、20、21年度)

2) ADAM28の転移機構の解析とともに、肺癌患者血清中におけるADAM28濃度を定量できるELISA系を開発し、それにより肺癌の診断、進展・再発の予測、治療効果判定ができるかを検討する。(H19、20、21年度)

(坂元)

1) 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。(H19、20、21年度)

(加藤)

1) ヒトとマウスで共通に見られる*Apc*遺伝子の欠失による消化管腺腫の発生を元に、TGF- β シグナルやその標的遺伝子の発現変化が腫瘍組織の形態変化に及ぼす作用を明らかにし、腫瘍組織の進展時における形態変化の分子機序を明らかにする。(H19、20年度)

2) GF- 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。

(H19、20、21年度)

(平尾)

1) 生体内における癌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、将来の新しい癌の診断・治療法の開発を目指す。本年度の目標として、幹細胞標識システムの開発と固形腫瘍のモデルの構築に取り組み、腫瘍組織内の腫瘍起源細胞の存在、階層構造の存在の有無を検討した。その目的のために、正常幹細胞マーキングシステムが有効かどうか検討した。(H19年度)

2) 脳腫瘍(多型性膠芽腫)モデルにおける階層構造の有無を検討するため、独自に開発した幹細胞GFP標識システムを用いて解析した。その結果、GFP強陽性分画に腫瘍源性を持つ細胞を濃縮していることが判明し、この細胞集団が“がん幹細胞”であると考えられた。このGFP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明らかとなった。また、これらの細胞は、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。(H20、21年度)

(中西、深澤)

がん症例の予後は腫瘍の浸潤・転移能に依存しており、それらはがん間質自身とその周囲に因繞する間質細胞との相互作用などががん周囲の微小環境によって規定される。間質構成細胞の中でも、活性化した線維芽細胞は、がん間質相互作用を理解する上で重要と考えられるが、活性化した線維芽細胞に特異的に発現するマーカー分子は少ない。そこで、活性化した線維芽細胞に発現を認め、その発現程度が予後と相関する重要な分子を選出するために、線維芽細胞を免疫原としたモノクローナル抗体を作製する。それにより、がん間質相互作用の一端を理解し、術後の治療選択や治療法の開発に結び付けることを目的とする。さらに、がん間質の評価法の一つとして、がん間質構成細胞の増殖能を評価することで、がん間質の活性化度、さらにはがん自身の悪性度の評価が可能なマーカー分子を選出することを目的として、Ki67と新規増殖マーカーにおけるがん間質の評価を行う。(H19、20年度)

(平岡)

本研究では多段階発がん過程において変化する宿主免疫応答について、腫瘍上皮細胞と免疫担当細胞の相互関係に注目して、その免疫系の変化を来す分子機序を明らかとすることを目的とする。またそれら免疫応答性(炎症性変化を含めた)の変化の中で、何が発がん過程の進行に寄与し、何が発がんの進行を抑制しているのかをつきとめ、その機序を明らかとしたい。具体的には、ヒト膵多段階発がん過程の腫瘍性上皮細胞における遺伝子発現を網羅的に解析し、各発がん段階に特徴的に発現する免疫関連遺伝

子の比較から、上皮細胞によって誘導される免疫担当細胞の同定や誘導の機序、それら免疫担当細胞と上皮細胞によって形作られる免疫微小環境の性格付けをする。さらにその微小環境が発がん過程におよぼす影響について検討する。(H21年度)

(神奈木)

1) 細胞の糖鎖発現プロフィールとそれに対応する糖鎖認識分子による生体機能調節機構の研究は近年飛躍的に進歩した。がんの糖鎖およびそれに対応する正常細胞の糖鎖は間質細胞(血管内皮細胞・免疫細胞・線維芽細胞など)のもつ糖鎖認識分子と相互作用しており、がんの糖鎖異常はこうした上皮細胞と間質細胞で構成される微小環境に大きな変化をもたらす。(H19年度)

2) CD44とヒアルロン酸糖鎖を介する細胞接着や、セレクチンとその糖鎖リガンドを介する細胞接着がその好例であり、癌細胞と間質細胞(血管内皮細胞・免疫細胞・線維芽細胞など)の相互作用を媒介する。癌細胞の糖鎖異常はこうした上皮細胞と間質細胞で構成される微小環境に大きな変化をもたらす。本研究はこの相互作用の分子機構を明らかにして臨床応用可能な新しい診断・治療法の開発につなげることを研究目的としている。(H20年度)

3) 悪性リンパ腫や白血病における悪性リンパ球と血管内皮との間の細胞接着について検討し、さらに低酸素抵抗性を獲得した悪性度の高い癌細胞に出現する糖脂質の脂質部分の分子種の変化についても検討を加えた。(H21年度)

B.研究方法

(落合)

がん病理形態特性に関わる分子基盤の解析として、以下の4点に付いて検討した。

1) ヒトがん間質細胞を構成する線維芽細胞の起源と機能

がん組織はがん細胞と間質を構成する線維芽細胞、血管、リンパ管、そしてマクロファージやリンパ球など炎症細胞から構成される。がん組織の間質線維芽細胞の起源を明らかにする目的で、GFPにより標識されたRag1欠失免疫不全マウスを作製し、その骨髓細胞を免疫不全マウスに移植し、様々なヒトがん細胞を移植し、がん細胞の間質線

維芽細胞が骨髄由来かを検討した。また、ヒト肺がん患者の肺動静脈由来ならびに動脈外膜にがん間質に分化する線維芽細胞前駆細胞が存在するかを検討した。また、これらの細胞がどのような形質を有しているかを検討した。

2) ヒトがん病理・病態を模倣する動物モデルの作製

前立腺がんは90%を超える症例で骨に転移を示す臨床病理学的特徴を示す。前立腺がんの骨転移の検討には動物骨ではなくヒト成人骨への転移を示すモデルを作製し、転移の分子基盤を明らかにする必要がある。ヒト成人骨を移植したNOD-SCIDマウスを用いてヒト前立腺がん培養細胞株の移植を行い、ヒト骨における微小環境を模倣するモデルを作製した。同モデルを用いて抗ヒトIGF2特異抗体による治療実験を行い、ヒト前立腺がんは骨内における生存および増殖には骨由来IGF2を利用していることを検討した。

ヒト膵臓がんの病理形態の特徴である神経浸潤モデルを作製した。ヒト膵がん細胞株を免疫不全マウスの座骨神経内に移植し、経時的にがん細胞の運動性を確認するとともに、神経進展機構の分子機構を検討した。また、神経浸潤マウスのラミニン産生によるがん神経進展の分子機構を明らかにし、ヒト膵がん細胞株を用いたマウス神経浸潤によるがん性疼痛、悪液質モデルの作製を試みた。

3) がん組織では、血管新生が亢進している事が知られているが、このがん組織特異的に起こる血管新生スイッチの分子機構は、これまでのところ必ずしも明らかになっていない。がん間質細胞はがん細胞に比べ多量の血管新生因子であるVEGFを産生するが、試験管内ではこの産生されたVEGFは不活化されていることより、どのような分子機構がこの活性化に関わるかを、動物モデルおよび試験管内モデルを作製し検討した。

4) がん組織を作り出すがん幹細胞の微小環境(ニッチ)を明らかにするためには、がん幹細胞の新しいマーカーを見いだす必要がある。形態学的にはヒト扁平上皮がんは基底側に正常扁平上皮と同様な幹細胞が存在すると考えられる。そこで分化型扁平上皮がん細胞のがん幹細胞を、基底細胞において発現する分子を元にスクリーニングし、新しい分化型扁平上皮がんのがん幹細胞マ

ーカーを検索した。

5) 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。

6) 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。

(岡田)

1) MMP-13 KOマウスの表現型と傷害後治癒過程でのMMP-13の作用解析：MMP-13 遺伝子のメタロプロテアーゼドメインを含むexon 1-4をhomologous recombination法により欠失させたMMP-13 KOマウスを作製し、胎児期から生後12週までの発育状態を肉眼的および組織学的に検討した。中足骨、脛骨、大腿骨、上腕骨については、骨端での軟骨細胞層をmorphometryにより計測した。骨折モデル実験では、8週齢のMMP-13 KOおよび野生型マウスの脛骨中部を骨鋸により横断後、骨釘により固定した。術後10週までの経過をX線、CTおよび組織学的に観察し、石灰化率、骨密度、軟骨と骨基質の比率を定量的に解析した。また、II型およびX型コラーゲン、MMP-9、CD31、cathepsin K、TRAP染色を行った。さらに、軟骨細胞をアテロコラーゲン内で三次元培養し、軟骨ペレットの収縮と軟骨細胞外マトリックスの形成を調べ、軟骨ペレットに対する血管内皮細胞のsproutingをアッセイした。皮膚創傷治癒実験では、MMP-13 KOマウスと野生型マウス背部皮膚に径8 mmの全層性皮膚欠損を作製し、創傷治癒過程を肉眼的および組織学的に経時的に観察し、表皮細胞の増殖能をPCNA染色で検討した。表皮細胞の運動能をI型コラーゲン上でのin vitro wound healing assay法により検討した。また、創傷部肉芽組織における血管新生の程度と筋線維芽細胞の出現をそれぞれCD31と α -smooth muscle actinの免疫染色により解析した。

MMP-13 KOマウスと野生型マウスの脛

骨髄内へマウス前立腺癌細胞株 (TRAMP-C1細胞株) を移植し、骨髄内での生着・増殖能を検討した。同様に、癌細胞株を皮下組織および脛骨骨膜周囲に移植し、これら癌細胞の生着率と増殖能を肉眼的および組織学的に解析した。MMP-13 KOマウスと野生型マウス背部皮膚に径8 mmの全層性皮膚欠損を作製し、創傷治癒過程を経時的に肉眼的および組織学的に観察し、表皮細胞の増殖能をPCNA染色で検討した。マウス表皮細胞の運動能をI型コラーゲンを塗布したスライドガラス上でのin vitro wound healing assay法により解析した。

2) ADAM28のPSGL-1への結合と血管内皮細胞への接着実験: 分泌型ADAM28のC末端ドメインをbaitにして酵母two-hybrid法により結合蛋白をスクリーニングし、結合能をbinding assay、免疫沈降、免疫染色法により検討した。PSGL-1遺伝子を発現する形質導入株と白血病細胞株 (HL-60細胞) を用いてP-selectinおよび血管内皮細胞への接着実験を行った。また、LPS処理したマウスの尾静脈内へ、ADAM28とインキュベート処理・未処理のBCECF-AM標識HL-60細胞を注入し、肺毛細血管内に捕捉された細胞数を共焦点顕微鏡で計測した。ADAM28のELISA系の開発とそれによる肺癌患者の血液検体での定量: ADAM28のメタロプロテアーゼドメインを認識する2種類の特異的モノクローナル抗体を作製し、一方をプレートに塗布し、他方をペリオキシダーゼ標識して、ADAM28蛋白を測定できるELISA系を開発した。本ELISA系の特異性検討のために、精製したMMP-1, 2, 3, 7, 9, 13およびADAM8, 9との交差反応を調べた。さらに、ヒト肺癌患者 (n=90) および対照健常者 (n=12) より血液を採取し、血清中のADAM28蛋白を定量した。

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ブ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(β3, 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ブロット法で検討し、そのシグナルが抗インテグリン(β3, αv, αIIb)抗体やADAM阻害剤処理により抑制されるかを調べた。

(坂元)

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・蛋白の網羅的解析を行う。

(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を行う。

(3)臨床材料・in vivoモデルでの診断・治療への有用性検証を行う。

(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。

(加藤)

消化管粘膜上皮に活性化変異を加えたTGF- β 1やTGF- β の標的遺伝子として注目したephrin-A1を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、これらとApc遺伝子に機能喪失型変異をもち消化管腫瘍を多発するApc^{min/+}マウスを交配してTGF- β 1またはephrin-A1を過剰発現する消化管腫瘍の形態学的特徴を病理組織学ならびに免疫組織化学的に解析する。

ミニ浸透圧ポンプを用いたBrdUの持続注入と組織像のボリュームレンダリングソフトウェアによる3次元再構築を用いた定量形態学的手法を用い、大腸粘膜幹細胞の動態を解析した。また、種々の分子生物学的手法を用い、がん細胞で発現が後進しているTMEMPAIの機能を解析した。さらに、TGF- β 1トランスジェニックマウスや条件付き誘導的Smad4ノックアウトマウスを作製し、消化管粘膜の維持と腫瘍形成におけるTGF- β シグナルの作用について検討した。

(平尾)

1) 幹細胞標識システムの開発

核小体蛋白NucleosteminプロモーターによってGFPが発現する幹細胞標識レポーターシステム(NS-GFP)をもつトランスジェニックマウスの神経組織における解析を行った。胎生14.5日のマウス脳組織を用い、GFPの輝度と神経分化マーカーとの相関、ニューロスフィア形成能を定量した。

2) 多形性膠芽腫モデルの作製

p16INK4a/p19Arf欠損マウス由来の神経幹

細胞を分離し、ニューロスフィア培養法により増殖させた後、活性型K-ras遺伝子を導入した。遺伝子導入された神経幹細胞を大脳基底核に注入した。

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。

(中西、深澤)

ヒト大腸がん凍結組織を用い、明瞭な腺管構造を形成する腫瘍腺管を因繞する間質と、腺管構造が崩れ脱分化傾向を認める腫瘍を因繞する間質の2群に分類し、レーザーマイクロダイゼクション法にてそれらの形態学的特徴を有する間質組織のみを回収し、RNAを抽出する。得られたRNAを用いたAffymetrix社のGene Chip (HumanU133 Plus2.0)による発現解析を施行し、両群で有意に差を認める遺伝子を候補遺伝子として選出する。候補遺伝子に対し、定量的PCRおよびヒト大腸がん組織を用いた免疫組織化学染色を施行し、発現結果のvalidationおよび臨床病理学的因子との相関を検索する。

ヒト大腸癌組織から初代培養線維芽細胞を採取し、その細胞のタンパクを免疫原としてマウスに免疫し、同マウスの脾臓より得たリンパ球とSP2細胞を融合させ、モノクローナル抗体を得る。数種のがん組織を用いて免疫組織化学染色を施行し、がん周囲の線維芽細胞に陽性像を認める培養上清のみを選出し、質量分析により抗原を同定する。

得られた抗体を用いて、ヒト大腸癌のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた免疫染色を行い、がん間質における各分子の発現程度と臨床病理学的因子との相関を統計的に解析する。また、線維芽細胞の培養株に対しTGF β 刺激を行い、各分子の発現変化を見る。また、間質の増殖能を評価するために増殖マーカーの一つであるtNASP抗体を用いて、乳がんのがん間質における発現細胞数を数え、予後との相関を検討する。

(平岡)

膵管内乳頭状粘液性腫瘍(IPMN)を用いて、ヒト膵多段階発がん各過程の腫瘍に浸潤する免疫担当細胞の浸潤様式の違いを免疫組織化学的に検討し、多段階発がん過程における宿主免疫応答性の変化を評価した。また多段階発がん過程各段階の腫瘍上皮細胞における遺伝子発現を網羅的に検討し、前述の評価と併せて、宿主免疫応答性の変化に関わる遺伝子を同定した。次に、それら遺伝子にコードされた分子の細胞生物学的・免疫学的な機能を調べ、またマウス腫瘍の同種移植モデルを用いて生物学的機能を検討し、これら分子がもたらす宿主免疫応答性の変化の機序を解析した。

(神奈木)

癌の糖鎖およびそれに対応する正常細胞の糖鎖の並行測定によって、良悪性を高率に鑑別可能な腫瘍マーカーの樹立のための技術的基盤(特異抗体および測定標準品)を確立することを目標とした。また、対応する正常と癌の糖鎖の機能を解析して癌治療の新しいターゲットを見いだすことを目標とした。

1) CA19-9系統のI型糖鎖グループに属する糖鎖については、癌で増加する不全型糖鎖シアリルルイスa(CA19-9)に対応して、正常上皮細胞にはジシアリルルイスa糖鎖が存在することが明らかとなっているので、血清中の両糖鎖の並行測定を目的として、これら糖鎖を側鎖に有する糖蛋白質を研究する。これらの糖蛋白質は、血清中糖鎖の測定のための標準物質として役立つので、この糖蛋白質の細胞外への分泌機構を研究し、その成果をもとに細胞の培養上清から効率良くこれら糖蛋白質を回収する方法の開発を試みる。

NCC-ST-439, SLXなどのII型糖鎖グループに属する糖鎖については、癌で増加する不全型糖鎖シアリルルイスx(NCC-ST-439, SLX)に対応して、正常上皮細胞にはシアリル6-スルホ糖鎖が存在する。シアリル酸が α 2-3結合で付加したシアリル6-スルホ糖鎖に対する単クローン抗体は既に作成して保有しているので、今年度は新たにシアリル酸が2-6結合で付加したシアリル6-スルホ糖鎖に対する単クローン抗体の作成を試みた。

また、シアリル6-スルホ糖鎖を特異的に認識する糖鎖結合分子を同定し、粘膜内の微小環境においてこれを発現する間質細胞と上皮細胞との間にどのような細胞間相互作用を起こ

すかの解析を試みた。

2) 培養大腸癌細胞のCD44に結合する糖鎖を、抗CD44抗体による免疫沈降法とそれにつづく特異的抗糖鎖抗体によるウェスタンブロット法にて解析した。抗糖鎖抗体には、セレクトインの糖鎖リガンド活性を有する糖鎖にタイする抗体を含めて検討した。特定の糖鎖を結合したCD44を発現する一連の細胞を遺伝子導入により作製し、この細胞から可溶性CD44を調製して解析した。さらに、バリエーション型CD44に対する特異抗体と抗糖鎖抗体を組み合わせることにより、患者検体中でセレクトインの糖鎖リガンド活性を有する糖鎖を結合するバリエーション型CD44を特異的に検出する測定系の構築を試みた。

3) 悪性リンパ腫や白血病における悪性Bリンパ球の治療に抗CD22抗体の利用が考慮されていることに関連して、CD22と特異的に結合する糖鎖を同定し、この糖鎖の体内分布を特異的単クローン抗体で免疫組織学的方法を用いて検索した。血管内皮細胞にこの糖鎖が強発現する事が判明したので、この糖鎖がCD22陽性の悪性Bリンパ球との血管内皮への接着に関与するかどうかを細胞接着実験を用いて解析した。また、大腸癌細胞株を低酸素状態で大量に培養してリン脂質と糖脂質を抽出し、その脂質部分の分子種を高速液体クロマトグラフィーと質量分析(HPLC-ESI-MS/MS法)によって解析した。また、低酸素状態で培養した大腸癌細胞における脂質部分の代謝に関わる分子をコードする一連の遺伝子の発現変化をRT-PCR法によって解析しその結果を質量分析の結果と比較検討した。

C. 研究結果

(落合)

1) ヒトがん間質細胞を構成する線維芽細胞の起源と機能

動物モデルを用い、がん間質組織には骨髄由来線維芽細胞が存在し、その割合は、腫瘍全体の60%に及ぶ事が明らかになった。このことはがんの間質を構成する間質細胞ががん細胞により動員されている事、および間質細胞はがん細胞の種類により動員される割合が異なり、また同一がん細胞においてもがん細胞が増殖する臓器やその微小環境において変化する事が示された。

また、肺がん切除患者のがん周囲近傍の血管である肺動脈、肺静脈内にはがん間質線維芽細胞の前駆細胞が流れている事を初めて示した。血液内前駆細胞は脂肪細胞および骨細胞への分化を示し、間葉系幹細胞の性質を有している事が示された。

2) ヒトがんの病理・病態に特徴的な動物モデルの作製とその分子基盤の解析

2-1. ヒト膵臓がん神経浸潤モデルの作製

膵臓がんの形態学的特徴である神経浸潤モデルを作製し、ヒト膵臓がん培養細胞株を用いて神経内進展を検索したところ、ヒトがん組織に認められる所見と一致して、高分化型腺癌の形質を示すと同時に中枢側へ進展していく事が示された。その進展機構を検索したところ、がん細胞が産生する基底膜構成分子ラミニン5の発現が、神経内浸潤の距離と相関する事が示された。実際の切除ヒトがん組織を用い、神経内進展を腫瘍からの距離として計測すると、ラミニン5 γ 鎖の発現と相関する事が示された。

また、神経進展モデルマウスを用いてがん性疼痛および悪液質の程度を検討したところ異痛症が起こる事が示され、膵臓がん細胞の神経進展により膵臓がんの特徴的ながん性疼痛のモデルが作製されたと考えられた。また、食餌量の変化が変わらない時期から体重減少、脂肪量の減少が起こる事も示され、膵臓がん患者の病態の特徴である悪液質のモデルが作製されたと考えられた。今後、膵臓がん細胞神経進展モデルを用いて、がん性疼痛の分子機構とその治療法ならびに悪液質の形成とがんの進展機構を解明し、新たな治療法の開発を目指す。

2-2. ヒト前立腺がんヒト骨内における転移モデルの作製

ヒト前立腺がんヒト成人骨増殖モデルを用いて、前立腺がんの骨における増殖シグナルを明らかにする目的で、骨内に最も蓄積するIGFに注目し、抗IGF2抗体を用いた治療実験を行った。ヒト骨内にはヒト由来IGF2が蓄積しており、抗ヒトIGF2抗体を用いることにより、前立腺がんの増殖に骨由来のIGF2がどのような働きをしているのか検討した。抗IGF2抗体処理によりヒト前立腺がんの骨における増殖は有意に抑制され、ヒト前立腺がんの骨における増殖はIGF2依存性であることを示した。

3) 血管新生は、これまでがん細胞が産生

する血管新生因子により起こると考えられてたが、今回の検討で、がん間質を形成する線維芽細胞が産生する血管新生因子の活性化により、がん組織においてのみ血管新生スイッチが活性化される機構が、がんの産生するMMP7により起こる事を初めて示した。これらの結果は、現在、がん治療に血管新生阻害剤が用いられているが、この血管新生阻害はこれら分子機構とともに障害する事により、より強くなると考えられた。

4) 分化型扁平上皮がんのがん性幹細胞の探索

がん幹細胞は不均等分裂し幹細胞自身と分化した細胞になる。一般に腫瘍形成にはがん幹細胞の存在が必要と考えられる。形態学的には扁平上皮がんは正常扁平上皮と同様に腫瘍辺縁部から中心部にかけて腫瘍細胞が角化分化する。これらの形態像はこれら扁平上皮がんではがん幹細胞が腫瘍辺縁部に存在していることを示している。これらががん幹細胞に発現する表面抗原を検索し、ポドプラニン陽性細胞にがん幹細胞を多く含んでいることを明らかにした。分化型扁平上皮がん幹細胞が腫瘍形成をすること、および抗がん剤に対して抵抗性であることなどを初めて明らかにした。また、がん幹細胞に発現する分子としてCD44ならびにSHHがポドプラニン陽性細胞には認められるが陰性細胞には発現しないことを明らかにした。

5) がん間質細胞におけるポドプラニン発現の臨床病理学的意義の検討

がん組織を構成する間質細胞の中で最も量的に多い細胞は線維芽細胞である。我々はこれまでにがん間質線維芽細胞はがん組織内に導入されることを初めて明らかにしてきた。その起源として骨髄由来線維芽細胞また血管周囲線維芽細胞が重要な役割を果たすと考えられた。今年度は、血管周囲線維芽細胞がポドプラニンを産生していることをヒト肺腺癌切除材料を用いて検索し、ポドプラニン発現線維芽細胞の存在量によりがん患者の予後が規定されていることを示した。これらの結果は、がん細胞の性質ががん細胞の遺伝子変化によるものでなく、誘導された間質線維芽細胞の機能により調節されている可能性が示された。

6) 神経浸潤モデルで見出された膵臓がん患者の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。

(岡田)

1) 間質細胞由来MMP-13の組織内での機能解析

1-1. MMP-13 KOマウスの表現型と傷害後治癒過程での作用解析:

我々が開発したMMP-13 KOマウスは、長管骨において一次性および二次性骨化の遅延を示した。野生型マウスに比べ、MMP-13 KOマウスにおいては、胎生16.5日から生後1日までの中足骨において一次性骨化の遅延を示した。生後2週では、中足骨や脛骨の骨端板過形成性軟骨層は野生型マウスと比較して約2倍延長していた。また、生後1~8週において、上腕骨の二次性骨化中心における血管侵入の減少とともに、骨化中心の形成遅延が認められた。MMP-13 KOマウスにおける骨の発育遅延は生後8週までにほぼ回復したが、生後10週以降の成熟マウスにおいては、破骨細胞の形成と機能障害により全身骨において骨硬化を認めた。骨折治癒モデルでは、骨折後2~4週において、MMP-13 KOマウスは骨折部に形成された仮骨内軟骨の吸収遅延と血管侵入の減少を示した。軟骨細胞をアテロコラーゲンゲル中で三次元培養すると、MMP-13 KOマウス軟骨細胞ではペレットの収縮低下と軟骨細胞外マトリックスの合成低下が認められた。軟骨細胞ペレットと血管内皮細胞との共培養系では、MMP-13 KOマウス軟骨細胞ペレットに対する内皮細胞のsproutingは有意に低下していた。皮膚創傷治癒実験では、MMP-13 KOマウスにおいて表皮細胞の上皮化に明らかな遅延がみられたが、表皮細胞増殖能には変化が認められなかった。一方、表皮細胞を用いたin vitro wound healing assayでは、細胞運動にMMP-13活性が必要であることが証明された。また、MMP-13 KOマウスでは、肉芽組織形成期での血管新生は低下しており、筋線維芽細胞の形成能も低下していた。肉眼的な創傷治癒と顕微鏡的な表皮細胞の上皮化は、野生型マウスと比較してMMP-13 KOマウスにおいては有意な遅延が認められた。好中球、マクロファージ、リンパ球の創傷部への浸潤には両群で差はみられなかった。MMP-13発現は、野生型マウス正常皮膚では陰性であるが、創傷作製後1日から14日まで検出され、28日では消失した。MMP-13は野生型マウス創傷部皮膚の先導部表皮細胞に発現を認めた

が、表皮細胞増殖能は両群で差異を認めなかった。一方、in vitro wound healing assayでは、表皮細胞の運動にMMP-13活性が必要であることが証明された。MMP-13 KOマウスでは、肉芽組織形成期での血管新生は低下しており、創傷後1日、5日、10日の創傷部肉芽組織におけるCTGF分子の分解は、創傷後5日のサンプルにおいて明らかに低下していた。また、上皮化後の肉芽組織内での筋線維芽細胞の出現程度は、MMP-13 KOマウスでは野生型マウスに比べ有意に低下していた。野生型マウスとMMP-13 KOマウスから線維芽細胞を分離し活性型TGF- β で刺激すると、両群の線維芽細胞の増殖能は亢進したが、潜在型TGF- β 刺激では野生型マウス線維芽細胞のみで増殖が亢進した。MMP-13はTGF- β を潜在型から活性化型へ変換することが知られているが、実際これらのTGF- β による線維芽細胞増殖促進作用は、抗TGF- β 中和抗体や抗MMP-13中和抗体の投与で阻害され、活性型TGF- β の測定系でもMMP-13 KOマウス線維芽細胞におけるTGF- β の潜在型から活性化型への変換が抑制されていた。また、野生型マウス線維芽細胞でみられた潜在型TGF- β 添加による筋線維芽細胞分化誘導は、MMP-13 KOマウス線維芽細胞では有意に低下していた。

1-2. MMP-13 KOマウスへのマウス前立腺癌細胞株移植実験:

MMP-13 KOと野生型マウスを用いて、マウス前立腺癌細胞株 (TRAMP-C1細胞株) を脛骨骨髓内、皮下組織、脛骨骨膜周囲へ移植し、癌細胞の生着・増殖能を移植後12週まで検討した。その結果、脛骨骨髓内ではいずれのマウス群においても癌細胞は生着しなかったが、皮下組織や脛骨骨膜周囲での生着率は、MMP-13 KOマウスでは30%以下であるのに対し、野生型マウスでは80%以上に認められた。現在、増殖・浸潤能の違いとそれらのメカニズムについて詳細に解析中である。MMP-13 KOと野生型マウスを用いて、マウス前立腺癌細胞株を脛骨骨髓内、皮下組織、筋肉内、脛骨骨膜周囲へ移植し、癌細胞の生着・増殖能を移植後12週まで検討した。その結果、脛骨骨髓内ではいずれのマウス群においても癌細胞は生着しなかった。一方、皮下組織、筋肉内、脛骨骨膜周囲での生着率は、MMP-13 KOマウスでは30%以下であるのに対し、野

生型マウスでは80%以上に認められた。皮下組織移植モデルでは、両群とも移植後12時間後に腫瘍細胞塊周囲に好中球とマクロファージを主体とした炎症細胞浸潤が始まり、24時間から3日後までに腫瘍塊中心部の癌細胞の多くは細胞死に陥った。癌細胞死はMMP-13 KOマウスでは特に顕著であり、癌細胞は移植1-2週後にはほぼ完全に消失するのに対し、野生型マウスでは3-4週後から残存癌細胞が再増殖し、徐々に腫瘍塊の大きさが増大した。癌細胞死の原因、浸潤した炎症・免疫細胞の種類と程度、血管新生の程度、などに関して詳細な解析を現在行っている。

2) ADAM28新規基質の同定と切断部位の決定

2-1. ADAM28のPSGL-1への結合による血管内皮接着促進作用:

酵母two-hybrid法により、ADAM28の結合候補分子としてPSGL-1を見出し、binding assay、免疫沈降法、免疫染色法によりADAM28がPSGL-1と結合することを明らかにした。また、PSGL-1遺伝子導入株とnative PSGL-1を発現する白血病細胞株(HL-60細胞)のP-selectinあるいは血管内皮細胞への接着能は、ADAM28蛋白存在下で特異的に亢進し、ADAM28はPSGL-1/P-selectin結合を促進することが明らかとなった。さらに、マウス尾静脈中への標識HL-60細胞注入実験において、ADAM28蛋白処理により肺毛細血管内皮細胞への接着能および肺胞腔内への浸潤能の特異的亢進を認めた。これらのデータから、ADAM28はPSGL-1との結合を介して、P-selectin発現血管内皮細胞への接着・浸潤促進作用を有すると考えられた

2-2. Yeast two-hybrid systemによりADAM28結合候補分子として新たに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。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。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。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。

2-3. ADAM28測定系の開発とヒト肺癌患者血清中での測定

メタロプロテアーゼドメインを認識する2種類のモノクローナル抗体を組み合わせ、ADAM28蛋白を認識するELISA系を作製した。本アッセイ系の検出限界は1 ng/mlであり、MMP-1, 2, 3, 7, 9, 13やADAM8, 9とは交差反応しないことを確認した。ADAM28濃度は、対照健常者の血清中では平均値で1.3 ng/mlであるのに対し、肺癌患者血清では7.8 ng/ml、肺癌再発例では13.0 ng/mlといずれも有意に高値を示した。本研究で開発したELISA系のADAM28検出限界は1 ng/ml以下であり、ADAM8, 9, 10, 12, 17, ADAMTS1, 4, 5や潜在型MMP-1, 2, 3, 7, 9, 13とは交差反応しないことを確認した。検討した5種類のヒト肺癌細胞株全例において、膜型ADAM28 (55/57 kDa) と分泌型ADAM28 (42 kDa) のバンドがイムノプロット法により検出され、そのバンドの濃さと本アッセイ系で測定したADAM28濃度はよく相関した。対照健常者の血清中 (n=20) ではADAM28値は平均値で1.2 ng/mlであるのに対し、肺癌患者血清 (n=102) では5.4 ng/ml、肺癌再発例 (n=12) では9.9 ng/mlといずれも5.5倍ないし8.3倍有意に高値を示した。Stage Iの患者血清値は健常者のそれよりも2.1倍有意に高値であり、病期の進行とともに高値を示した。また、リンパ節転移陽性群 (n=35) の血清ADAM28値は陰性群 (n=55) よりも3.8倍高値であった。さらに、ADAM28値は腫瘍径の増大とともに増加した。また、血清ADAM28値は、現在非小細胞性肺癌患者の診断で臨床的に使用されているCEAと比較し、感度と偽陰性率において有意に良好であり、両者を組み合わせることにより、感度、特異性、偽陽性率、偽陰性率の全てが改善された。肺癌患者尿のうち37% (34/91症例) で42 kDaのADAM28のバンドがイムノプロット法で検出され、肺癌患者 (n=26) および健常者 (n=10) の血清と尿中のADAM28濃度は正の相関を示した。また、径20 mm以下の肺

腺癌 (n=37) での検討では、ADAM28は全例で腺癌細胞が免疫染色陽性であり、その染色性はこれらの組織ホモジネート中でのADAM28濃度と正の相関を示した。さらに、径20 mm以下の肺腺癌 (n=102) を免疫組織染色性により高発現群、中発現群、低発現群の3群に分類すると、術後のdisease-free survivalは高発現群で有意に低かった。

(坂元)

1) 新規がん・幹細胞関連遺伝子GPR49/LGR5のがんにおける発現と機能解析

DNAマイクロアレイデータベースならびに当院の症例を用いたアレイ解析にて、基底細胞がん有意に発現が認められる新規遺伝子であるG-protein-coupled receptor 49 (GPR49/LGR5)を同定し、定量的PCRにて有意に高発現していることを確認した。各検体におけるGPR49の発現量はGli 1の発現量と高い相関性を示した。in situ hybridization法によりGPR49が腫瘍細胞内に特異的に発現している事を確認した。マウス基底細胞がん細胞株ASZ001を用いて、細胞株にHedgehog signaling pathwayを抑制する化学物質であるcyclopamineを投与することにより、Gpr49の発現の低下を認め、一方、Gli 1発現ベクターの導入あるいはhedgehogのagonistであるpurmorphamineを添加する事により、GPR49の発現量の増加を認めた。ASZ001に対してGPR49に対するRNA interferenceを施行し、GPR49の発現低下とともに細胞増殖が低下することを確認した。逆に、HaCaT細胞に対してGPR49の発現ベクターを導入した細胞は、有意に細胞増殖が亢進すること、免疫不全マウスへの移植により有棘細胞がん様の病理像を呈する腫瘍を形成することを示した。

また、膵がんにおいても、その腫瘍発生にHedgehog signaling pathwayの関与が報告され注目されていることから、膵がん細胞株9種類における発現を検討した。その結果、3種類の株にて、GPR49の高発現を認め、Gli発現との相関を認めた。未だ解析の途中ではあるが、少なくとも一部の細胞株では、基底細胞がんと同様に、GPR49の発現抑制により増殖能の低下を認めた。また、GPR49の発現抑制に伴い上皮様の極性の消失が見られることを、位相差蛍光像の観察から明らかにした。

2) 卵巣転移機構の解析

10種類のがん細胞株を、腹腔内投与・静注・皮下注によりNOD/SCIDマウスに移植し卵巣への転移能を調べたところ、静注により高率に卵巣に転移する細胞株2種類が得られた。また腹腔内投与による移植においては、4種類について明らかな卵巣転移の所見が認められたが、3種類では、肝転移や腹膜播種、卵巣への直接浸潤は認めたものの明らかな卵巣転移はなく、細胞株により卵巣への転移能に特異性のあることが示唆された。卵巣への転移が認められた細胞株について、卵巣転移を認めなかった株と比較し、特異的に発現する、ないしは発現が消失する分子(接着分子、receptor、cytokineなど)を検索したところ、前者ではいずれもE-cadherinの発現が消失もしくは遺伝子に一部欠失のあることが明らかになった。In vivoでの造腫瘍性が乏しいKrukenberg腫瘍細胞株においても、E-cadherinが発現していないことがwestern blotにより確認された。そこで卵巣高転移株1種類について、E-cadherinの強制発現を行い、in vivoでの卵巣転移能の変化を調べた。E-cadherin導入clone 3株、MOCK 4株を静注によりNOD/SCIDマウスに移植したところ、MOCKではいずれも高率に卵巣転移を認めたが、E-cadherin導入cloneにおいては卵巣転移を全く認めなかった。なお、肺など他臓器への転移性は、E-cadherin導入cloneをふくめいずれの株でも維持されていた。

E-cadherin強制発現株のNOD/SCIDマウスへの移植の結果、強制発現株においては卵巣への転移が完全に抑えられ、かつ卵巣以外の臓器への転移性は維持されることが示された。

30例の卵巣転移性腫瘍症例(手術及び剖検例)について病理組織学的な検討を行ったところ、卵巣転移性腫瘍症例の約半数においてE-cadherinの発現低下が認められることが明らかになった。臨床病理学的因子との関連について解析を行ったところ、若年齢・胃がん原発・両側性の卵巣転移・低分化・卵巣転移性腫瘍における間質の増殖などが、E-cadherin発現低下と有意な相関を示す因子であることが分かった。

3) 肺腺がんにおけるmicropapillary patternの病理組織学的検討

Micropapillary pattern (MPP)の病理像は、

一枚の切片上において、血管線維束を持たない腫瘍細胞からなる小集塊(以下tuft)が肺腔内や結合組織内の内腔に存在する像であり、184例(男性109人、女性75人)に認められ、focal、moderate、extensive症例はそれぞれ65(35%)、85(46%)、34(19%)例であった。また後述する生存分析の結果により、none症例をMPP陰性群に、focal、moderate、extensive症例をMPP陽性群に分類した結果、MPP陰性/陽性群はそれぞれ199(52%) / 184(48%)例となった。陽性群におけるdominant BAC、acinar、papillary、solid adenocarcinoma with mucinはそれぞれ19(11%)、33(18%)、117(63%)、15(8%)例であった。連続切片による検討にて、tuftの多くは、他のtuftや主病巣との連続性を持つ事が示され、tuftは主病巣から腔内に伸張し、複雑な形態を呈していると考えられた。いっぽう、他のtuftとの連続性が確認できないtuftも一部存在した。免疫組織学的検討にて、tuftを構成する腫瘍細胞において、細胞間接着因子であるE-cadherinや β cateninが細胞膜に陽性であり、同細胞-細胞間接着が保持されていると考えられた。いっぽうlamininは陰性であり、基底膜ならびに同細胞-基質間接着の欠失が示唆された。tuft内にCD34陽性細胞は認められず、血管構造の欠失が確認された。また同腫瘍細胞はKi-67陽性であり、増殖能の保持が示された。電子顕微鏡による検討にて、tuft内に基底膜や血管構造は認められなかった。いっぽう、tuftを構成する腫瘍細胞-細胞間において接着構造が認められた。またtuft内腫瘍細胞における微絨毛は疎であり、同細胞のapical / basal側が明らかには指摘できず、細胞極性の欠失が示唆された。各種臨床病理学的因子との相関分析では、MPP陽性と、リンパ管侵襲($p < 0.001$)・静脈侵襲($p < 0.001$)・リンパ節転移($p < 0.001$)・胸膜侵襲($p = 0.006$)・dominant non-BAC subtype($p < 0.001$)・dominant papillary subtype($p < 0.001$)・喫煙($p = 0.044$)との間に有意な相関を認めた。リンパ節転移や胸膜侵襲を伴わないstage I A群(N=197)においても、MPP陽性と、リンパ管侵襲($p < 0.001$)・静脈侵襲($p < 0.001$)・dominant non-BAC subtype($p < 0.001$)・dominant papillary subtype($p < 0.001$)・喫煙($p = 0.031$)との間に有意な相関を認めた。生存分析では、MPP陽性群

は陰性群と比較して、無再発生存期間 (disease free survival)・生存期間 (overall survival) 両者において有意に予後不良であった ($p < 0.001$ / $p = 0.027$)。MPPの割合が増加するに従って予後が悪化する傾向を認め、focal群はnone群に比べて予後不良であった ($p = 0.027$ / $p = 0.068$)。すべてのdominant histological subtypeにおいて、陽性群は陰性群と比較して予後不良の傾向を認めた。stage IA群においても、陽性群は陰性群と比較してdisease free survival / overall survival両者において有意に予後不良であり ($p = 0.001$ / $p = 0.001$)、陽性群の5 / 10年生存率は77.6% / 67.6%であり、陰性群の同生存率 (98.1% / 98.1%) と比較して大きく不良であった。

4) 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。

5) 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 (TGFB2)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、TGFB2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TGFB2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TGFB2の発現低下が認められた。TGFB2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。

(加藤)

1) Apc遺伝子の単独変異をもつマウスと比較してApc遺伝子の変異とephrin-A1の過剰発現の両者をもつ複合変異マウスでは、消化管に発生する腫瘍の総数には優位な変化がみられなかったが、大腸に発生する腫瘍の数は、3倍程度に増加した。さらに腺腫の組織構造に2次元切片上明らかな変化は見られなかったが、大腸に浸潤を伴う腫瘍をもつマウスの数は0/20 (0%) から6/20 (30%)、消化管全体では5/20 (25%) から15/20 (75%) へと増加し、1個体あたりの浸潤を伴う腫瘍の数も、大腸で0から0.5、消化管全体で0.25から1.45へと優位に増加した。

2) 腸粘膜の3次元定量解析を行い、およそ7日に1回分裂する組織幹細胞と推定される細胞が1陰窩あたりおよそ10個存在することを明らかにした。また、がん組織で発現が亢進しているTGF- β の標的遺伝子であることを示したTMEPAIがTGF- β シグナルを抑制する機能をもつことを明らかにし

た。さらに、TGF- β 1トランスジェニックマウスとApc^{Min/+}マウスを交配し、TGF- β が消化管腺腫の発生を促進する可能性を示したが、トランスジーンが発現が弱く、確定的な結果を得るに至らなかった。条件付き誘導的Smad4ノックアウトマウスでは、陰窩構造の維持にSmad4が必要であることが示された。

3) THG1 (TGF- β -Stimulated Clone 22 Domain) の解析 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。

(平尾)

1) 胎生14.5日のNS-GFPトランスジェニックマウス脳組織におけるGFPの発現を観察したところ、脳室層に強い発現が認められた。一方、ニューロン細胞マーカーTuJ1陽性細胞では、GFPの輝度が低下していた。GFPの輝度の高い細胞集団には、ニューロスフィア形成能の高い集団が濃縮されていた。

2) K-rasを導入した神経幹細胞を移植すると、脳腫瘍が発生し全例死亡した。腫瘍は、多形性を示し、壊死巣とその周囲に堤防状に腫瘍細胞が配列するpseudopalisade、血管増殖、巨細胞などを認めた。部分的に、ニューロンマーカーTuJ1、グリアマーカーGFAPが陽性であった。

GFP陽性細胞が高頻度に腫瘍形成能を持つこと、未分化マーカーの発現がGFPの発現と相関することが観察され、GFPによってがん幹細胞が特定できることが確認できた。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。

(中西、深澤)

1) 形態学的に分類した2種類のがん間質間で有意な差を認める遺伝子(fold値2倍以上、 $p < 0.05$)として567遺伝子を選出した。その中でCXCL12(SDF-1)は、免疫組織化学的染色にて腫瘍細胞に広く発現を認め、特に腫瘍の浸潤先進部でより強い発現を認めた。大腸がん検体180症例を用い、腫瘍細胞のCXCL12発現の面積比により高発現群と低発現群の2群に分類し統計学的解析を施行したところ、単変量解析 ($p = 0.0027$)、多変量解析($p = 0.0363$)ともに、CXCL12高発現群では有意に再発が多く認められた。また、生存予後に関しては、単変量解析では高発現群において有意に予後不良であったが($p = 0.0142$)、多変量解析では独立した因子として残らなかった($p = 0.1445$)。

2) 線維芽細胞を免疫原として得られたモノクローナル抗体は11抗体、うち質量分析により抗原を同定できたものは9抗体 (FLMB, IQGAP1, MYH9, MAP4, ACTN1/ACTN4, CKAP4/CLIMP63/p63, AATM/GOT2, BAP31, UCHL1/PGP9.5/PARK5)であった。これらの抗体のうちPGP9.5およびp63は、がん間質において発現が高い症例は有意に予後不良であった。PGP9.5は再発に関してリンパ節転移と共に独立した予後因子となり、p63は生存に関してリンパ節転移、腫瘍の深達度と共に独立した予後因子であった。そこで、ヒト線維芽細胞の培養細胞株にTGF β による刺激を行い、発現量の変化を測定したが、PGP9.5はTGF β 刺激により発現が誘導されることが示された。

3) 増殖能のマーカーであるtNASP抗体とki67抗体の免疫組織化学染色切片においてがん間質を観察したところ、tNASPは一部の線維芽細胞および血管内皮細胞に陽性であるが、炎症細胞にはほとんど陽性像を認めなかった。一方、間質におけるki67陽性細胞の大部分が炎症細胞であり、線維芽細胞および血管内皮細胞における陽性像は少数であった。がん間質においてtNASP陽性細胞の多い症例は、少ない症例と比して、有意に予後不良であることが示されたが、ki67陽性細胞の数と予後との関連は認められなかった。

(平岡)

1) 腫瘍に対する免疫細胞浸潤を検討した

結果、腺腫(IPMA)では、腫瘍上皮細胞間に顕著なCD8⁺細胞障害性T細胞や骨髄性未熟DC浸潤が見られるが、上皮内がん(IPMC)になるとこれらT細胞・DCの浸潤は有意に減少した。所属リンパ節における成熟DCと未熟DCの比率を見ると、IPMAでは成熟DCが有意であるのに対して、発がん過程の進行に連れて成熟DCの割合が減少し、浸潤がんでは未熟DCが有意であった。以上から、宿主免疫応答は、腺腫の段階まではある程度機能しているが、それよりも進行すると免疫寛容に向かうことが示唆された。次にIPMA細胞間へのDC浸潤を促進する分子機序を明らかとするために、発がん過程各段階の上皮細胞の網羅的遺伝子発現解析を実施した。正常上皮に比してIPMAで発現が上昇し、IPMCで発現が低下する遺伝子として、ケモカインCXCL17と接着分子ICAM2を得た。化学走化性試験によりCXCL17が単球・DCに特異的な化学走化性活性を持つこと、ICAM2が単球・DCの上皮細胞間浸潤に必要な接着分子に成り得ること、CXCL17とICAM2が相乗的に上皮細胞間浸潤を促進可能であることを*in vitro*実験系により明らかとした。また、CXCL17・ICAM2機能を代償可能な他の遺伝子発現はIPMA, IPMCで見られず、これら2分子の発現変化が膵発がん過程での免疫機能制御に重要と考えられた。

マウス腫瘍(線維肉腫CMS5, 大腸がんCT26)のBalb/cマウスへの同種移植系を用いて、CXCL17とICAM2の免疫応答性の制御を検討した。これら2遺伝子を個別に強制発現させた腫瘍は、親株を移植した場合に比べて有意に腫瘍増殖が抑制され、さらに2遺伝子を同時に発現した腫瘍では、その移植は拒絶された。これら移植腫瘍内にはリンパ球・DC細胞浸潤が増進されており、またリンパ球を排除したマウスに移植すると親株移植時と同様に腫瘍は増大した。一方、ICAM2の腫瘍発現により、CD8⁺T細胞は腫瘍細胞との接着能が増し、効率よく腫瘍細胞を傷害した。以上から、CXCL17とICAM2の発現が腫瘍局所への効率的なDC浸潤を誘導し、続いて細胞性免疫が惹起され、さらにICAM2発現によりT細胞の標的腫瘍細胞障害の効率がよくなること、これらが相乗的に働いて抗腫瘍免疫能が誘導されたと考えられた。

(神奈木)

1) I型糖鎖グループのグリコーム変化の血清腫瘍診断への応用

1-1. I型糖鎖グループの癌型グリコームを持つバリエント型CD44分子の解析

培養大腸癌細胞から調製した細胞膜画分を抗CD44抗体によって免疫沈降法し、特異的抗糖鎖抗体によるウェスタンブロット法にて解析したところ、I型糖鎖グループに属するセレクチンと結合する癌関連性糖鎖として良く知られるシアリルルイスa糖鎖がバリエント型CD44分子上にしばしば検出された。スタンダード型のCD44分子上にはほとんど検出されなかった。シアリルルイスa糖鎖を結合するバリエント型CD44分子を可溶化するため、界面活性剤による抽出法、イオノマイシンやTPAによる遊離法などを検討したところ、イオノマイシンによる遊離法が最も効率が高いことが判明した。可溶化したシアリルルイスa糖鎖を結合するバリエント型CD44分子をN-グリカンあるいはO-グリカン特異的分解酵素で処理したところ、シアリルルイスa糖鎖はバリエント型CD44分子のO-グリカンに担われていることが判明した。

我々は以前から、シアリルルイスa系統の糖鎖は癌細胞に高頻度に出現する一方、類似した構造を持つジシアリルルイスa系統の糖鎖は正常上皮細胞に高発現することを見だし報告してきた。培養癌細胞では正常型糖鎖であるジシアリルルイスa糖鎖を強発現する細胞株が得られないので、ジシアリルルイスa糖鎖を合成する遺伝子を人工的に導入することによってジシアリルルイスa糖鎖を強発現する細胞株を作製した。本細胞から上記と同様にイオノマイシンによって可溶化バリエント型CD44分子を得て解析したところ、ジシアリルルイスa糖鎖も主としてバリエント型CD44分子のO-グリカンに担われていることが判明した。

培養大腸癌細胞から調製したCD44分子には、セレクチンと結合するII型糖鎖グループの癌関連性糖鎖として良く知られるシアリルルイスx糖鎖がバリエント型CD44分子上にしばしば検出された。この場合も、スタンダード型のCD44分子上にはほとんど検出されなかった。イオノマイシンによって可溶化バリエント型CD44分子を得て解析したところ、シアリルルイスx糖鎖も主としてバリエント型CD44分子のO-グリカンに担われていることが判明した。

我々は以前から、シアリルルイスx系統の糖鎖は癌細胞に高頻度に出現するが、これに対

してシアリル6-スルホルイスx系統の糖鎖は正常上皮細胞に高発現することを報告している。培養癌細胞では正常型糖鎖であるシアリル6-スルホルイスx糖鎖を強発現する細胞株が得られないので、シアリル6-スルホルイスx糖鎖を合成する遺伝子を人工的に導入することによってシアリル6-スルホルイスx糖鎖を強発現する細胞株を作製した。この細胞においても、シアリル6-スルホルイスx糖鎖はバリエント型CD44分子のO-グリカンに担われていることが判明した。

上記の研究で用いた特異的抗糖鎖抗体と、市販の抗バリエント型CD44抗体を組み合わせ、特定の糖鎖修飾を持つバリエント型CD44分子のELISA法による簡便な特異的検出法を構築した。それぞれの糖鎖を結合する可溶性バリエント型CD44分子を標準物質に用いたところ、良好な測定標準曲線が得られた。健常人、良性疾患および癌患者血清(n=40)で測定したところ、シアリルルイスa糖鎖を有するバリエント型CD44分子やシアリルルイスx糖鎖を有するバリエント型CD44分子は有意に癌患者で高値となった(それぞれ $p < 0.005$ および $p < 0.01$)。また、正常型糖鎖であるジシアリルルイスa糖鎖を有するバリエント型CD44分子は、癌患者よりむしろ良性疾患患者で統計的に有意に高値となった($p < 0.005$)。CD44分子が結合する相手側分子であるヒアルロン酸糖鎖についても検討を加えた。本年度はとくに低酸素による癌細胞のヒアルロン酸糖鎖産生の変化を解析した。その結果、ヒアルロン酸合成酵素*HAS3*と分解酵素*HYAL1*の転写が低酸素によって誘導されることが判明した。これにより低酸素下では癌細胞マトリックスのヒアルロン酸が著明に増加し、さらに低分子量ヒアルロン酸断片が蓄積することを見いだした。

1-2. II型糖鎖グループにおいては、以前からシアリルルイスx糖鎖が癌に高率に発現し、シアリル6-スルホ糖鎖が非癌上皮細胞に発現することが判明しているため、シアリル6-スルホ糖鎖の測定系の構築を目指した。シアリル酸が2-3結合で付加したシアリル6-スルホ糖鎖に対する単クローン抗体は既に作成して保有しているため、新たにシアリル酸が α 2-6結合で付加したシアリル6-スルホ糖鎖に対する単クローン抗体の作成を試み、樹立に成功した。この糖鎖は正常上皮細胞、Bリンパ球、血管内皮細胞に発現が見られた。

今回初めて樹立したシアリル酸が α 2-6結合で

付加したシアリル6-スルホ糖鎖に対する単クローン抗体を用いて、この糖鎖が免疫細胞の抑制性リセプターSiglec-2の特異的リガンドであることを見だし報告した。また、シアリル酸が2-3結合で付加したシアリル6-スルホ糖鎖がSiglec-7のリガンドであること、ジシアリルルイスaがSiglec-9のリガンドであることを見いだした。

2) 白血病・悪性リンパ腫における悪性B細胞と血管内皮との接着機構
2-1. B細胞に広く分布するCD22が、血管内皮上の特殊な糖鎖リガンドと特異的に反応することを見いだした。この糖鎖に対する抗体を樹立して検索した所、リンパ節の高血管内皮細静脈に強く発現するほか、体内の他の部位の血管内皮にも広範囲に発現することが判明した。

正常B細胞にも同じ糖鎖が発現していることが判明した。正常B細胞では、この糖鎖が内因性リガンドとして同じ細胞のCD22の糖鎖結合能を中和するために、正常B細胞の血管内皮への接着が抑制されていることが判明した。悪性B細胞ではこの内因性の接着抑制糖鎖の発現が消退し、内因性リガンドから自由になって糖鎖結合能を回復したD22を介して、血管内皮の糖鎖と接着するに至る。この糖鎖は硫酸基と α 2-6結合のシアリル酸を持つ特殊なもので、細胞接着抑制糖鎖(転移抑制糖鎖)の初めての例であると考えられる。白血病患者症例の予備的検討では、この抑制性糖鎖の発現は、ALL症例では著明に減少している(平均陽性率4.6%)に対し、CLL症例では保持されており(平均陽性率71.6%)、その差は統計的に有意($n=14, p < 0.0001$)であった。

2-2. 癌の低酸素微小環境による糖脂質の脂質部分の分子種変化の解析

我々は以前に、局所がん病巣の低酸素環境によりシアリル酸トランスポーター遺伝子*Sialin*の発現が亢進し、このためがん細胞ではN-グリコリル型シアリル酸を持つ糖脂質が出現することを報告した。今年度は糖脂質の脂質部分への低酸素の影響をHPLC-ESI-MS/MS法を用いて検索した。その結果、低酸素により糖脂質のセラミド分子種が変わり、正常なセラミドが減少して、その合成前駆体であるジヒドロセラミドが出現することが明らかになった。正常細胞ではジヒドロセラミドは*DESI*遺伝子産物の働きで正常なセラミドへとすみやかに合成される。この合成には酸素が必要であり、低酸素によっても*DESI*遺伝子の転写が増大しないので補償

が行われず、このため低酸素状態では合成が低下して前駆体であるジヒドロセラミドが蓄積すると考えられる。また、脂肪酸部分においても、不飽和脂肪酸が減少して長鎖の飽和脂肪酸が有意に増加することが判明した。これは不飽和長鎖脂肪酸と飽和長鎖脂肪酸のモル比の著明な変化として検出可能であった。不飽和脂肪酸鎖の合成にも酸素が必要とされることから、この変化は低酸素時の変化として妥当であると考えられた。

D. 考察 (落合)

がん生物像は、がん細胞の遺伝子変化の積み重ねにのみ規定されるだけでなくがん周囲微小環境が重要な役割を果たしていると考えられる。特に、がんの特異的な病理・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。本研究ではこれらのがん生物像にかかわる病理・病態の分子基盤と、その分子機構が有する生物学的意義をがん細胞とがん微小環境との相互作用として検討するものである。今年度は、第1年度でありがんの病理・病態の特徴を示すモデルを作製する事を第一の目標として検討したところ、がん間質細胞の起源を明らかにするモデル作製、膵がん神経進展機構解析モデルから、がん性疼痛モデルそしてがん悪液質モデルの作製ができた。また、がん局所における血管新生機構をがん細胞と間質細胞との相互作用から明らかにする事が出来た。

1) 特徴的な病理・病態を示す動物モデルの作製

1-1. 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こと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。

1-2. ヒト成人骨におけるヒト前立腺がん増殖に関わる分子機構の解明

IGF2はヒト骨においては最も蓄積されている増殖因子であり、ヒト前立腺がんは骨内のIGF2を利用して生存および増殖していると考えられる。一方、マウスでは骨内にはIGF1が蓄積していることより、マウス骨を用いた研究では必ずしもヒト骨における状態を模倣できない。今回のモデルの作製とモデルを用いた治療実験により骨内IGF2が前立腺がん骨転移において重要な意義を有していることを初めて明らかにできた。

4) 分化型扁平上皮がんのがん性幹細胞の探索

がん幹細胞はこれまで既存のマーカーにより大まかに調べられていたが、形態学的に幹細胞が存在す部位に発現する分子の検討により初めてポドプラニンの意義を明らかにできた。この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、また、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、これらモデルを用いてがん幹細胞の分子機構を明らかになると考えられる。

6) がん間質細胞におけるポドプラニン発現の臨床病理学的意義の検討

がん間質線維芽細胞が産生する分子のみで患者予後が決められていることを初めて証明した。これらの結果は、間質細胞のもつ意義を明らかにすることが、がん生物像の検討のみならず、がん間質に関わる新しい治療法や治療剤の開発に極めて重要な意義を有していると考えられる。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、