

201019026A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略事業

浸潤・転移等、がんの重要な臨床的特性の病理・病態学的分子基盤の
解析とそれに基づく診断・治療法の開発に資する研究

平成22年度 総括研究報告書

主任研究者 落合 淳志

平成22(2010)年5月

I 総括研究報告書

浸潤・転移等、がんの重要な臨床的特性の病理・病態学分子基盤の解析
とそれに基づく診断・治療法の開発に資する研究

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) ヒト前立腺がんのヒト骨転移モデルとして樹立したヒト骨を移植したHu-bone-NOD-SCIDマウスモデルを用いて検討し、ヒト前立腺がん骨転移においてヒト骨内に貯蔵されているIGF2が転移巣形成には重要な意義を有することを示した。3) 血管周囲外膜より培養した間質線維芽細胞が、ヒト肺腺癌細胞の免疫不全マウスにおけるがん生着・生存能に関わることを示して来たが、この分子基盤として間質線維芽細胞の産生するポドプラニンの働きが、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I相および第II相臨床試験を膵がん患者に対して行っている。がんにて特徴的な病理形態を3次元的に観察するOptical coherent tomography (OCT)技術をもとにした内視鏡システム μ VOISを構築し、大腸癌の粘膜筋板の破壊を初めて確認するとともに、臨床機として第I相試験を開始した。

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。このモデルに対応する膵がん患者の状態を明らかにする目的で、実際にヒト膵がん患者における神経浸潤をMRIにて評価する方法を明らかにするとともに、癌患者血液内においてIL-6の値を検索し、高頻度に高IL-6値を示すがん患者が存在することを示した。2) ヒト前立腺がんの骨転移モデルを用いて、前立腺がん細胞が骨組織内に蓄積しているIGF2を利用し増殖すること示した。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關

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。また、がんの特徴的な病理形態を3次元的に観察するOptical coherent tomography (OCT)技術をもとにした内視鏡システム μ VOISを構築し、大腸癌の粘膜筋板の破壊を初めて確認するとともに、臨床機として第I相試験を開始した。

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) ヒト前立腺がん細胞LNCaPを用いてヒト成人骨を移植したNOD-SCIDマウスにおける増殖には、骨由来のinsulin like growth factor 2 (IGF2)が重要な役割を果たしていることを、NIHとの共同研究により明らかにした。

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、ヒト肺腺がん細胞株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。がんの特徴的な病理形態を3次元的に観察するOptical coherent tomography (OCT)技術をもとにした内視鏡システム μ VOISを構築し、臨床機として第I相試験を開始した。

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を用いて、ヒト膵臓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) ヒト前立腺がん細胞LNCaPを用いてヒト成人骨を移植したNOD-SCIDマウスにおける増殖には、骨由来のinsulin like growth factor 2 (IGF2)が重要な役割を果たしていることを、NIHの抗IGF2抗体を作製しているグループで作製されたヒトIGF2特異抗体を用いて検討し、ヒト骨由来IGF2が前立腺がんの骨での増殖に重要な役割を果たすことを明らかにした。

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I相および第II相の試験臨床試験を膵臓がん患者に対して行った。

がんの特徴的な病理形態を3次元的に観察するOptical coherent tomography (OCT)技術をもとにした内視鏡システム μ VOISを構築し、大腸癌の粘膜筋板の破壊

を初めて確認するとともに、臨床機として第 I 相試験を開始した。

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。今回、がんの神経浸潤によりがん性疼痛が強くなることと、脊髄内のアストロサイトの活性化に相関性を認めたことより、膵がん患者の癌性疼痛および悪液質は、これまでの動物モデルで用いられてきたような、比較的急性の神経障害モデルではなく、癌細胞の浸潤という慢性的な神経傷害モデルにより明らかになったと考えている。実際のヒト膵がん患者においても、MR I 画像上神経浸潤が診断できる症例では、支配領域の知覚神経の変化を伴っていることが強く示唆されており、本モデルがヒト膵がん患者の知覚変化や癌性疼痛、そして悪液質のよいモデルになる可能性が示された。また、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) ヒト前立腺がん細胞のヒト成人骨移植転移機構におけるIGF2の重要性

これまでヒト成人骨を移植したNOD-SCIDマウスを用いて前立腺がんの骨転移機構を検討してきた。今年度は、NIHのグループが作製したヒトIGF2特異抗体を用いて、ヒト骨内のIGF2の阻害によりヒト前立腺がん細胞の骨での増殖を調べたところ、骨内での増殖を強く抑制することが示された。IGF2はGHの作用には影響しないことより、抗体を用いたIGF2の阻害は大きな副作用はないと考えられる。また、ヒト骨内にはIGF2の貯留は多いが、マウス骨では少ないことより、実際のヒト骨における状態は本モデルを用いなければ判

断できないと考えられた。

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。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 I、および第 II 相臨床試験を膵臓がん患者に対して行った。また、がんに特徴的な病理形態を3次元的に観察するOptical coherent tomography (OCT)技術をもとにした内視鏡システム μ VOISを構築し、大腸癌の粘膜筋板の破壊を初めて確認するとともに、臨床機として第 I 相試験を開始した。

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. Yamane Y, Ishii G, Goto K, Kojima M, Nakao M, Shimada Y, Nishiwaki Y, Nagai K, Kohrog H, Ochiai A. A Novel Histopathological Evaluation Method Predicting the Outcome of Non-small Cell Lung Cancer Treated by Neoadjuvant Therapy: The Prognostic Importance of the Area of Residual Tumor. J Thorac Oncol. 2010 Jan;5(1):49-55.

2. Mitsunaga S, Fujii S, Ishii G, Kinoshita T, Hasebe T, Aoyagi K, Sasaki H, Ochiai A. Nerve invasion distance is dependent on laminin gamma2 in tumors of pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2010 Aug 15;127(4): 805-19.
3. Kimura T, Kuwata T, Ashimine S, Yamazaki M, Yamauchi C, Nagai K, Ikehara A, Feng Y, Dimitrov DS, Saito S, Ochiai A. Targeting of Bone-Derived Insulin-Like Growth Factor-II by a Human Neutralizing Antibody Suppresses the Growth of Prostate Cancer Cells in a Human Bone Environment. *Clin Cancer Res* Jan 1;16(1):121-9, 2010.
4. Sano M., Aoyagi K. Takahashi H., Kawamura T., Mabuchi T., Igaki H., Tachimori Y., Kato H., Ochiai A Forkhead box A1 transcriptional pathway in KRT7-expressing esophageal squamous cell carcinomas with extensive lymph node metastasis. *Int J Oncol*. 36, 321-330, 2010.
5. Kojima M, Ishii G, Atsumi N, Nishizawa Y, Saito N, Ochiai A. CD133 expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Cancer Sci*. Apr;101(4):906-12. 2010.
6. Muto M, Minashi K, Yano T, Saito Y, Oda I, Nonaka S, Omori T, Sugiura H, Goda K, Kaise M, Inoue H, Ishikawa H, Ochiai A, Shimoda T, Watanabe H, Tajiri H, Saito D. Early detection of superficial squamous cell carcinoma in the head and neck region and esophagus by narrow band imaging: a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 20;28(9):1566-72.
7. Fujii S, Yamazaki M, Muto M, Ochiai A. Microvascular irregularities are associated with composition of squamous epithelial lesions and correlate with subepithelial invasion of superficial-type pharyngeal squamous cell carcinoma *Histopathology*, 56, 510-522, 2010
8. Yamaguchi Y, Ishii G, Kojima M, Yoh K, Otsuka H, Otaki Y, Aokage K, Yanagi S, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A. Histopathological features of the tumor budding in adenocarcinoma of the lung: Tumor budding as an index to predict the potential aggressiveness. *J Thorac Oncol*. 2010 Jul 13. [Epub ahead of print]
9. Ishii G, Hashimoto H., Asada K., Ito, TK, Hoshino A., Harigaya K., Nagai K., Ushijima T., Ochiai A. Fibroblasts associated with cancer cells keep enhanced migration activity after separation from cancer cells: A novel character of tumor educated fibroblasts. *Int J Oncol*. 2010 Aug;37(2):317-25.
10. Yamazaki M, Fujii S, Murata Y, Hayashi R, Ochiai A. High expression level of geminin predicts a poor clinical outcome in salivary gland carcinomas. *Histopathology*. 2010 Jun;56(7):883-92.]
11. Aokage K, Ishii G, Ohtaki Y, Yamaguchi Y, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Ochiai A. Dynamic molecular changes associated with epithelial-mesenchymal transition and subsequent mesenchymal-epithelial transition in the early phase of metastatic tumor formation. *Int J Cancer*. 2011 Apr 1;128(7):1585-95.
12. Kojima M, Nakajima K, Ishii G, Saito N, Ochiai A. Peritoneal elastic laminal invasion of colorectal cancer: the diagnostic utility and clinicopathologic relationship. *Am J Surg Pathol*. 2010 Sep;34(9): 1351-60.
13. Ohtaki Y, Ishii G, Nagai K, Ashimine S, Kuwata T, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Takeyoshi I, Ochiai A. Stromal macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2010 Oct;5(10):1507-15.
14. Yamauchi C, Fujii S, Kimura T, Kuwata T, Wada N, Mukai H, Matsumoto N, Fukayama M, Ochiai A. E-cadherin expression on human carcinoma cell affects trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity through KLRG1 on NK cells. *Int J Cancer*. 2011 May 1;128(9):2125-37.
15. Yamada A, Fujii S, Daiko H, Nishimura M, Chiba T, Ochiai A. E-cadherin expression on human carcinoma cell affects trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity through KLRG1 on NK cells. *Int J Oncol*. 2011 Feb;38(2):345-53.
16. Hishida T, Ishii G, Kodama T, Tsuta K, Nara M, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Ochiai A. Centrally located adenocarci-

noma with endobronchial polypoid growth:
Clinicopathological analysis of five cases.
Pathol Int. 2011 Feb;61(2):73-9.

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: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:0099123205(台湾)

落合淳志、他1名

国内

発明の名称:膝癌治療剤

出願番号:特願2010-122838

落合淳志、他1名

発明の名称:偏光画像計測方法及び偏光
画像計測表示方法

出願番号:特願2010-147842

落合淳志、他1名

発明の名称:癌治療剤

出願番号:特願2010-165550

落合淳志、他1名

II 分担研究報告書

1. MMP と ADAM によるがん組織内微小環境因子代謝を介したがん細胞の増殖・浸潤・転移
岡田 保典
2. 病理材料・in vivo モデルを用いたがんの浸潤転移機構解明
坂元 亨宇
3. がんの発生と進展における TGF- β ・関連分子の作用
加藤 光保
4. 新規ミトコンドリア品質管理機構とヒトがんにおけるその異常に関する研究
荒川 博文
5. がん間質の免疫微小環境に関する研究
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

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略事業）
（分担） 研究報告書

MMP とADAM1によるがん組織内微小環境因子代謝を介したがん細胞の増殖・浸潤・転移

（分担）研究者 岡田 保典 慶應義塾大学医学部病理学教室

研究要旨

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 遺伝子ファミリーは、がん組織内微小環境因子代謝を介してがん細胞の増殖・浸潤・転移に関わると考えられている。我々は、ADAM28がヒト乳がんと肺がんにおいてがん細胞特異的に発現し、がん細胞の増殖・転移と正の相関を示すことを報告してきた。本年度の研究では、酵母two-hybrid systemによりADAM28と結合する候補分子としてconnective tissue growth factor (CTGF)を見出し、ADAM28のシステインリッチドメインにあるhypervariable regionとの結合を証明するとともに、ADAM28が本分子の切断によりvascular endothelial growth factor₁₆₅ (VEGF₁₆₅)/CTGF複合体よりVEGF₁₆₅を遊離し、ヒト乳がん組織での血管新生に関与する可能性を示した。さらに、ADAM28に対するELISA系を開発し、非小細胞肺癌患者血清では健常者より有意に高値であり、病期Iの患者や術後再発、リンパ節転移陽性の患者で有意に高くなることから、血清ADAM28の測定は非小細胞肺癌患者の非侵襲的診断法として有望と推定された。

A. 研究目的

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がヒト乳がんや肺がんでがん細胞特異的に高発現し、がん細胞の増殖・浸潤・転移と相関することを報告してきた。また、ADAM28はinsulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3)の分解によりinsulin-like growth factor-1を遊離し、乳がん細胞の増殖に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。しかし、ADAM28の基質に関する情報はきわめて限られており、IGFBP-3以外の基質に関する報告はない。そこで、本研究課題

ではADAM28の新規基質を酵母two-hybrid systemにより探索し、結合候補分子としてconnective tissue growth factor (CTGF)を見出し、CTGFのADAM28との結合と分解、vascular endothelial growth factor₁₆₅/CTGF複合体へのADAM28による作用、ヒト乳がん組織におけるADAM28、CTGF、VEGF発現について検討した。また、ADAM28の非小細胞肺癌患者における血清レベルの測定が肺がんの非侵襲的診断法になるかを検討した。

B. 研究方法

ADAM28の新規基質探索と特異的結合の証明：ADAM28のC末端部disintegrin-like/cysteine-rich/secreted-specificドメインをbaitにして、酵母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、候補分子に

対するADAM28の結合ドメインを酵母two-hybrid assayにより検討した。タンパク質レベルでの結合を調べるために、結合候補分子であるCTGFタンパク質を¹²⁵Iで標識し、プレート上に固相化したリコンビナントADAM28とインキュベートし、両分子の結合能を検証した。また、特異的結合能を過剰量の非標識CTGF、抗CTGF-N末端部特異抗体、抗CTGF-C末端部特異抗体処理による結合阻害実験で検討した。さらに、ADAM28のCTGFへの結合部位を決定するために、ADAM28のシステインリッチドメインにあるhypervariable regionに対応する2分割合成ペプチド (⁵⁶⁷QGGSDNLPWKGRIVT⁵⁸¹と⁵⁸²FLTAKTFDPEDTSQEI⁵⁹⁷)、ディスインテグリンループに対応するペプチド (⁴⁶⁵CRPAKDECDLPEMC⁴⁷⁸)、RGDペプチドとインキュベート後に結合実験を行った。

ADAM28によるCTGFとCCNファミリー分子の分解: ¹²⁵Iで標識したCTGFと活性型ADAM28を重量比10-50:1で24時間、あるいは重量比10:1で0-24時間、37°Cでインキュベートし、その分解をSDS-PAGE後オートラジオグラフィーで検討した。同様に、cysteine-rich 61 (Cyr61/CCN1)、nephroblastoma overexpressed (NOV/CCN3)、Wnt-inducible secreted proein-1 (WISP-1/CCN4)、Wnt-inducible secreted proein-2 (WISP-2/CCN5)、Wnt-inducible secreted proein-3 (WISP-3/CCN6)と活性型ADAM28を重量比10:1で0-24時間インキュベートし、これらのCCNファミリー分子の分解を観察した。また、CTGF分解産物に関しては、Edman分解法にてN末端シーケンスを行った。

ADAM28のVEGF₁₆₅/CTGF分解によるVEGF₁₆₅血管新生活性の賦活化実験: マイクロプレート上にCTGFをコーティングし、¹²⁵Iで標識したVEGF₁₆₅を加えて複合体を形成した。この複合体を活性型ADAM28と37°Cで0-48時間インキュベートし、溶媒中とプレート上のVEGF₁₆₅をガンマカウンターで測定した。また、human umbilical vein

endothelial cell (HUVEC)をVEGF₁₆₅単独、VEGF₁₆₅/CTGF複合体、VEGF₁₆₅/CTGF複合体のADAM28による分解産物を含む培養液で24時間培養し、VEGF receptor 2 (VEGFR2)とその下流シグナルであるERK1/2分子のリン酸化をリン酸化分子特異的抗体を用いてイムノプロット法で解析した。

ヒト乳がん組織でのADAM28、CTGF、VEGFのmRNAおよびタンパク質発現: ヒト乳がん(16症例)と非がん部乳腺組織(10症例)よりRNAを抽出し、RT-PCRにてADAM28、CTGF、VEGF、β-actinの発現を検討した。また、これら乳がんと非がん部乳腺組織のパラフィン切片について、抗ADAM28抗体、抗CTGF抗体、抗VEGF抗体とそれぞれに対応する非免疫イムノグロブリンを用いて、avidin-biotin-peroxidase complex法にて免疫組織染色を行った。

ADAM28特異的ELISA法の開発と非小細胞肺癌患者血清中のADAM28レベル測定: 2種類の異なる部位を認識する抗ADAM28モノクローナル抗体を組み合わせてELISA系を開発し、本アッセイ系がADAM8, 9, 10, 12, 17, ADAMTS1, 4, 5, MMP-1, 2, 3, 7, 9, 13と交差反応しないことを確認した。本アッセイ系は0.1-10.0 ng/mlで測定でき、検出限界は0.1 ng/mlであった。非小細胞肺癌患者(102症例=90未治療症例と12再発症例)および健常者(20症例)より血清を得て、これらの検体中のADAM28濃度を上記ELISA系で測定した。また、その測定値と臨床病理学的因子との相関を統計学的に処理した。7年間経過観察されてきた径20 mm以下の肺腺がん患者の腺がん組織パラフィン切片につき、抗ADAM28抗体を用いて免疫組織染色し、がん細胞での陽性率を求め、予後との相関をKaplan-Meier法にて検討した。また、凍結組織が残存していた37症例についてはELISA法によるADAM28濃度と免疫組織染色陽性率との相関を解析した。

倫理面への配慮：組み換えDNA分子の生細胞への導入実験は、遺伝子組み換え実験に該当し、実験に当たっては法令を遵守し、遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得て行い、安全対策に十分な注意を払って行った。ヒトがん患者の血液・組織などを用いた解析にあたっては、患者本人のインフォームドコンセントを得た上で用い、慶應義塾大学倫理委員会の承認のもと、厚生労働省の倫理指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1. ADAM28システインリッチドメインのhypervariable regionを介したCTGFへの結合：酵母 two-hybrid systemによりADAM28結合候補分子としてCTGFをクローニングし、酵母 two-hybrid assayによりADAM28のシステインリッチドメインとCTGFの結合を示唆するデータを得た。リコンビナントタンパク質を用いたbinding assayにより、CTGFと潜在型ADAM28は濃度依存性に結合することを示し、その結合は非標識CTGFの添加により阻害されるのみならず、CTGFのC末端部特異的抗体存在下で阻害された。これらのデータから、ADAM28はシステインリッチドメインを介してCTGFのC末端部に結合すると推定された。そこで、システインリッチドメインのhypervariable regionに対応する2分割された合成ペプチドであらかじめCTGFとインキュベート後にbinding assayすると、両者によりADAM28の結合が阻害された。一方、ディスインテグリンループに対応する合成ペプチドやRGDペプチドでは阻害はみられなかった。

2. ADAM28によるCTGFの分解と切断部位の同定およびCTGF以外のCCNファミリー分子の分解：CTGFを活性型ADAM28とインキュベートすると、38 kDaのCTGFは濃度および時間依存性に20~15 kDaの複数のフラグメントに分解された。これらのフラグメントのN末端シークエンスにより、ADAM28はCTGFのヒンジ領域にあるAla¹⁸¹-Tyr¹⁸²ボ

ンドとAsp¹⁹¹-Pro¹⁹²ボンドを切断することが示された。CCNファミリー分子は類似したドメイン構造を有することからADAM28がCTGF (CCN2) 以外のCCN分子を分解する可能性が推定された。実際、CCN1, 3, 4, 5, 6分子をADAM28と24時間インキュベートすると、いずれの分子も約半分の分子量を持つフラグメントに分解された。

3. ADAM28のVEGF₁₆₅/CTGF複合体への作用とVEGF₁₆₅の遊離・賦活化：VEGF₁₆₅はCTGFと複合体を形成し、血管新生活性がブロックされることを我々は報告してきた。そこで、VEGF₁₆₅/CTGF複合体を活性型ADAM28とインキュベートしたところ、時間依存性にCTGFが選択的に分解され、VEGF₁₆₅が複合体から遊離されることが証明された。血管内皮細胞をVEGF₁₆₅単独、VEGF₁₆₅/CTGF複合体、VEGF₁₆₅/CTGF複合体のADAM28による分解産物の存在下で培養すると、VEGF₁₆₅単独とVEGF₁₆₅/CTGF複合体のADAM28分解産物とのインキュベーション下でのみVEGFR2とERK1/2のリン酸化亢進が認められた。

4. ヒト乳がん組織におけるADAM28、CTGF、VEGFの発現：ヒト乳がん組織ではVEGF誘導性の血管新生亢進が知られているので、16症例の乳がん組織におけるADAM28、CTGF、VEGFのmRNA発現をRT-PCRにより検討した。その結果、ADAM28とVEGFはそれぞれ69%と56%の症例で発現するのに対し、10症例の非がん部乳腺組織ではADAM28は20%のみで発現しており、VEGFは全ての症例で陰性であった。一方、CTGFは乳がん全例で陽性であり、非がん部乳腺組織では30%で陽性であった。免疫組織学的には、ADAM28とVEGFは主としてがん細胞に染色され、一部では間質の線維芽細胞とマクロファージが陽性であり、非がん部乳腺組織ではADAM28は導管上皮細胞に弱陽性であり、VEGFは陰性であった。CTGFは乳がん組織ではがん細胞と間質線維芽細胞に陽性であり、非がん部

乳腺組織では導管上皮細胞と間質細胞にまれに陽性であった。

5. ヒト非小細胞肺癌患者における血清中 ADAM28測定：ADAM28を特異的に測定できる ELISA 系を開発し、血清中での ADAM28 レベルを測定したところ、肺癌患者では健常者に比べ4.6倍高値であり、肺癌のステージとともに上昇した。また、そのレベルは肺癌再発症例やリンパ節転移陽性症例において有意に高値を示した。本アッセイ系の感度、偽陰性率、AUCは、肺癌診断に繁用されている carcinoembryonic antigen よりも優れていた。径20 mm以下の肺腺がん症例においては、ADAM28の血清レベルと免疫組織染色によるがん細胞での染色陽性率との間に正の相関があり、免疫染色率の高い肺腺がんでは低い腺がん症例に比べて累積生存率は有意に低値を示した。

D. 考察

本研究により、ADAM28はCTGFのC末端領域を介して結合するのみならず、CTGFを基質として分解することが初めて明らかとなった。ADAM分子の基質特異性は高く、酵素学的研究で繁用される精製酵素で予想基質を切断することで基質を見出す方法ではADAMの基質探索はきわめて困難である。我々は酵母 two-hybrid 法を用いて ADAM28 との結合タンパク質を網羅的に探索し、CTGFを同定した。本法により P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)がADAM28と結合することを既に報告しているが、PSGL-1はADAM28では分解されない。最近のADAM様蛇毒メタロプロテアーゼの結晶構造解析データから、ADAMの基質はシステインリッチドメインの hypervariable region との結合により捕捉され、メタロプロテアーゼドメインの活性中心へ基質を適切に配置することでプロテアーゼ活性が発揮されるとされている。ADAM28はhypervariable regionを介してCTGFと結合することが示されたのに対し、ADAM28では

分解されない PSGL-1 の結合部位はディスインテグリンドメインにあり、これらのデータは結晶構造解析で提唱された仮説に一致する。また、このことは ADAM の hypervariable region への結合分子を網羅的に調べることで新規基質の探索ができる可能性を示唆している。

CTGFを含むCCNファミリー分子は、CCN5ではC-terminal cysteine-knot motifドメインを欠失するも、他の分子はIGFBP、von Willebrand factor type C (VWF)、thrombospondin type I motif (TSP)、C-terminal cysteine-knot motifの各ドメインから構成されており、VWFドメインとTSPドメイン間にはヒンジ領域が存在することが知られている。これまでの研究で、ADAM28とは異なる切断部位ではあるが、MMP-1, 2, 3, 7, 13, 14もCTGFのヒンジ領域を切断することから、ヒンジ領域はメタロプロテアーゼ活性の作用を受け易い構造的特徴を有すると推定される。本研究では、全てのCCNファミリー分子がADAM28によりほぼ2分割されることが明らかとなったことから、ADAM28はおそらくこれら分子のヒンジ領域を切断すると想像される。

VEGF₁₆₅はCTGFとの複合体で血管新生活性がブロックされることを我々は報告してきたが、本研究ではVEGF₁₆₅/CTGF複合体に対してADAM28はCTGFの分解・遊離によりVEGF₁₆₅の血管新生活性を賦活化することを明らかにした。さらに、ヒト乳がん組織においては主としてがん細胞を中心にしてADAM28、VEGF、CTGFが発現亢進していることを示した。これらのデータは、ヒト乳がん組織で観察される血管新生亢進がADAM28による選択的なCTGF分解とVEGF₁₆₅の賦活化によって部分的に説明できる可能性を示唆している。

我々の研究では、ADAM28はヒト乳がんのみならず非小細胞肺癌でも癌細胞にかなり選択的に発現亢進することが明らかとなった。本研究では、ADAM28に対するELISA系を開発し、肺癌患者においては健常者に比較して有意に血清レベルが高く、

がんの病期、再発、リンパ節転移の陽性群でより高値になることを証明した。本アッセイ法は肺がんの診療で用いられている carcinoembryonic antigen よりも感度や AUC で優れていたことから、肺がんの診断法として将来的に期待される。

E. 結論

ADAM28の新規基質としてCTGFを同定するとともに、ADAM28はVEGF₁₆₅/CTGF複合体に対するCTGFの特異的切断によりVEGF₁₆₅血管新生活性を賦活化することを明らかにした。また、ヒト乳がん組織でこれらの分子が主としてがん細胞を中心にして高発現しており、ADAM28がヒト乳がん組織における血管新生亢進の一つのメカニズムの可能性を示した。肺がん患者では血清中のADAM28が健常者より高値であり、肺がんの診断、病期、再発、リンパ節転移の診断法として将来的に臨床応用できる可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mochizuki, S., Tanaka R., Shimoda M., Onuma J., Fujii Y., Jinno H. and Okada Y.: Connective tissue growth factor is a substrate of ADAM28. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402:651-657, 2010.

Kuroda H., Mochizuki S., Shimoda M., Chijiwa M., Kamiya K., Izumi Y., Watanabe M., Horinouchi H., Kawamura M., Kobayashi K. and Okada Y.: ADAM28 is a serological and histochemical marker for non-small-cell lung cancers. *Int. J. Cancer* 127:1844-1856, 2010.

2. 学会発表

岡田保典：メタロプロテアーゼ (MMP/ADAM) の病理学的研究：ADAM28のがん細胞増殖・転移での役割を中心にして。第7回日本病理学会カンファランス。レクチャー。2010年8月6-7日。岡山。

Yasunori Okada: Substrates and roles of ADAM28 in human cancers. Gordon Research Conference on Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors. Invited speaker. May 2-7, 2010 (Presentation: May 4). Il Ciocco, Italy.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「病理材料・in vivo モデルを用いたがんの浸潤転移機構解明」

分担研究者 坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部病理学教室

研究要旨

膵がんにおける孤在性浸潤(SCI)に着目し、SCIの臨床病理学的意義を検討した。高SCI群では、全生存期間が短く、またWHOグレード、リンパ管侵襲の程度、リンパ節転移の頻度がいずれも有意に高く、多変量解析でも独立した予後因子であることが示された。SCIの頻度とEカドヘリン発現減少ならびにビメンチン発現増加との間に有意な相関が認められた。膵がんの特徴的浸潤様式である神経周囲浸潤の分子機構をin vitroで解析する系として、がん細胞とSchwann細胞との相互作用に付き検討した。高浸潤株は、共培養により運動能の低下が見られ、高分化で接着性が増した形態を示した。逆にSchwann細胞の運動能は亢進した。

坂元亨宇

慶應義塾大学医学部・教授

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。なかでもがんの浸潤転移は、がんの多様な病態を理解しがんを克服する上で、最も重要な課題である。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、多彩な浸潤転移像を規定する分子基盤を明らかにすることを目的とする。特に浸潤転移におけるEMT/MET、micropapillaryパターンとリンパ節転移、肝細胞がんの肝内転移、膵がんの神経周囲浸潤などの特徴的な病理像をターゲットとした研究を行う。

B.研究方法

がんの中でも特に難治のがんで新規診断・治療法の確立が望まれる肺がん・肝がん・膵がん・卵巣がん等を主な対象とする。

臓器がんの特徴的な病理像の中でも、特に特徴的な浸潤・転移として、がん浸潤転移におけるEMT/MET、がんのmicropapillaryパターン、肝細胞がんの肝内転移、膵がんの神経周囲浸潤・リンパ節転移、浸潤転移と幹細胞性の獲得を主な課題として、その詳細な臨床病理学的解析、背景の分子基盤の解析を行う。

具体的な方法としては、凍結検体を用いた網羅的遺伝子発現解析、病理組織・Tissueマイクロアレイと免疫組織

化学、蛍光抗体、*in situ* hybridization とを組み合わせた *in situ* 分子解析、病理画像デジタル化による定量解析を行い、臨床病理像との多次元的な解析を行う。さらには、これらの Tissue Biology の成果を実際の臨床へと展開するための橋渡しとして、病理像を再現する *in vivo* アッセイ系としてのがん同所移植モデルの確立と応用を行う。

(論理面への配慮)

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) 膵がんにおける孤在性浸潤の意義
1991年から2007年の間に切除がなされた通常型浸潤性膵管がん114例を対

象とした。組織標本上、間質内に単独で浸潤するがん細胞を、孤在性がん細胞と定義し、10高倍視野での孤在性がん細胞数をもって、個々の症例のSCIの程度を評価した。73/114症例

(67%)では10高倍視野における孤在性がん細胞の数が7以上であり、高SCI群と分類した。高SCI群では、全生存期間が短く、またWHOグレード、リンパ管侵襲の程度、リンパ節転移の頻度がいずれも有意に高かった。さらに多変量解析により、SCIの程度、WHOグレード、病理学的切除断端が独立した予後因子であることが示された。SCIの程度とWHOグレードは、ともに腫瘍分化度の指標であり、これらを組み合わせた解析を追加検討した。グレード3の大部分(27/28症例)は、高SCI群に分類され、非常に予後不良であった。一方、グレード1/2の内、高SCI群は49/86症例(57%)であり、グレード1/2の中で比較すると、高SCI群の方が低SCI群に比べ有意に予後不良であった。免疫組織化学的検討により、Eカドヘリン発現減少ならびにビメンチン発現増加が、特に孤在性がん細胞で顕著にみられ、統計学的にもSCIの頻度とEカドヘリンならびにビメンチンの発現率との間に有意な相関が認められた。

2) 膵癌神経周囲浸潤の分子機構

これまでに本研究室では、膵がん神経周囲浸潤の研究をマウスモデルによる*in vivo*解析を中心に行ってきたが、分子レベルでの膵がん神経周囲浸潤

を解析するためには、*in vitro*での検討が不可欠である。最終的に *in vitro*での神経周囲浸潤モデルの構築を目的として、まず、非接触下での検討を行った。マウス Schwann 細胞の液性因子による腓がん細胞株への影響を調べるために、マウス Schwann 細胞株 SW10 を 48 時間培養後、transwell に腓がん細胞株を播き、migration assay より運動能を評価した。高神経周囲浸潤株 Capan-1、低神経周囲浸潤株 AsPC-1 いずれも、NIH3T3 存在下で、運動能の亢進が見られた。一方、SW10 存在下では、コントロール（培養液 RPMI）と比較して、Capan-1 は運動能の低下、AsPC-1 では亢進が見られた（図 4）。このとき、transwell 中の Capan-1 を観察したところ、高分化で接着性が増した形態を示していた。さらに、腓がん細胞存在下でのマウス Schwann 細胞の増殖を形態の観察および細胞増殖アッセイより評価したところ、SW10 単独に対して、細胞数が約 1.5 倍になっていることがわかった（図 6）。また、腓がん細胞の運動能とは逆に、マウス Schwann 細胞の運動能を検討したところ、SW10 は Capan-1 存在下で、運動能が亢進したが、AsPC-1 では変化が見られなかった。

D. 考察

1) 腓がんにおける孤在性浸潤の意義
本研究は、腓がんにおける SCI の臨床病理学的意義を検討した初めての研究である。低分化がん成分が腓がん

における予後因子であることは知られていたが、部分的に認められる低分化成分の意義についてはこれまで明らかでなかった。本研究では、孤在性がん細胞に着目することで、腓がんにおいて部分的にでも認められる低分化成分が予後因子として重要であることを示した。また孤在性がん細胞は、形態学的に上皮性の性格を最も失ったがん細胞と考えられたが、上皮間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) の代表的マーカーである Eカドヘリンとビメンチンの免疫組織化学による検討から、孤在性がん細胞が顕著な EMT の組織学的形態像とみなすできるとともに、SCI の程度が EMT の組織学的指標となる可能性が示唆された。

2) 腓がん神経周囲浸潤の分子機構
腓がん神経周囲浸潤のメカニズムとして、Schwann 細胞によって分泌される液性因子が、腓がん細胞を神経周囲に留まりやすくし、さらに、その場で分化させる方向へ導いている可能性が示唆された。今後、Capan-1 (AsPC-1) 単独培養および Capan-1 (AsPC-1) と SW10 の非接触共培養、それぞれの Capan-1 および AsPC-1 細胞を用いた microarray 解析より、詳細な分子レベルでの検討を行う予定である。

E. 結論

多様ながんの浸潤転移機構を解明するために、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、浸潤転移像を規定する分子基盤を明らかにすることを目的とする。本年度は特に膵がんの孤在性浸潤の臨床病理学的意義、さらに神経周囲浸潤の分子機構の検討を行い、新たな知見が得られた。

F. 健康危険情報
該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hashiguchi A, Hashimoto Y, Suzuki H, Sakamoto M. Using immunofluorescent digital slide technology to quantify protein expression in archival paraffin-embedded tissue sections. *Pathol Int* 60: 720-725, 2010
2. Sakamoto M, Effendi K, Masugi Y. Molecular diagnosis of multistage hepatocarcinogenesis. *Jpn J Clin Oncol.* 40(9): 891-6, 2010
3. Mamiya T, Yamazaki K, Masugi Y, Mori T, Effendi K, Du W, Hibi T, Tanabe M, Ueda M, Takayama T, Sakamoto M. Reduced transforming growth factor-beta receptor II expression in hepatocellular carcinoma correlates with intrahepatic metastasis. *Lab Invest.* 90(9): 1339-45, 2010
4. Uchida H, Yamazaki K, Fukuma M,

Yamada T, Hayashida T, Hasegawa H, Kitajima M, Kitagawa Y, Sakamoto M. Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer Sci* 101(7): 1731-7, 2010

5. Masugi Y, Yamazaki k, Hibi T, Aiura K, Kitagawa Y, Sakamoto M. Solitary cell infiltration is a novel indicator of poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Hum Pathol* 41: 1061-1068, 2010
6. 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* 101: 666-672, 2010
7. 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* 391: 486-491, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし。

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

がんの発生と進展におけるTGF- β ・関連分子の作用

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

がんの発生と進展に関わるTGF- β 関連分子の機能を明らかにすることを目的とした。多くの癌で発現が亢進しているTMEPAIがTGF- β の標的遺伝子で、TGF- β シグナルを抑制する分子機構を明らかにし、発癌を促進することを示した。また、THG-1は扁平上皮癌のほとんどで過剰発現しており、RAS-MAPK経路により活性化され、腫瘍形成能と浸潤能を亢進することを見いだした。

A. 研究目的

発癌におけるTMEPAIファミリーとTHG-1の作用を明らかにし、新たな発癌促進機序に基づく、分子標的治療を開発することを研究目的とした。

B. 研究方法

TMEPAIの臨床病理学的研究を可能にするために、特異抗体を作成した。また、癌細胞において過剰発現やノックダウンを行い、腫瘍形成能に対する作用を解析した。また、TMEPAIとそのファミリー分子であるC18orf1のノックアウトマウスを作成して発癌における機能を解析した。THG-1については、ヒト癌組織での発現を調べるとともに、扁平上皮癌における作用機序を解析した。

（倫理面での配慮）

組換えDNA実験と動物実験は、法律に則り、筑波大学に実験計画を提出し、許可を受けて実施した。

C. 研究結果

内在性のTMEPAIを免疫蛍光染色、ウェスタンブロットティング、ELISA法で検出できるモノクローナル抗体を作製し、多くの癌細胞でTMEPAIの発現が亢進していることを示した。また、TMEPAIの発現制御機構を明らかにした（Nakano 2010）。癌細胞でTMEPAIをノックダウンして免疫不全マウスの皮下に移植することにより、TMEPAIに腫瘍形成促進能を持つことを示した。また、TMEPAIとそのファミリー分子であるC18orf1のノックアウトマウスを作製し、Apc^{Min/+}マウスと交配して、大腸腺腫形成におけるTMEPAIファミリーの作用を解析している。THG-1は食道癌、子宮頸癌、肺扁平上皮癌など扁平上皮癌の9割以上の症例で発現が亢進していた。また、RAS-MAPK経路によって活性化されて細胞膜に移行し、細胞増殖、腫瘍形成、細胞運動能を亢進させることを証明した。

D. 考察

TMEPAIは、多くの癌で発現が亢進しており、腫瘍形成を促進しているため、がんの再発診断や治療の分子標的となる可能性が示された。THG-1は、扁平上皮癌の新規癌遺伝子であり、作用機序の解明が次の課題である。

E. 結論

発癌に関わる新規TGF- β 関連分子として、TMEPAIとTHG-1を発見し、新しい診断法・治療法の開発に繋がる基礎研究成果が得られた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakano N et al. Requirement of TCF7L2 for TGF- β -dependent transcriptional activation of the TMEPAI gene.

J Biol Chem. 285: 38023-38033, 2010.

Ohshima M et al. TGF- β Signaling in Gingival Fibroblast-Epithelial Interaction.

J Dent Res. 89: 1315-1321, 2010.

Kashiwagi Y et al. Trichostatin A-Induced TGF- β Type II Receptor Expression in Retinoblastoma Cell Lines.

IOVS. 51(2): 679-685, 2010.

2. 学会発表

Mitsuyasu Kato: Smad traps for negative regulation of TGF- β signaling. 59th Fujihara International Seminar. July 2010. Tomakomai.

Thanh Thao VN et al. Monoclonal antibody for TMEPAI 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月, 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

申請準備中

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

新規ミトコンドリア品質管理機構とヒトがんにおけるその異常に関する研究

分担研究者 荒川 博文 国立がん研究センター研究所腫瘍生物学分野長

研究要旨

我々は p53 及びその標的遺伝子 Micap によって制御される全く新しいミトコンドリア品質管理機構を見いだした。ヒトがん細胞においては、p53 の変異や Micap のメチル化で、この機能が異常となっており、結果的に不良なミトコンドリアの蓄積を招いている。正常細胞とがん細胞の違いを、がん細胞における異常ミトコンドリアの蓄積ととらえ、その発がんやがん進展における役割の解明と、異常ミトコンドリアを標的とした新しいがん診断法や治療法の開発の基盤を作ることをこの研究の目的とする。ヒトがんにおけるがん細胞における Micap やミトコンドリアの状況を調べ、異常ミトコンドリアから産生される活性酸素による酸化ストレスの役割を、がん細胞及びがん間質細胞の両者において明らかとする。移植腫瘍モデルを用いた解析から、in vivo におけるその意義を解明する。この研究の成果から、がんに特徴的な代謝異常のメカニズム解明と、がん細胞特異的な異常ミトコンドリアを標的とした新しいがん診断法や治療法の開発が期待される。

A. 研究目的

我々は p53 及びその標的遺伝子 Micap によって制御される全く新しいミトコンドリア品質管理機構を見いだした。ある種のヒトがん細胞においては、Micap はメチル化で不活性化されていることを見いだした。従って、多くのがん細胞において、p53 の変異や Micap のメチル化で、ミトコンドリアの品質管理機構が異常となり、結果的に不良なミトコンドリアの蓄積を招いている可能性がある。正常細胞とがん細胞の違いを、がん細胞における異常ミトコンドリアの蓄積ととらえ、その発がんやがん進展における役割の解明と、異常ミトコンドリアを標的とした新しいがん診断法や治療法開発の基盤を作ることをこの研究の目的とする。

B. 研究方法

本年度は、(1) 様々ながん細胞における Micap 遺伝子の異常の有無の解析、(2) Micap 及び p53 の異常の有無によるがん細胞におけるミトコンドリア品質管理機構の状況、(3)

Micap 及び p53 の異常を生じているがん細胞におけるミトコンドリア機能の評価、(4) 異常ミトコンドリアと活性酸素産生の関係、(5) 低酸素と Micap によるミトコンドリア品質管理機能との関係、の以上5つの項目について研究を進めた。発現は mRNA レベル、タンパク質レベルにおいて特異抗体などを用いて評価し、メチル化についてはメチル化 PCR 法やメチル化シーケンズを行った。ミトコンドリア品質管理機能は、抗 Micap 抗体及び抗 LAMP1 抗体、及びミトコンドリア局在プローブを用いた免疫染色を用いて評価した。ミトコンドリア機能評価は、単離ミトコンドリアに対する試験管内での ATP 合成活性の測定を行い、活性化酸素は MitoSox-Red や DHR などのミトコンドリア特異的な活性酸素プローブを用いて評価した。低酸素実験は、低酸素インキュベーターによる 1%酸素状態における実験を行った。

C. 研究結果

(1) 大腸がん、肺がん、乳がんなど 17 種

類のがん細胞株のうち、14種類のがん細胞株において発現の消失を認め、その原因が Mieap 遺伝子のプロモーターのメチル化であることを確認した。

(2) Mieap 遺伝子と p53 遺伝子の両方に異常を認めないがん細胞においては、ガンマ線照射や酸化ストレスなどによるミトコンドリア損傷にตอบสนองして、ミトコンドリア内ヘリソームの集積を認めた。一方で、Mieap 遺伝子のプロモーター領域がメチル化され発現の消失したがん細胞や p53 遺伝子に変異などの異常を生じているがん細胞においては、ミトコンドリア損傷にตอบสนองしたミトコンドリア内へのリソームの集積が抑制されていた。また、Mieap 遺伝子に異常を認めるがん細胞株においては、ミトコンドリア内を中心とした酸化修飾されたタンパク質の蓄積を認めた。

(3) Mieap 遺伝子に異常を認めるがん細胞株では、ミトコンドリアからの ATP 合成活性の低下を認めた。

(4) Mieap 遺伝子や p53 遺伝子のいずれかに異常を認めるがん細胞株では、ミトコンドリアからの活性酸素産生の増加を認めた。

(5) 低酸素状態において、Mieap 遺伝子のノックダウン細胞株や Mieap 遺伝子のメチル化がん細胞株からは、高いレベルの活性酸素の発生を認めた。一方で、p53 及び Mieap 遺伝子に異常を認めない細胞株及び Mieap メチル化がんへの外来性 Mieap 導入細胞株においては、低酸素ストレスに反応して、ミトコンドリア内へのリソームの集積を認め、活性酸素の発生が抑制されていた。

D. 考察

本年度の研究によって、Mieap 遺伝子は 60% 以上のがん細胞株において、癌腫を問わず、高頻度にプロモーターのメチル化によって、その発現が消失している事実が明らかとなった。この異常は、生体内における臨床がんにおいて、がんの発生・浸潤・転移のいずれの段階で生じてくる異常であるのかについて、今後臨床検体を用いた詳細な解析を行って、明らかとする必要があると思われた。

プロモーターのメチル化によってその発

現消失しているがん細胞や p53 に変異を生じているがん細胞においては、Mieap によるミトコンドリア品質管理機構が、前者では完全に喪失し、後者においても高度に抑制されていた。結果として、ミトコンドリア内及び細胞質の一部への酸化修飾タンパク質の蓄積が起こっていた。酸化修飾タンパク質は、タンパク質の機能喪失を招くことが知られているが、p53-Mieap 経路に異常を生じているがん細胞では、酸化修飾タンパク質の蓄積に伴い、ミトコンドリアからの ATP 合成活性の低下と、活性酸素の産生増加が観察された。このことは、p53-Mieap 経路に異常を生じているがん細胞では、不良なミトコンドリアが蓄積している可能性を示唆するものである。古くよりがん細胞における好氣的解糖系の亢進が Warburg effect として知られているが、我々の明らかとしたがん細胞における不良なミトコンドリアの蓄積のメカニズムは、この理由の一部をなしている可能性があると考えている。

本年度の研究成果として、もう一つ重要なことは、低酸素状態において、この p53-Mieap 経路が活性化して、ミトコンドリアの品質管理機構を通じて、ミトコンドリアからの活性酸素種の発生を防御している事実である。がん細胞における低酸素状態は、腫瘍化から浸潤転移の過程において、その適応反応が重要な役割を果たすことが知られている。p53-Mieap 経路の不活性化が、この低酸素状態への適応反応へどのような役割を果たすのかを、今後の重要な検討課題と考える。

E. 結論

p53 の新規機能として、標的分子の Mieap を介した全く新しいミトコンドリア品質管理機構を発見した。この機能は、p53 の変異や Mieap のメチル化によって、ヒトがん細胞において高頻度に不活性化されていた。結果として、不良なミトコンドリアの蓄積が生じており、この不良ミトコンドリアから産生される活性酸素種の増加が認められた。低酸素状態において、p53-Mieap 経路によるミトコンドリア品質管理機構が活性化して、活性酸素種の発生を防御していた。おそらく、がん