

expression in malignant intestinal epithelium. *Cancer Res*, 70: 6767-6778, 2010.

Tanaka M, Kitadai Y, Kodama M, Shinagawa K, Sumida T, Tanaka S, Que N, Yasui W and Chayama K. Potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine factor for human gastric carcinoma cells. *Cancer Sci*, 101: 2121-2127, 2010.

Anami K, Que N, Noguchi T, Sakamoto N, Sentani K, Hayashi T, Hinoi T, Okajima M, Graff JM and Yasui W. Search for transmembrane protein in gastric cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of DSC2 in gastric cancer with intestinal phenotype. *J Pathol*, 221: 275-284, 2010.

Sentani K, Que N, Noguchi T, Sakamoto N, Matsusaki K and Yasui W. Immunostaining of gastric cancer with neuroendocrine differentiation: Reg IV-positive neuroendocrine cells are associated with gastrin, serotonin, pancreatic polypeptide and somatostatin. *Pathol Int*, 60, 291-297, 2010.

Sakamoto N, Que N, Noguchi T, Sentani K, Anami K, Sanada Y, Yoshida K and Yasui W. Serial analysis of gene expression of esophageal squamous cell carcinoma: ADAMTS16 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 101: 1038-1044, 2010.

Yamamoto H, Que N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, Yasui W and Kikuchi A. Wnt5a signaling is involved in aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene*, 29: 2036-2046, 2010.

Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu CG, Que N, Yasui W, Yoshida K, Sasaki H, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin GA and Croce CM. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol*, 11: 136-146, 2010.

Seko N, Que N, Noguchi T, Sentani K, Sakamoto N, Hinoi T, Okajima M and Yasui W. Olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) is an independent prognostic marker for survival in patients with colorectal cancer. *Exp Ther Med*, 1: 73-78, 2010.

2. 学会発表

大上直秀、菊池 章、安井 弥：Wnt-5aはlaminin g2の発現を誘導し、胃癌細胞の浸潤を促進する。第99回日本病理学会総会、4月27-29日、東京、2010

大上直秀、阿南勝宏、内藤 寛、坂本直也、仙谷和弘、安井 弥：胃癌における細胞表面蛋白質 desmocollin2の解析。第19回日本がん転移学会学術

集会・総会 ミニシンポジウム (2) がん転移診断、6月16-17日、金沢、2010大上直秀：HER2病理組織判定の症例提示。HER2病理セミナー、9月16日、広島、2010

大上直秀、仙谷和弘、坂本直也、野口 剛、安井弥：RegIVとgastrin、serotonin、pancreatic polypeptide、somatostatinの発現の関連。第69回日本癌学会学術総会、9月22-24日、大阪、2010

H. 知的財産の出願・登録状況

申し訳ありませんが、本年度はございません。

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)
分担研究報告書

固形がんのゲノム・遺伝子解析情報に基づく予知医療の開発

分担研究者 菅野康吉 栃木県立がんセンター研究所技幹

研究要旨 *FGFR3* 遺伝子は膜貫通型のチロシンキナーゼ受容体をコードし、表在性膀胱癌で高率に突然変異を生じることが知られている。*FGFR3* 遺伝子産物である線維芽細胞増殖因子受容体に対する特異的阻害剤である PD173074 の膀胱がん培養細胞株に対する増殖抑制効果を検討した。*FGFR3* 遺伝子変異陽性膀胱がん培養細胞株 UM-UC-14 および MGHU3 では PD173074 の投与による細胞増殖抑制効果が認められた。一方、*FGFR3* 遺伝子が野生型である対照群では増殖抑制効果は認められなかった。PD173074 感受性細胞株では *FGFR3* 蛋白質の過剰発現と自己リン酸化が認められるが、PD173074 投与によりリン酸化の抑制と細胞周期解析における S 期細胞の減少、p27/Kip1 の発現増加、Ki67 の発現減弱が認められた。Scid マウスの Xenograft に対する PD173074 の経口投与でも増殖抑制効果と p27/Kip1 の発現増加、Ki67 の発現減弱、caspase3 の活性化等が認められることから、PD173074 による抗腫瘍効果は G1/G0 arrest とアポトーシス誘導を介するものと考えられた。

A. 研究目的

昨年度までの研究において、表在性膀胱癌では線維芽細胞増殖因子受容体3型(FGFR3)をコードする *FGFR3* 遺伝子の点突然変異が50-70%程度の症例で認められ、経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR-bt)実施前後の尿中 *FGFR3* 遺伝子変異の検出が表在性膀胱癌における再発リスクの判定に有用であることを報告した。FGFR3は膜貫通型のチロシンキナーゼ型受容体であり、*FGFR3* 遺伝子変異は表在性膀胱癌の発生に関わる主要な活性化変異と考えられる。本年度はFGFRに特異的なチロシンキナーゼ阻害剤を用いた膀胱癌に対する分子標的治療への応用の可能性について検討した。

B. 研究方法

8種類の膀胱がん培養細胞株(T24, KU7, UM-UC-2, UM-UC-3, UM-UC-6, UM-UC-14, MGHU3, J82)を用いて、FGFRに特異的なチロシンキナーゼ阻害剤であるPD173074による細胞増殖抑制効果をWST-8を用いた細胞増殖アッセイで検討すると共に、FGFR3蛋白質の発現、細胞質ドメインの蛋白質リン酸化、Ki67, p27/Kip1, 活性化caspase-3, フローサイトメトリーによる細胞周期の解析等の実験を行った。使用した細胞株の

うち、UM-UC-14、MGHU3、J82の3株がそれぞれFGFR3遺伝子変異陽性であり、UM-UC-14では Exon7に S249C 変異、MGHU3では Exon10に Y375C 変異、K652Eでは Exon15に K652E 変異(J82)が認められている。さらにPD173074による細胞増殖抑制効果が認められたUM-UC-14およびMGHU3を Scid マウスに移植して作成した xenograft に対してPD173074を経口投与し、腫瘍の増殖抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はすべて培養細胞株を用いた実験であり、『臨床研究に関する倫理指針』(厚生労働省)の対象外である。動物実験の実施等に関しては『動物実験の適正な実施に向けたガイドライン』(日本学術会議)に準拠して行われた。

C. 研究結果

今回の実験に使用した膀胱がん培養細胞株におけるFGFR3蛋白質発現をwestern blot法により検討したところ、UM-UC-14およびMGHU3でFGFR3蛋白質の強度の発現、Ku7で軽度の発現が認められたのに対して、他の細胞株では発現は陰性であった。FGFR3遺伝子のexon7にS249C変異を認めるUM-UC-14では非還元状態で高分子量のバンド

が認められた。FGFR3遺伝子のexon7およびexon10に変異を認める膀胱がん培養細胞株UM-UC-14およびMGHU3ではPD173074投与による細胞増殖抑制効果が認められ、50%増殖抑制濃度は12.5~25nM程度と考えられた。FGFR3遺伝子のexon15に変異を持つJ82およびFGFR3遺伝子が野生型であるその他の細胞株ではPD173074による増殖抑制効果は認められなかった。PD173074感受性であるUM-UC-14およびMGHU3ではFGFR3蛋白質の過剰発現と自己リン酸化が認められたが、PD173074投与によりリン酸化の抑制と細胞周期解析におけるS期細胞の減少、p27/Kip1の発現増加、Ki67の発現減弱が認められた。ScidマウスのXenograftに対するPD173074の経口投与でも増殖抑制効果とp27/Kip1の発現増加、Ki67の発現減弱、活性化caspase3の発現等が認められた。

D. 考察

膀胱がんの約75%は経尿道的膀胱腫瘍切除術(TUR・bt)で治療可能な表在性膀胱癌であり比較的前後良好ながんと考えられているが、初回のTUR・bt実施後、50%以上の症例で再発、10%以上の症例で浸潤性膀胱がんへの進展が認められ、表在性膀胱がんに対するTUR・bt術後のフォローアップとして、術後2年間は3ヶ月毎の膀胱鏡と尿細胞診検査、3年目は6ヶ月に1回のフォローアップが推奨されている。表在性膀胱がんの再発予防に有用なmodalityの開発によって、75才以上の高齢者が過半を占める膀胱がん患者のQOL改善効果が期待される。今回の検討でPD173074はFGFR3蛋白質の発現が認められるFGFR3遺伝子変異陽性の膀胱がん細胞株に対して強い増殖抑制効果を生じることが明らかになった。PD173074投与後の腫瘍細胞に認められたKi67の発現減弱、p27/Kip1の発現増加、細胞周期解析によるS期細胞の減少、活性化caspase3の発現等からPD173084の抗腫瘍効果はG1/G0期での細胞周期の停止とアポトーシス誘導を介するものと考えられた。Exon15に変異を有する膀胱がん培養細胞株J82については明らかな増殖抑制効果は認められなかったが、本細胞株ではFGFR3蛋白質の発現が陰性であったことから、遺伝子変異以外の原因によりFGFR3遺伝子が不活化されている可能性も

考えられる。

表在性膀胱癌は比較的前後良好な疾患と考えられているが、高齢者に発症し再発を繰り返すことからTUR・bt術後の継続的なフォローアップが必要であり、再発時にはTUR・btの再施行あるいは膀胱摘出等の手術が必要となる。術後の補助療法として、膀胱内へのBCG注入療法等の効果が証明されているが、強い炎症反応を伴うことから、その適応はGrade3の高異型度病変あるいは上皮内進展をとまなうcarcinoma in situ (CIS)型の病変等に限定されている。一方、表在性膀胱癌におけるFGFR3遺伝子変異はpTa stageでは70%程度の陽性率を示し、これらの病変のほとんどはGrade1/Grade2程度の異型度を示すことから膀胱内BCG注入療法の適応とはならず、再発予防効果が確実に証明されている治療法は存在しない。

現在の分子標的治療薬は進行再発がんに対する抗腫瘍効果を期待して臨床応用されているが、副作用が軽度であれば高いQOLが保たれるがんの二次予防薬としての応用可能性が期待される。PD173074は研究用試薬のため現時点での臨床応用は困難であるが、各種のチロシンキナーゼ型受容体を標的とする新規化合物の開発とそれらを用いた臨床試験が現在進行中であり、他臓器癌を対象とした臨床試験で安全性が確認された分子標的薬を使用した臨床試験が将来的には可能となることが期待される。

E. 結論

FGFR3遺伝子変異陽性の表在性膀胱癌ではFGFRに対するチロシンキナーゼ阻害剤による抗腫瘍効果が認められ、表在性膀胱癌に対する分子標的治療薬あるいはTUR・bt術後の再発予防薬としての応用の可能性が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

① Miyake M, Sugano K, Sugino H, Imai K, Matsumoto E, Maeda K, Fukuzono S, Ichikawa H, Kawashima K, Hirabayashi K, Kodama T, Fujimoto H, Kakizoe T, Kanai Y, Fujimoto, K,

Hirao Y. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. *Cancer Sci.*101: 250-58, 2010.

② Miyake M, Ishii M, Koyama N, Kawashima K, Kodama T, Anai S, Fujimoto K, Hirao Y, Sugano K.

1-tert-Butyl-3-[6-(3,5-dimethoxy-phenyl)-2-(4-diethylamino-butylamino)-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-yl]-urea (PD173074), a Selective Tyrosine Kinase Inhibitor of Fibroblast Growth Factor Receptor-3 (FGFR3), Inhibits Cell Proliferation of Bladder Cancer Carrying the FGFR3 Gene Mutation along with Up-Regulation of p27/Kip1 and G1/G0 Arrest. *J Pharmacol Exp Ther.* 332: 795-802, 2010.

③ Koyamatsu Y, Sakamoto M, Miyake K, Muroya T, Sugano K, Nakao Y, Yokoyama M, Iwasaka T. Gene expression profiles and microsatellite instability in uterine corpus endometrioid adenocarcinoma. *J Obstet Gynaecol Res.*36: 336-343, 2010.

④ Wolff EM, Chihara Y, Pan F, Weisenberger DJ, Siegmund KD, Sugano K, Kawashima K, Laird PW, Jones PA, Liang G. Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. *Cancer Res* 70: 8169-8178, 2010.

2. 学会発表

①菅野康吉：がんの遺伝カウンセリング 第16回日本家族性腫瘍学会学術集会 2010年7月9日(金) 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟県)

②松村善昭、三宅牧人、石井正純、友田茉莉、笠原優一、田中宣道、藤本清秀、平尾佳彦、菅野康吉：前立腺癌生検組織および切除標本を対象とす

るERG遺伝子再構成の検出に関する研究 第30回日本分子腫瘍マーカー研究会 2010年9月21日(火) 大阪国際会議場(大阪府)

③三宅牧人、菅野康吉、松本絵里、児玉哲郎、藤本清秀、平尾佳彦：筋層非浸潤性膀胱尿路上皮癌における Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) 遺伝子点突然変異の術後再発マーカーおよび分子標的治療への応用 第30回日本分子腫瘍マーカー研究会 2010年9月21日(火) 大阪国際会議場(大阪府)

④ Kokichi Sugano, Miyake Makito, Eri Matsumoto, Koshi Maeda, Shinichi Fukuzono, Tetsuro Kodama, Tadao Kakizoe, Yae Kanai, Kiyohide Fujimoto, Yoshihiko Hirao: Urine FGFR3 mutation is useful diagnostic marker and potential molecular target for superficial bladder cancer 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association September 22(Wed.)-24(Fri.), 2010 Osaka International Convention Center RIHGA Royal Hotel Osaka

⑤ Makito Miyake, Masazumi Isii, Noki Koyama, Kiyotaka Kawashima, Tetsuro Kodama, Satoshi Anai, Kiyohide Fujimoto, Yoshihiko Hirao, Kokichi Sugano: A FGFR3-selective tyrosine kinase inhibitor (PD173074) suppresses cellular growth of urothelial carcinoma 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association September 22(Wed.)-24(Fri.), 2010 Osaka International Convention Center RIHGA Royal Hotel Osaka

⑥ Yoshiaki Matsumura, Makito Miyake, Masazumi Isii, Mari Tomoda, Nobumichi Tanaka, Kiyohide Fujimoto, Yoshihiko Hirao, Tetsuro Kodama, Kokichi Sugano: Detection of TMPRSS2-ERG recurrent fusion genes in prostate cancer 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association September 22(Wed.)-24(Fri.), 2010 Osaka International Convention Center RIHGA Royal Hotel Osaka

肺がんのゲノム・遺伝子解析情報に基づく予知医療の開発

研究分担者 村上 善則 東京大学教授

研究要旨 肺がんなどの診断、治療の標的分子を同定し、診断マーカー、治療標的として確立するための基礎研究を行うことを目的とした。本年度は、小細胞肺がんの特異的に発現する接着分子 CADM1 スプライシング・バリエントを見出し、診断マーカーとしての有用性を検討した。また、腎臓明細胞がんの悪性化に関わる接着分子経路を同定した。また ATL で過剰発現する CADM1 の下流分子経路を同定し、治療標的としての可能性を検討した。

A. 研究目的

肺がん、泌尿器がん、ATLなど種々の腫瘍の発生、進展に関わり、診断、治療の標的分子候補となる分子群を同定し、診断マーカー、治療標的として確立することを研究目的とする。特に小細胞肺がんの診断マーカーとしての細胞接着分子CADM1の確立、腎臓明細胞がんの予後予測マーカーの同定、ATLの治療標的分子について検討した。

B. 研究方法

1. 小細胞肺がんが発現する細胞接着分子

CADM1のスプライシング・バリエント

培養細胞に対するノーザンブロット解析、RT-PCR・シーケンシング解析、腫瘍組織に対するRT-PCR・シーケンシング解析、抗CADM1抗体を用いた免疫組織染色などを用いて、CADM1のスプライシング・バリエント(8AB型)の発現を解析した。小細胞肺がん培養細胞へのCADM18ABのcDNAの導入、あるいはsiRNAによる発現抑制により、CADM18ABの機能を解析した。さらに、CADM18ABの培養上清での検出を行なった。

2. 腎臓明細胞がんの進展に関わる細胞接着経路の同定

細胞接着分子CADM1-4と、その細胞内結合分子4.1群タンパク質の免疫組織染色により、腎臓組織で発現する分子群を解析した。また、ウエスタンブロット解析により、タンパク質の結合を解析した。さらに、腎臓がん培養細胞にCADM4 cDNAを導入し、106個の細胞をヌードマウス皮下に注入する

ことにより、腫瘍形成能を検討した。

3. ATLにおけるCADM1結合タンパク質Tiam1の同定

患者由来のATL腫瘍細胞、並びにHTLV-1感染細胞におけるCADM1結合タンパク質候補を、モチーフ解析、免疫沈降法、GSTプルダウン法により解析した。さらにATL患者リンパ節組織を用いた免疫組織染色により、ATL症例におけるTiam1の発現亢進を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト組織の使用に当たっては、東京大学医科学研究所の諸規約を遵守し、倫理的、社会的、法律の見地から、患者の不利益にならないように十分に配慮した。動物実験も、東京大学医科学研究所の諸規約に遵って行った。

C. 研究結果

1. 小細胞肺がんが発現する細胞接着分子

CADM1のスプライシング・バリエント

小細胞肺がん培養細胞16例中14例でCADM1の過剰発現を認めた。これに対し、非小細胞肺がん培養細胞10例では、CADM1の過剰発現は全く認めなかった。CADM1の過剰発現を示した14例の小細胞肺がんは、すべて通常の培養条件で、スフェロイドを形成し、壁に対して非接着性に増殖する細胞であったが、CADM1を発現しない2例の小細胞肺がんは、壁付着性の増殖を示しスフェロイドは形成しなかった。次に、RT-PCR産物

の塩基配列、塩基長の解析から、小細胞肺がんでは、上皮で発現する8A型のスプライシング・バリエーションに加えて、ほぼ等量の8AB型バリエーションが発現することが示された。8ABバリエーションはマウス、ヒトの正常組織の解析から、精巣以外では、脳・神経組織で痕跡程度に発現が認められるのみであった。小細胞肺がん組織の解析では、34例中9例(26%)にCADM1の過剰発現を認めた。一方、CADM1を発現しない小細胞肺がん細胞SBC5, SBC3にCADM1を導入すると、そのヌードマウス皮下での腫瘍形成能が顕著に抑制された、さらに、CADM1を高発現するNCI-H69細胞にCADM1siRNAを導入して、その発現を抑制すると、培養条件下でのスフェロイドの形成が顕著に抑制された。次に、小細胞肺がんの診断マーカーとしてのCADM1の意義を明らかにする目的で、培養上清中のCADM1断片の検出を試みた。この結果、濃縮上清では、CADM1細胞外領域に対する単クローン抗体によるウエスタンブロット解析によって、CADM1断片が検出できた。

2. 腎臓明細胞がんの進展に関わる細胞接着経路の同定

ヒト、マウスの腎臓組織におけるCADM1分子群、4.1分子群の解析から、近位尿細管ではCADM4と4.1B、遠位尿細管ではCADM1と4.1Nが特異的に発現することを見出した。さらにヒト腎臓組織抽出物を用いた免疫沈降・ウエスタンブロット解析により、CADM4と4.1B、CADM1と4.1Nが、それぞれ特異的に複合体を形成することを見出した。腎臓がんの大部分を占める腎臓明細胞がんは、近位尿細管由来であることから、以後CADM4の腎臓がんにおける異常を検討した。CADM4の発現欠如、ないし著明低下は、腎臓がん細胞10例中7例、また腎臓明細胞がん組織40例中28例(70%)で認められ、T分類やFuhrmanのグレードとは相関しなかったが、血管侵襲の有無と相関した(P=0.04)。

3. ATLにおけるCADM1結合タンパク質Tiam1の同定

患者由来のATL腫瘍細胞、並びにHTLV-1感染細胞におけるCADM1結合タンパク質候補をモチーフ解析により検討し、候補分子Tiam1を同定した。Tiam1は免疫沈降・ウエスタンブロット解析によ

り、CADM1と複合体を形成することを確認した。次にGSTプルダウン法により、1591アミノ酸からなるTiam1タンパク質の中のPDZドメインのみに、CADM1との結合活性が認められることを見出した。Tiam1の過剰発現はATLのリンパ節9例中3例に認められ、培養ATL細胞を用いた解析により、細胞膜でCADM1と共局在し、浸潤突起の先端でも共局在している可能性が示された。

D. 考察

CADM1群タンパク質は正常上皮では4.1群、MPP群タンパク質と結合し、上皮様形態形成に必須の働きをすると考えられる。今まで、肺、乳腺、膀胱上皮などではCADM1, CADM4, 4.1B, 4.1Nがそれぞれ同一細胞に発現することを報告していたが、腎臓細管では、近位尿細管ではCADM4と4.1B、遠位尿細管ではCADM1と4.1Nとが特異的に発現すること、そして腎臓明細胞がんは近位尿細管由来であることから、CADM4, 4.1Bの異常が認められることが明らかになった。CADMタンパク質群、4.1タンパク質群が組織、細胞特異的に発現する意義は興味深く、尿細管でのイオン輸送なども含めて、今後も解析を続ける必要を認める。また、腎臓細胞がんでは臨床的に大きな問題となっている点の一つは、TNM分類で早期がん当たる腫瘍を外科的に切除しても、その一部に早期に再発、転移し死の転帰をとる例が少なくないことである。このような例では、がん細胞が早期から原発巣を離れて転移していると考えられることから、原発巣での細胞接着の破綻が示唆される。今回、T1aの早期腎臓明細胞がんにおいても、その63%でCADM4の発現欠如、または著明低下が認められたことは、T1aの腫瘍の中に、すでにCADM4を介する接着機構が破綻した例が含まれることを意味する。今後、これらの症例の予後を前向きに検討するとともに、過去の再発例を集めて後ろ向きの解析も行い、腎臓明細胞がんの予後予測や治療修飾へつなげるマーカーとして確立することを目指したい。

一方、CADM1はATLでは異所性に発現し、むしろ細胞浸潤を促進する可能性が2005年に共同研究により報告された。さらに本年度の研究で、CADM1が小細胞肺がん(SCLC)でも高発現し、細胞の悪性化に寄与している結果が得られたことは

意義深い。ATL, SCLC で強発現し、浸潤・転移を促進するという事は、この経路を阻害すれば、がん細胞の浸潤・転移を制御できる、つまり浸潤・転移抑制医薬品開発の標的分子になることを意味する。特にSCLCは国内で約15,000人、米国では30,000人以上が毎年死亡する難治性の疾患であり、分子標的治療薬が未開発であることから、この市場は大きいと考えられる。本研究では、まずSCLCでのCADM1発現細胞が、壁非依存性増殖を示す14例の培養細胞全例で認められ、一方CADM1の発現を認めなかった2例では壁依存性増殖を示し、SCLCでのCADM1の発現が、その転移などにおける悪性形質の獲得に重要であることを示唆した。また、SCLCでは上皮、ATLで認められるCADM1-8A型に加えて、CADM1-8AB型という特異的なスプライシング・バリエーションが含まれることは、診断、治療の観点からも、非常に興味深い。まず血清による診断を目指して、培養上清中にCADM1断片が検出される可能性を検討し、濃縮した培養上清中にCADM1細胞外断片をウェスタンブロット法にて検出した。現在、サンドウィッチ法で、血中CADM1タンパク質を検出できるシステムを構築中である。さらに、島津製作所の研究所と共同で、O-型糖鎖修飾を受ける可能性のあるスレオニン残基を18個含む8AB型CADM1の糖鎖修飾の構造を解析中である。これらの基礎研究は、SCLCの診断医薬の開発の基礎になるものと考えている。

一方、ATLでは、CADM1の下流経路を解析し、上皮細胞とは異なり、ATLではCADM1は Tiam1 と結合し、Racを活性化することにより細胞運動性を促進し、これがATL細胞で特徴的な浸潤能の更新に関わっている可能性を示した。Tiam1はT細胞リンパ腫浸潤転移因子(T-cell lymphoma invasion and metastasis)として同定された分子で、PDZドメインを有し、Racを活性化するGEFとしての機能をもつ。CADM1がATLでGEFとして働くTiam1と結合することは、ATLの浸潤能と直接結びつく知見と思われる。もともと、T細胞性ATL患者のリンパ節ではCADM1が9例中9例で高発現したのに対し、Tiam1の高発現は9例中3例でのみ認められていることから、他の分子、経路も存在する可能性が示唆される。

SCLC, ATL で共通する点は初期からの高浸潤

能、高転移能である。CADM1の分子経路を阻害することでこの経路を断ち、浸潤転移を抑制することを目指して、低分子化合物のスクリーニング系も構築している。すなわち、CADM1の細胞外ドメインを免疫グロブリンFc断片と融合させた分泌型CADM1を細胞に発現させて、培養上清からCADM1タンパク質を精製する。次にこれをカバーガラス上に固相化する。一方、CADM1を発現しないMDCK細胞にCADM1を高発現させ、このガラス上に培養する。45分後に細胞は伸長した形態を示すが、CADM1を発現しないMDCK細胞や、CADM1-Fc断片の代わりにIgGを固相化した系では、この伸長反応は認められない。この系に、サイトカラシンDを添加するとMDCK+CADM1細胞の伸長が抑制される。そこで、同様に既知、未知の阻害剤を加えることで、CADM1経路の阻害分子を同定することができると考えて、実験中である。今後、血中CADM1のサンドイッチアッセイによるSCLC, ATLの血清診断医薬品の開発、また、CADM1を標的とするSCLC, ATLの浸潤転移抑制医薬品(低分子化合物、ヒト化抗体)の開発を中心に研究を進める予定である。

E. 結論

CADM1がSCLC, ATL では疾患特異的に過剰発現し、浸潤や悪性化を促進することを見出した。これを分子標的とする血清診断法や、この経路を阻害することによる浸潤・転移抑制医薬品の開発を目指して、対応する基礎研究を進めている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito T, Williams-Nate Y, Iwai M, Tsuboi M, Hagiwara M, Ito A, Sakurai-Yageta M, and Murakami Y. Transcriptional regulation of the *CADM1* gene by retinoic acid during the neural differentiation of murine embryonal carcinoma P19 cells. *Genes to Cells*, in press.

- 2) Takahashi Y, Iwai M, Kawai T, Arakawa A, Ito T, Sakurai-Yageta M, Ito A, Goto A, Saito M, Kasumi F, and Murakami Y. Aberrant expression of tumor suppressors, CADM1 and 4.1B, in invasive lesions of primary breast cancer. *Breast Cancer*, in press.
- 3) Hagiyaama M, Furuno T, Hosokawa Y, Iino T, Ito T, Inoue T, Kakanishi M, Murakami Y and Ito A. Enhanced Nerve-Mast Cell Interaction by a Neuronal Short Isoform of Cell Adhesion Molecule-1, CADM1. *J Immunology*, in press.
- 4) Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Goto A, Ito A, Fukuhara H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y, and Murakami Y. Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer*, in press.
- 5) Mimae T, Tsuta K, Takahashi F, Yoshida A, Kondo T, Murakami Y, Okada M, Takeuchi M, Asamura H, Tsuda H. Steroid Receptor Expression in Thymomas and Thymic Carcinomas. *Cancer*, in press.
- 6) Hosokawa Y, Hagiyaama M, Iino T, Murakami Y, Ito A. Non-contact estimation of intercellular breaking force using afemtosecond laser impulse quantified by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1777-1872, 2011.
- 7) Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Ito A, Hayashi T, Tsukasaki K, Kamihira S, Yamaoka S, Hoshino H, Yoshida T, Watanabe T, Stanbridge EJ and Murakami Y. CADM1 interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) transformed cells and adult T-cell leukemia (ATL) cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285:15511-15522, 2010.
2. 学会発表
- 1) Kawai T, Nagata M, Iwai M, Morikawa T, Ito A, Kume K, Fukayama M, Homma Y, Murakami Y. Aberrations of CADM1 and CADM4 in urinary bladder cancer. Poster presentation, The 26th European Association of Urology (EAU) Annual Congress, ウィーン市、オーストリア国、2011年3月18-22日
- 2) A S C B sakurai, Poster Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Murakami Y. Dynamics of CADM1 protein in the membrane of stable adhesion and in the process of cell-cell contact formation. American Society of Cell Biology 50th Annual Meeting、米国、フィラデルフィア市、2010年12月11-15日
- 3) ASCB Shigefumi, Poster Murakami S, Sakurai-Yageta M, Murakami Y. Analysis of CADM1 signaling pathway through screening specific inhibitors by cell-based assay. American Society of Cell Biology 50th Annual Meeting、米国、フィラデルフィア市、2010年12月11-15日
- 4) Tsuboi Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Ito A, Murakami Y. Proteomic analysis of cell adhesion molecule 1 (CADM1) complex. 第33回日本生化学会、分子生物学会合同年会、示説、神戸市、2010年12月8-11日
- 5) 菊地慎二、山岡賢俊、小林尚寛、薄井真悟、後藤行延、酒井光昭、鬼塚正孝、佐藤幸夫、岩井美和子、村上善則 細胞接着分子CADM1の小細胞肺癌における特異的スプライシングバリエントの同定。第55回日本肺癌学会、口頭、広島市、2010年11月3-4日
- 6) 永田政義、山田大介、川合剛人、櫻井美佳、伊藤彰彦、久米春喜、森川鉄平、本間之夫、村上善則 腎細胞がんにおける新規腫瘍抑制

経路CADM4-4.1B/DAL-1の解析、第55回日本人類遺伝学会大会、口頭、大宮市、2010年10月27-30日

- 7) 川合剛人, 永田政義, 岩井美和子, 森川鉄平, 伊藤彰彦, 久米春喜, 深山正久, 本間之夫, 村上善則 膀胱癌における細胞接着分子CADM1およびCADM4の異常、第55回日本人類遺伝学会大会、口頭、大宮市、2010年10月27-30日
- 8) Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Kawai T, Tsuboi Y, Ito T, Ito A, Yoshida M, Murakami M. Spontaneous development of lung adenocarcinoma in the *Cadm1* gene-deficient mice. The 16th Charles Heidelberger International Symposium on Cancer Research, ポルトガル国、コインブラ市、2010年9月25-28日
- 9) Murakami Y. Maruyama T, Ohta T, Ito A, Hayashi T, Tsukasaki K, Kamihira S, Yamaoka H., Hoshino T, Yoshida T, Watanabe T, Masuda M. A cell adhesion molecule, CADM1, interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human adult T-cell leukemia cells. 第59回日本癌学会、大阪市、2010年9月22-24日
- 10) Murakami S, Sakurai-Yageta M, Murakami Y. Analysis of CADM1 signaling pathway through screening specific inhibitors by cell-based assay 第59回日本癌学会、大阪市、2010年9月22-24日
- 11) Kawai T, Nagata M, Iwai M, Morikawa T, Ito A, Kume H, Fukayama M, Homma Y, Murakami Y. Aberrations of CADM1 and CADM4 in urinary bladder cancer 第59回日本癌学会、大阪市、2010年9月22-24日
- 12) Ito A, Sakurai-Yageta M, Murakami Y. Function and transcriptional regulation of *CADM1* during the neural differentiation of

P19 cells induced by retinoic acid. 第59回日本癌学会、大阪市、2010年9月22-24

- 13) 村上善則 家族性腫瘍の遺伝カウンセリングの現状と問題点、第?回家族性腫瘍学会、シンポジウム、新潟市、2010年7月9-10日
- 14) 永田政義, 川合剛人, 山田大介, 久米春喜, 本間之夫, 村上善則 男性不妊症を手掛かりとした新規家族性腫瘍検索の試み、第16回家族性腫瘍学会、シンポジウム、新潟市、2010年7月9-10日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得：なし。
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)
分担研究報告書

固形がんの免疫遺伝子・細胞複合療法の開発研究

国立がん研究センター研究所遺伝子免疫細胞医学研究分野長
青木一教

研究要旨 進行した骨軟部肉腫に対しては、有効な薬剤に乏しく、新たな治療法が開発が求められている。インターフェロン(IFN)は腫瘍細胞死誘導や腫瘍免疫誘導など多彩に抗腫瘍活性を有する。しかし、臨床的には、多くの固形がんが免疫抑制性環境を構築していて、免疫療法に抵抗性を示す。そこで、本年度、我々は、このインターフェロン遺伝子治療に、新鮮な免疫系を再構築する造血幹細胞移植と合理的に組み合わせることで、骨軟部肉腫に対して高い抗腫瘍効果を発揮する新たな免疫細胞・遺伝子治療複合療法の基礎開発に取り組み、効果と安全性を動物モデルで検証した。

研究要旨

進行した骨軟部肉腫に対しては、有効な薬剤に乏しく、新たな治療法が開発が求められている。インターフェロン(IFN)は腫瘍細胞死誘導や腫瘍免疫誘導など多彩に抗腫瘍活性を有する。しかし、臨床的には、多くの固形がんが免疫抑制性環境を構築していて、免疫療法に抵抗性を示す。そこで、本年度、我々は、このインターフェロン遺伝子治療に、新鮮な免疫系を再構築する造血幹細胞移植と合理的に組み合わせることで、骨軟部肉腫に対して高い抗腫瘍効果を発揮する新たな免疫細胞・遺伝子治療複合療法の基礎開発に取り組み、効果と安全性を動物モデルで検証した。

A. 研究目的

進行した骨軟部肉腫に対しては、有効な薬剤に乏しく、新たな治療法が開発が求められている。I型インターフェロン(IFN)は腫瘍細胞増殖抑制・細胞死誘導効果などの直接的な抗腫瘍効果とともに、腫瘍免疫誘導や血管新生抑制などの間接的な腫瘍効果といった多彩に抗腫瘍活性を有する。これまでに、骨肉腫の切除後のアジュバント治療として、組み換えIFN蛋白質の皮下投与を3・5年継続することにより生存率を延長できる可能性が示されている。遺伝子治療は、ベクターを用いて腫瘍局所に高濃度に発現することが可能となるために、腫瘍局所の制御とともに抗腫瘍免疫を賦活して、インターフェロンの抗腫瘍効果をさらに増強できる期待がある。

しかし、臨床的には、多くの固形がんが免疫抑制性環境を構築していて、免疫療法に抵抗性を示す。そこで、我々は、このI型インターフェロン遺伝子治療に、新鮮な免疫系を再構築する造血幹細胞移植と合理的に組み合わせることで、肉腫に対して高い抗腫瘍効果を発揮する免疫細胞・遺伝子治療複合療法の開発に取り組んでいる。自家造血幹細胞移植は、免疫系が再構築される際に腫瘍抗原を暴露することにより腫瘍抗原反応性T細胞の増殖を促す、腫瘍の免疫寛容環境を打破できる等の機序により抗腫瘍効果を高めることが期待できる。本年度は、骨軟部肉腫に対するインターフェロン-β遺伝子導入と自家造血幹細胞移植の複合療法の開発を目指し、「前臨床研究と抗腫瘍機構解明のための免疫学的研究」として、1)骨軟部肉腫に対する複合療法の基礎開発と、2)自家造血幹細胞が腫瘍抑制環境を抑える機序に関する研究を行った。また、「複合療法の臨床試験の実施」に関しては、再発骨軟部肉腫症例を対象とした臨床研究の研究実施計画書策定に取り組んだ。

B. 研究方法

「前臨床研究と抗腫瘍機構解明のための免疫学的研究」

1)骨軟部肉腫に対する複合療法の基礎開発
BALB/cマウスやC3Hマウスの自家骨髄移植モデルを用いた。自家造血幹細胞移植は、致死量(9G)の放射線照射後に、同系マウスの骨髄細胞とリンパ球を移入した。骨髄移植と同時に、マウスの足

に同系の骨肉腫細胞であるNHOS細胞やLM8細胞を接種した。ついで、腫瘍径が5-6mm大となったときに、IFN- β 発現プラスミドを正電荷リポソーム (DMRIE/DOPE) と混合して腫瘍内に直接注入し、皮下腫瘍の大きさを経時的に測定した。また、LM8皮下腫瘍は、2週間以内に自然にC3Hマウスの肝や肺に遠隔転移を形成する。そこで、Luciferase遺伝子を導入したLM8細胞を用いて、複合療法の遠隔転移に対する抑制効果をIVISイメージング装置により評価した。

2) 自家造血幹細胞が腫瘍抑制環境を抑える機序に関する研究

BALB/cマウスの自家骨髄移植モデルを用い、マウスの足に同系の大腸がん細胞であるCT26細胞を移植した。造血幹細胞移植後に、皮下腫瘍内および脾臓内のCD4、CD8、FoxP3細胞の経時的变化を免疫染色やフローサイトメーターを用いて解析した。また、B57BL/6マウスの自家骨髄移植モデルにおいて、EGFPトランスジェニックマウスの骨髄細胞やリンパ球を用いて移植を行い、腫瘍部や脾臓におけるリンパ球の由来を解析した。

(倫理面への配慮)

国立がんセンター研究所の動物実験倫理規定に基づいて、動物実験を行った。動物愛護に配慮して、研究の目的に必要な動物数のみを実験に用い、実験終了後は速やかに苦痛軽減の措置をとった。EGFPトランスジェニックマウスの利用にあたっては、施設の遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得て、実験を行った。

C. 研究結果

1. 「前臨床研究と抗腫瘍機構解明のための免疫学的研究」

1) 骨軟部肉腫に対する複合療法の基礎開発

まず、IFN- α およびIFN- β 遺伝子導入による骨軟部肉腫細胞に対する細胞増殖抑制・細胞死誘導効果を検討した。ヒト骨肉腫細胞や軟部肉腫細胞(平滑筋肉腫細胞、横紋筋肉腫細胞、滑膜肉腫細胞、繊維肉腫細胞)にIFN- α およびIFN- β 発現プラスミドをリポフェクションしたところ、細胞の増殖を有意に抑制し、特に骨肉腫細胞や平滑筋肉腫に対して効率良く細胞死を誘導できることを明らか

とした。この細胞死誘導効果は、同じI型IFNでレセプターは共有しているものの、IFN- α よりもIFN- β の方が強かった。

次に、*in vivo*でのIFN遺伝子導入抗腫瘍効果を検討するために、ヌードマウスにおいて、ヒト骨肉腫細胞143Bの皮下腫瘍を作成し、IFN- β 発現プラスミドを正電荷リポソーム (DMRIE/DOPE) と混合して腫瘍内に直接注入したところ、皮下腫瘍の増殖は明らかに抑制された。皮下腫瘍における細胞死誘導をTUNELアッセイにて検討したところ、IFN- β を遺伝子導入した腫瘍では明らかにアポトーシスを起こした細胞が増えていた。また、抗asialo-GM1抗体を用いてNK細胞を除去すると、IFN- β 遺伝子導入の抗腫瘍効果は明らかに減少し、抗腫瘍効果にはNK細胞が関与していることを明らかとした。

さらに、マウス骨肉腫の自然転移モデルにおいて、自家造血幹細胞移植後に腫瘍内IFN- β 遺伝子導入を行ったところ、IFN- β 遺伝子導入単独でも有意に腫瘍の増殖は抑制されたが、自家造血幹細胞移植を複合することによりさらに強く腫瘍の増殖は抑制された。また、この腫瘍増殖抑制効果は、遺伝子を導入した腫瘍のみならず、肺や肝などの遠隔転移巣においても認められ、複合療法により全身の抗腫瘍免疫を誘導できることを明らかとした。治療後に腫瘍細胞反応性のリンパ球が誘導されているか解析するためにELISpotアッセイを行い、複合療法群において多くのIFN- γ 産生リンパ球が誘導されていることを確認した。治療したマウスには、肉眼的にも血液生化学的にも有意な異常は認められなかった。このように、本年度の研究成果により、複合療法の臨床応用を推進する上で必要な効果と安全性を確認することができた。

2) 自家造血幹細胞が腫瘍抑制環境を抑える機序に関する研究

CT26やMeth-A皮下腫瘍を有するマウスにおいて自家造血幹細胞移植を行い、腫瘍や脾臓内に存在するCD4陽性細胞と制御性T細胞の数や頻度の経時的变化を、免疫染色とフローサイトメトリー法により解析した。自家造血幹細胞移植後には、脾臓では制御性T細胞がCD4陽性細胞と比較して優位に増殖し4週後に標準的なレベルに戻るが、腫瘍局所ではむしろ移植後2-3週の間は、制御性T細胞

胞の浸潤・増殖がCD4陽性細胞と比較して抑制されており、このことが造血幹細胞移植による抗腫瘍免疫誘導のメカニズムの一つとなりうることを明らかとした。

造血幹細胞移植後に生体内で回復してくるリンパ球の由来としては、造血幹細胞から分化してくる場合と、移植片中に存在するリンパ球が増殖する場合の2通りが考えられる。そこで、その由来を、EGFPトランスジェニックマウスを用いた造血幹細胞移植により解析したところ、腫瘍内に浸潤するCD4陽性細胞と抑制性T細胞の約70%は、移植片中のリンパ球が浸潤・増殖したものであることがわかった。これは、脾臓においては、移植片中のリンパ球の増殖したものが40%程度であったことと比較して、有意に高い結果であった。腫瘍部の免疫寛容環境をさらに抑制するために、移植片から制御性T細胞を除去して自家造血幹細胞移植を行ったところ、さらに強力な腫瘍増殖抑制効果が持続して認められ、移植片中の制御性T細胞が、腫瘍での免疫寛容環境の構築に重要であることが明らかとなった。

2. 「複合療法の臨床試験の実施」

IFN-β遺伝子遺伝子治療と自家造血幹細胞移植の複合療法の開発を目指し、第1段階として、骨軟部肉腫を対象としたIFN-β遺伝子治療等単独の臨床研究を行うために、国立がん研究センター中央病院の小児腫瘍科、骨軟部腫瘍科、血液腫瘍科の臨床家や、ベクターの供給先である名古屋大学医学部付属病院先端医療・臨床試験支援センターと共同研究体制を確立した。IFN-β遺伝子治療の実行可能性と安全性を検討するために、再発骨軟部肉腫10症例を対象とした臨床研究の研究実施計画書策定に取り組んだ。

D. 考察

本研究により、骨軟部肉腫に対して、自家造血幹細胞移植にIFN免疫遺伝子治療を複合することにより、相乗的な抗腫瘍免疫を強化・維持できることを明らかとすることができた。特に、自然に肺転移や肝転移をきたす実際の臨床病態に近い動物モデルにおいても、IFN-βプラスミドの腫瘍内注入を造血幹細胞移植と併用して強力な抗腫瘍効果を発揮できることは、本複合療法が実際の臨床に

においても効果が十分に期待できる治療法であることを示している。

また、造血幹細胞移植により、腫瘍内のCD4陽性細胞の中でも特に制御性T細胞が減少することが明らかとなり、腫瘍免疫を誘導する上で適した腫瘍環境を作り出せていることが判明した。抗腫瘍免疫をさらに賦活する治療戦略を開発するために、今後は、腫瘍内で制御性T細胞が減少する免疫学的機序に関して解明する予定である。

E. 結論

造血幹細胞移植とIFN-β免疫遺伝子治療の複合により、有害事象の増悪なく、相乗的な抗腫瘍免疫を増強し、マウスの生存率を延長できることを明らかとした。特に、GVHD発症のない自家造血幹細胞移植と、IFN-β発現プラスミドを用いた腫瘍内遺伝子導入は、安全性が高く、実際の臨床病態に近い転移モデルにおいても全身性の腫瘍特異的免疫を誘導できるため、骨軟部肉腫に対する新たな免疫治療戦略となりうる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. K. Narumi, A. Kondoh, T. Udagawa, H. Hara, N. Goto, Y. Ikarashi, S. Ohnami, T. Okada, M. Yamagishi, T. Yoshida and K. Aoki. Administration route-dependent induction of antitumor immunity by interferon-alpha gene transfer. *Cancer Sci.* 101: 1686-1694, 2010.
2. M. Shitashige, R. Satow, T. Jigami, K. Aoki, K. Honda, T. Shibata, M. Ono, S. Hirohashi and T. Yamada. Traf2- and Nck-interacting kinase TNIK is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer Res.* 70: 5024-5033, 2010.
3. K. Aoki and K. Narumi. Development of interferon- β gene therapy against pancreatic cancer. In: *Cancer Gene Therapy* ed. by Tagawa M. Research Signpost, Kerala, India, 2010, p175-194.

4. K. Narumi, T. Udagawa, A. Kobayashi, H. Hara, A. Kondoh, N. Goto, Y. Ikarashi, S. Ohnami, F. Takeshita, T. Ochiya, T. Okada, M. Yamagishi, T. Yoshida and K. Aoki. *In vivo* interferon- β gene transfer enhances antitumor immunity after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Gene Ther.* (in press)

2. 学会発表

国内学会

- 1) 八牧愉二、分田貴子、開田美保、星百合子、高橋典子、山形静香、島田真紀子、五十嵐美德、青木一教、高上洋一、平家勇司. 臨床応用可能な遺伝子組み換えヒトフィブロネクチン(CH296; RetroNectin)を用いたリンパ球拡大培養法の確立研究。第32回日本造血細胞移植学会総会2010年
- 2) K Narumi, T Udagawa, A Kondoh, T Yoshida, K Aoki. Intratumoral delivery of interferon-alpha gene enhances tumor-specific immunity and suppresses immunological tolerance after autologous hematopoietic stem cell transplantation (Oral), 第16回日本遺伝子治療学会2010年7月
- 3) T Udagawa, K Narumi, A Kondoh, N Goto, T Yoshida, K Aoki. Administration route-dependent induction of antitumor immunity by interferon-alpha gene transfer (Poster), 第16回日本遺伝子治療学会2010年7月
- 4) Y Yamaki, T Wakeda, M Kaida, Y Hoshi, N Takahashi, S Yamagata, M Shimada, Y Ikarashi, K Aoki, Y Takaue, Y Heike. Lymphocyte expansion from peripheral blood using recombinant human fibronectin fragment (CH296; RETRONECTIN) (Poster), 第16回日本遺伝子治療学会2010年7月.
- 5) K Aoki, T Udagawa, A Kondo, K Narumi, N Goto, S Ohnami, F Takeshita, T Ochiya, Y Ikarashi, T Yoshida. Interferon gene transfer enhances the antitumor

immunity of hematopoietic stem cell transplantation for sarcoma. 第69回日本癌学会学術総会 (口演) 2010年9月.

- 6) K Narumi, T Udagawa, A Kondoh, Y Ikarashi, S Ohnami, T Yoshida, K Aoki. Intratumoral interferon- α gene transfer suppresses cancer-induced immunotolerance in a lymphopenic host. 第69回日本癌学会学術総会 (口演) . 2010年9月.
- 7) T Udagawa, K Narumi, A Kondoh, Y Ikarashi, S Ohnami, T Yoshida, K Aoki. Suppression of cancer-induced immunotolerant environment by autologous hematopoietic stem cell transplantation. 第69回日本癌学会学術総会 (示説) . 2010年9月.
- 8) M Yamamoto, Y Totsuka, T Nakano, Y Hibiya, A Nakaguchi, K Aoki, T Sugimura, K Wakabayashi. Anti-cancer activity of DNA ADP-ribosylating protein using mesothelin promoter-mediated gene expression. 第69回日本癌学会学術総会 (示説) . 2010年9月.
- 9) 青木一教、鳴海兼太. 固形がんに対する造血幹細胞移植と免疫遺伝子治療の複合療法の開発, 日本癌治療学会 シンポジウム「遺伝子治療」 (口演) 、2010年10月28日.

国際学会

- 10) Y Yamaki, T Wakeda, M Kaida, Y Hoshi, N Takahashi, S Yamagata, M Shimada, A Kondoh, Y Ikarashi, K Aoki, Y Takaue, Y Heike. Establishment of a clinically applicable method for lymphocyte expansion using recombinant human fibronectin fragment (CH296; RETRONECTIN). ISCT 2010 Annual Meeting, May 2010.
- 11) Y Yamaki, T Wakeda, Y Hoshi, N Takahashi, S Yamagata, Y Ikarashi, K Aoki, T Enoki, M Ideno, J Mineno, Y Takaue, Y Heike. Ex-vivo expansion of lymphocytes from cord blood using

recombinant human fibronectin fragment
(CH296; RETRONECTIN) (Poster). 1st
ISCT Asian-Pacific Regional Meeting,
October 2010

- 12) Y Ikarashi, K Aoki, Y Heike, T Yamazaki,
Y Takaue. Screening of
immunomodulating drugs for
graft-versus-host disease by in vivo
fluorescence imaging (Poster). 1st ISCT
Asian-Pacific Regional Meeting, October
2010.
- 13) K Narumi, K Aoki. *In vivo* delivery of
interferon gene enhances antitumor
immunity after autologous hematopoietic
stem cell transplantation (Poster). 1st
ISCT Asian-Pacific Regional Meeting
(Poster), October 2010
- 14) K Aoki. Development of targeted virus
therapy using the adenovirus library
displaying random peptides on the fiber
knob (Lecture). MRCCMT International
symposium. January 2011 (Busan)

H. 知的財産権の出願・登録

- 1) Interferon alpha and antisense K-ras RNA
combination gene therapy against pancreatic
cancer. (米国特番US7,514,416)
- 2) がんの治療法 (2008-102377) (国内、出願中)
- 3) Method of treating solid tumors (11/114,088)
(米国、出願中)

“がんの遺伝子・核酸医薬の開発に関する研究”

金田安史大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨：HVJ-Eは抗腫瘍作用を有するベクターである。HVJ-EにEg5のsiRNAを封入して、悪性グリオーマ細胞に導入するとHVJ-Eによる細胞死誘導効果がさらに増強された。マウス脳内接種グリオーマモデルにおいてEg5siRNA封入HVJ-Eの単回投与によって、腫瘍の完全消失が認められた。

A. 研究目的

抗腫瘍作用を有するHVJ-Eに遺伝子や合成核酸を封入してその抗腫瘍機能の増強を図り、新たな癌治療法を確立する。

B. 研究方法

PKH26で標識したHVJ-Eをヒトグリオーマ細胞株に作用させ、その親和性を調べた。Cy3でラベルしたsiRNAを導入して細胞内導入効率を調べた。HVJ-EへAkt, Mcl1, Eg5のsiRNAを封入し、これをヒト癌細胞株に導入し、細胞増殖能をMTSで評価しアポトーシスをFACSで解析した。グリオーマU118MG細胞由来のマウス皮内腫瘍や脳内接種モデルを作成し、siRNA封入HVJ-Eの投与を行い腫瘍増殖、生存率を評価した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、大阪大学医学系研究科で承認された実験計画に基づいて行った。

C. 研究結果

ヒトグリオーマ細胞株U87MG, U118MG, U251MG, TG98, A172はいずれもHVJ-Eへの親和性が高く、siRNA導入効率は50%以上であった。Akt, Mcl1, Eg5のsiRNAを試したところ、Eg5siRNAを封入したHVJ-Eを導入した場合に、最も細胞増殖が抑制されアポトーシスが誘導された。Eg5siRNA封入HVJ-Eのマウス皮内腫瘍や脳内接種腫瘍モデルへの導入により、腫瘍の完全消失が見られた。Eg5siRNAを封入しないHVJ-Eでは脳内接種モデルで90日後に全例死亡が認められた。

D. 考察

HVJ-Eはヒトグリオーマ細胞に作用させると細胞死が誘導されるが、これはウイルスRNA断片がRIG-Iで認識されておこるシグナル伝達に関与している。しかし細胞周期は停止しない。Eg5のsiRNAは紡錘体の分離を阻害してG2/Mで細胞周期を停止させ分裂期の細胞にアポトーシスを誘導する。そのためEg5siRNA封入HVJ-Eは癌細胞、特に分裂速度の速い細胞に、より選択的に細胞死を誘導することができ、抗腫瘍効果の増強が可能になったと考えられる。

E. 結論

HVJ-Eの抗腫瘍作用を解析し、それを相補する治療分子を封入することにより有効性の高い癌治療法の開発が可能になった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yasufumi Kaneda: A non-replicating oncolytic vectors as a novel therapeutic tool against cancer. *BMB Reports* 773-780, 2010.

2) Matsuda, M., Nimura, K., Shimbo, T., Hamasaki, T., Yamamoto, T., Matsumura, A. and Kaneda, Y. Immunogene therapy using immunomodulating HVJ-E vector augments anti-tumor effects in murine malignant glioma. *J. Neuro-Oncology*, in press (2010, Aug 22).

2. 学会発表

1) 金田安史：遺伝子治療の過去・現在・未来第

109回日本皮膚科学会総会（特別講演）平成22
年4月16日大阪

2) 松田真秀、松村明、新保隆史、金田安史：IL2
immunotherapy using HVJ-E vector exhibits a
synergistic anti-tumor effect in murine
malignant glioma 第69回日本癌学会学術総会
（大阪）平成22年9月23日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

ゲノム・遺伝子解析情報に基づく、臨床応用可能な固形がんの予後予測法の開発と免疫遺伝子治療に資する研究

核酸医薬によるがん診断・治療標的の開発

研究分担者 加藤尚志 早稲田大学教授（教育・総合科学学術院）

研究要旨 非翻訳 RNA であるマイクロ RNA の一種、miR-210 は、もともとはヒト巨核芽球性白血病細胞株 UT-7 がエリスロポエチン依存性に赤血球系の表現型を獲得する際に強発現する miRNA の一つとして、我々が注目した分子である。miR-210 は血球系細胞だけではなく、固形腫瘍においても発現するとの報告が相次いだことから、我々は腫瘍細胞における miR-210 の機能について精査、解析を実施した。その結果、miR-210 は、がんの予後因子の一つである HIF-1a によって発現が誘導され、トランスフェリンレセプターの転写調節や鉄-硫黄クラスター形成のパスウェイを標的として、鉄代謝関連遺伝子 ISCU とトランスフェリンレセプターの発現を抑制し、細胞内の鉄恒常性の調節に関与することを明らかにした。miR-210 は新たなバイオマーカーあるいは治療標的として期待できる。

本分担研究には、以下の研究協力者が参加した。

- 吉岡祐亮 （早稲田大学大学院先進理工学研究科博士課程1年）
- 小坂展慶 （独立行政法人国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野研究員）
- 落谷孝広 （独立行政法人国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野分野長）

A. 研究目的

1993年にマイクロRNA(miRNA)が線虫で発見されて以降、ウイルス、植物、動物の広く様々な生物種で miRNA の存在が明らかとなった (図1)。

最近までの知見では、miRNA は細胞の分化や増殖、個体の代謝や発生など、多様な生命現象に関与する。一方、がんの悪性化の機序では、がんとその微小環境の関係が重要であるが、特に低酸素環境下におけるがん細胞の挙動は、転移や薬剤耐性と関わっている事が知られている。本研究で注目した miR-210 は、もともとはヒト巨核芽球性白血病細胞株 UT-7 がエリスロポエチン依存性に赤血球系の表現型を獲得する際に強発現する miRNA の一つとして、我々が注目した分子である (図2: Kosaka *et al.*, Brit J. Haematol. 2008)。本研究では低酸素環境下において発現が上昇する miRNA である miR-210

とがん細胞の関係を解明し、がん治療における新たな診断法に結びつくバイオマーカーあるいは治療標的分子としての有用性を明らかにする。

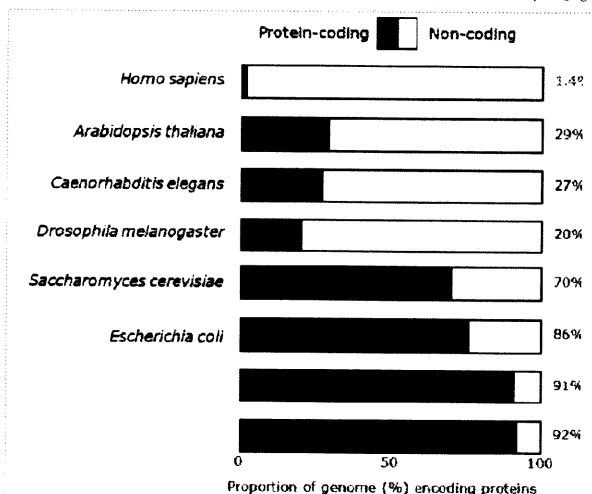


図1 真核生物およびバクテリアのゲノムに占める非翻訳配列の割合(白色). ヒトのゲノム情報の大部分は蛋白質情報をコードしない. Szmancki *et al.*, Genome Biology, 2002

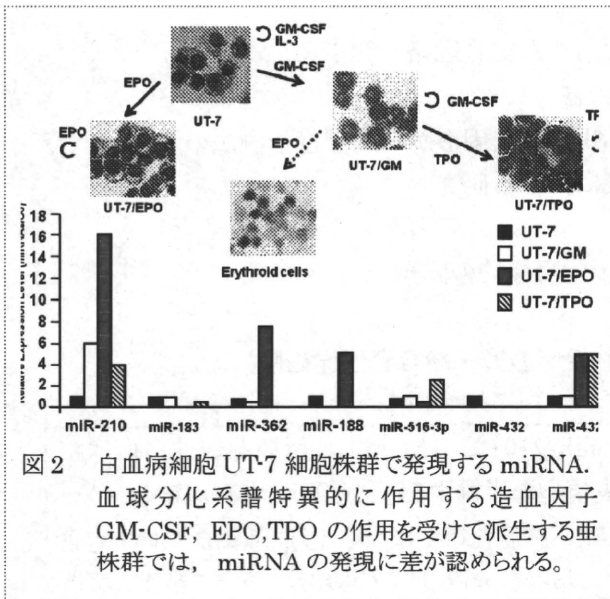


図2 白血病細胞 UT-7 細胞株群で発現する miRNA. 血球分化系譜特異的に作用する造血因子 GM-CSF, EPO, TPO の作用を受けて派生する亜株群では, miRNA の発現に差が認められる。

B. 研究方法

まず, 造血器腫瘍細胞株 UT7 で miR-210 の高発現を確認した。次に固形腫瘍細胞として, ヒト前立腺がん由来 PC3 細胞, ヒト乳がん由来 MCF7 細胞, ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞を対象にし, miR-210 の転写一次産物 pri-miR-210 の発現を調べた。このうち, 低酸素ストレスにより miR-210 の発現が顕著であった MCF7 細胞株を主に用いて解析を進めた。低酸素ストレスの付加は 1%酸素嫌気細胞培養で実施し, 通常低酸素培養期間は 24 時間に設定した。さらに siRNA を用いて HIF-1 α の発現を減少させた後, miR-210 の発現をリアルタイム定量 PCR 法により測定した。MCF7 細胞および HEK293 細胞を低酸素環境で培養し, ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として, 低酸素に応答する miR-210 のプロモーター領域を同定した。

米国 Whitehead Institute for Biomedical Research が公開しているデータベースツール Target Scan (<http://www.targetscan.org>) を用いて, miR-210 の標的遺伝子をより絞り込み, ルシフェラーゼ下流に標的遺伝子の 3' UTR を組み込み, 標的遺伝子としての可能性を評価した。次いで, 固形腫瘍細胞株における miR-210 の発現と検索された候補遺伝子との発現連鎖について, miR-210 を強制発現させた細胞を作成

し, 標的遺伝子の蛋白質量をイムノブロット法で確認した。

(倫理面の配慮)

特記する事項なし。

C. 研究結果

【低酸素ストレスを与えた固形腫瘍細胞における miR-210 の発現】

ヒト前立腺がん由来 PC3 細胞, ヒト乳がん由来 MCF7 細胞, ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞のそれぞれを, 20%酸素環境あるいは 1%低酸素環境で培養し, pri-miR-210 の発現を調べた。その結果, いずれの細胞株においても, 低酸素ストレスによって miR-210 前駆体の転写が顕著に高まることが判明した (図 3)。

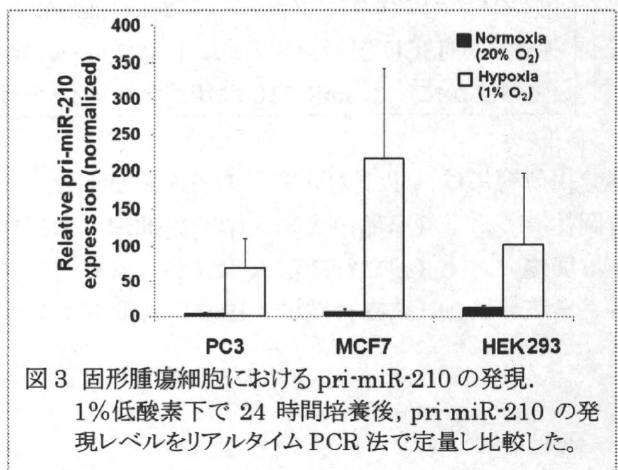


図3 固形腫瘍細胞における pri-miR-210 の発現。1%低酸素下で 24 時間培養後, pri-miR-210 の発現レベルをリアルタイム PCR 法で定量し比較した。

低酸素ストレス加 MCF7 細胞に, HIF-1 α の siRNA を添加し, 48 時間後の miR-210 の発現は有意に低下したことから, HIF-1 α の転写制御を受けて, miR-210 の発現が誘導されることが明らかとなった (図 4)。

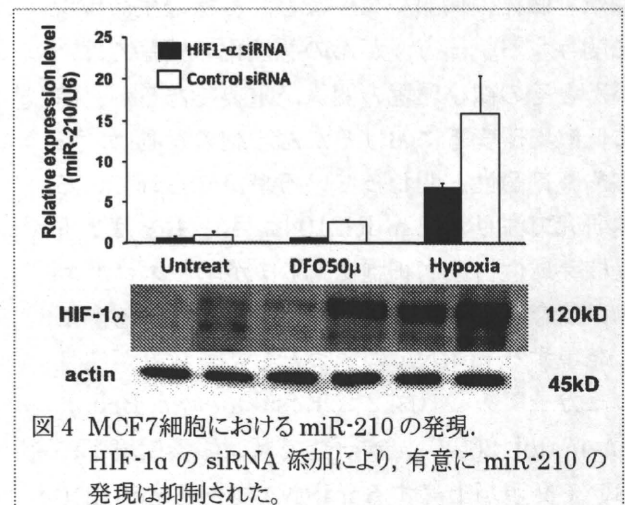


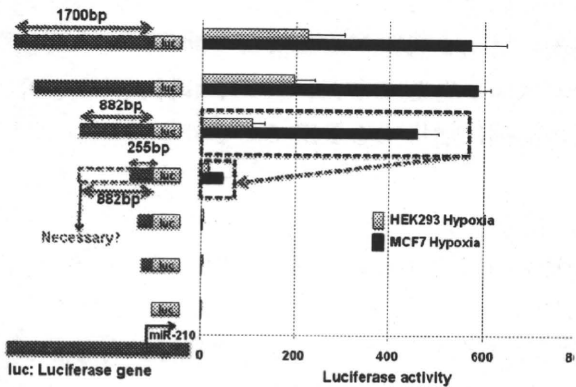
図4 MCF7細胞における miR-210 の発現。HIF-1 α の siRNA 添加により, 有意に miR-210 の発現は抑制された。

【miR-210のプロモーター領域解析】

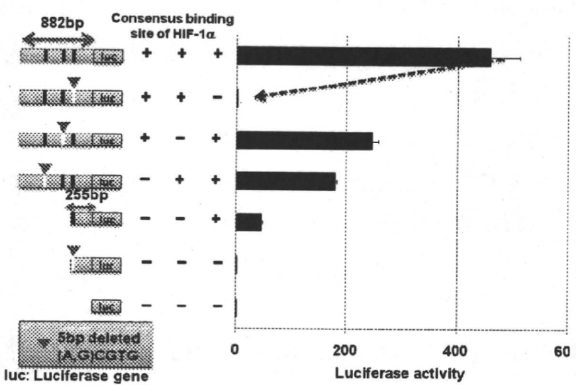
低酸素環境下では miR-210 が低酸素誘導転写因子 HIF-1α によって発現が誘導されることを踏まえ、ルシフェラーゼをレポーター転写開始地点上流約 250bp にある ACGTG 配列と HIF-1α の結合が転写制御に重要であることを示した (図 5)。

図5 miR-210 のプロモーター領域の決定.

A) 低酸素ストレス加 MCF7細胞および HEK293細胞における解析



B) MCF7細胞における miR-210 発現と、プロモーター領域における HIF-1α 結合配列の位置



【miR-210 の標的遺伝子の検索】

Target Scan により、複数の miR-210 の標的遺伝子候補を検索した (図 6)。これらのうち、腫瘍病態に関与する新たな分子ネットワークの発掘を期待し、細胞において鉄代謝の恒常性を担う鉄-硫黄クラスター形成の足場タンパク質 (ISCU; 図 7) に注目することとし、また、細胞内への鉄取り込みを担うトランスフェリンレセプター (TfR) にも併せて、miR-210 発現とこれらの翻訳抑制の連鎖を解析した (図 7)。この結果、MCF 細胞と PC3 細胞において、

miR-210 強制発現細胞では有意に ISCU, TfR の発現が低下した (図 8)。

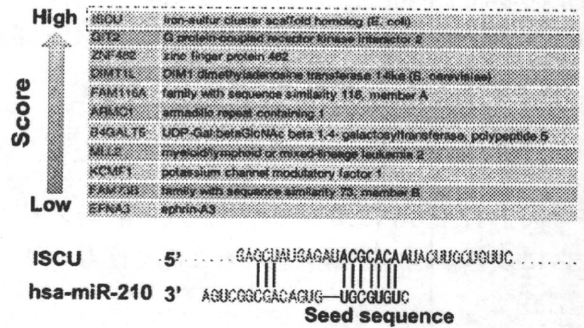


図 6 Target Scan による miR-210 標的遺伝子検索.

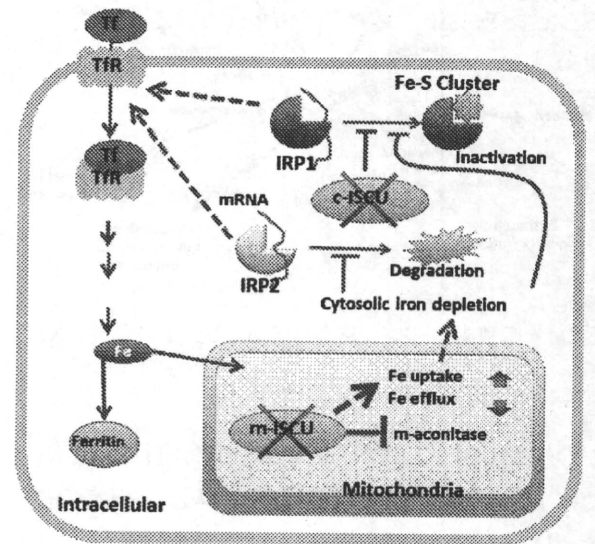


図 7 ISCU-TfR による鉄代謝の恒常性
 Wing-Hang Tong and Tracey A. Rouault.
Cell Metabolism (2006)

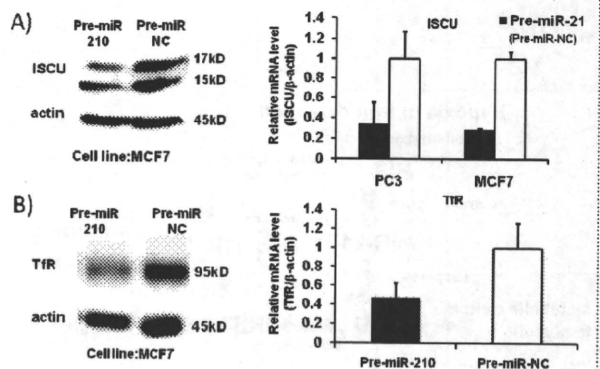


図 8 miR-210 強制発現腫瘍細胞 (MCF7 あるいは PC3 細胞) における標的候補分子の発現
 A) ISCU の発現抑制
 B) TfR の発現抑制

以上の結果をまとめると、転写因子 HIF-1α によって miR-210 の発現が誘導され、転写開始地点上流約 250bp にある ACGTG 配列が転写制御

に重要であることを示した。腫瘍細胞における miR-210 の発現により、鉄-硫黄クラスター形成に必要な ISCU と、細胞内への鉄取り込みを担うトランスフェリンレセプターの翻訳が抑制された。

D. 考察

転写因子 HIF-1 α による転写制御は低酸素ストレスによる細胞の腫瘍病態などに深く関与する (図 9)。

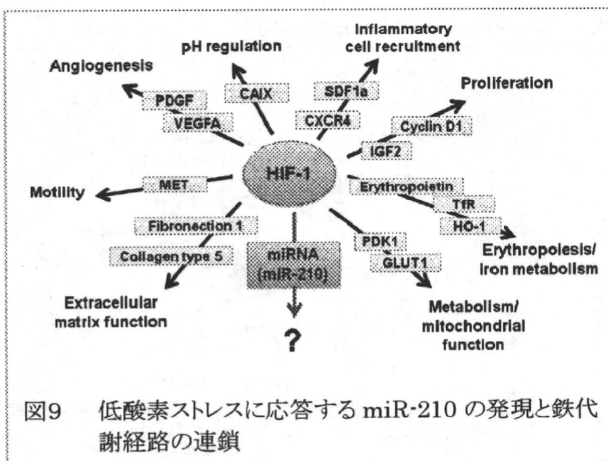


図9 低酸素ストレスに応答する miR-210 の発現と鉄代謝経路の連鎖

この経路の中で、本研究は新たに、HIF-1 α によって miRNA-210 の発現が上昇し、細胞の鉄代謝に関わる 2 つの遺伝子の発現を制御することで、鉄代謝に関与していることが示した。miR-210 は、がん細胞における低酸素環境と鉄代謝を結ぶ新たな因子であることが考えられる (図 10)。

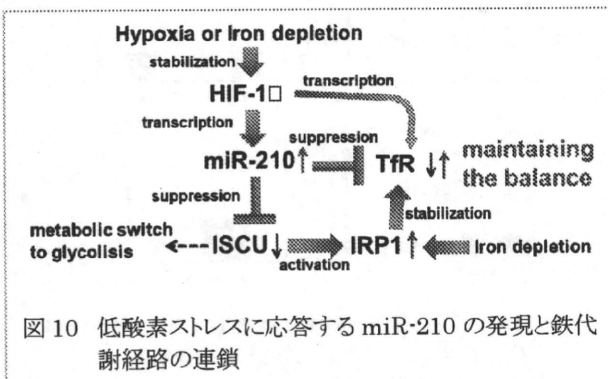


図 10 低酸素ストレスに応答する miR-210 の発現と鉄代謝経路の連鎖

HIF-1 α の発現上昇は、肺がん (Hung JJ *et al.* Thorax. 2009), 乳がん (Generali D *et al.* Clin Cancer Res. 2009) の予後不良と相関することが報告されているが、細胞内に存在する転写因

子であるため、診断マーカーとしては利用に制限がある。本研究の結果より、血液循環中に存在する miR-210 を診断マーカーあるいは HIF-1 α のサロゲートマーカーとして利用することは検討に値するといえる。また、従来、造血管腫瘍と固形腫瘍は、それぞれ異なる領域で研究対象として扱われることが多かったが、本研究のようにクローナルな解析が比較的容易である造血管腫瘍から得る実験的基盤を固形腫瘍研究に連鎖させることは、実験手法上、今後の展開で積極的に取り入れたい。従って、UT-7 細胞株に由来してゲノム情報を同一とする数種の亜株間で得たマイクロアレイ解析データを今後の展開に活用する予定である。

E. 結論

miR-210 は、がんの予後因子の一つである HIF-1 α によって発現が誘導されることから、新たなバイオマーカーとなる可能性がある。また鉄代謝関連遺伝子 ISCU とトランスフェリンレセプターの発現を制御することから、新たな治療標的の可能性もある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし (投稿準備中)

2. 学会発表

- 1) Yusuke Yoshioka, Keiichi Sugiura, Nobuyoshi Kosaka, Yusuke Yamamoto, Norio Komatsu, Hiroshi Miyazaki, Takahiro Ochiya, Takashi Kato. Erythropoietin-Inducible MicroRNA-362 Contributes to Erythropoiesis Via the Suppression of Histone Deacetylase 3. Session: Hematopoiesis · Regulation of Gene Transcription: Poster I. Poster Board II-483, Abstract 2603, 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orange County Convention Center, Orlando, Florida, USA. Dec 5, 2010