

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 遺伝子再構成は白血病、リンパ腫等の造血器腫瘍における主要な遺伝子異常であるが、固形腫瘍では染色体解析が困難なこともあり、これまで知られている遺伝子再構成は比較的少ない。最近、前立腺癌で遺伝子再構成が報告されている TMPRSS2-ERG、SLC45A3-ERG、NDRG1-ERG 等の ERG 融合遺伝子について、生検標本およびパラフィン包埋切片から RT-PCR 法、FISH 法、抗 ERG 抗体を用いた免疫染色法等の方法を用いて遺伝子再構成の検出を試みた。対象は PSA が 20ng/ml 以上の高値を示す進行前立腺がん症例の生検標本および前立腺摘出術を施行した手術症例である。RT-PCR 法および FISH 法による検討では、生検標本の場合 35%(7/20 例)で融合遺伝子が検出された、一方、手術症例では 16.5%(18/109 例)で融合遺伝子が検出された。生検標本に比べ、手術例で陽性率が低いのは、生検例では比較的進行した症例が多数を占めるのに対して、手術例では前立腺検診で発見された根治手術可能なステージの症例が多く含まれるためと考えられた。抗 ERG 抗体を用いた免疫染色法では、遺伝子再構成を伴う症例で細胞核が強く染色され、遺伝子再構成のスクリーニング法として有用と考えられた。

A. 研究目的

遺伝子再構成は白血病、リンパ腫等の造血器腫瘍における主要な遺伝子異常であることが知られているが、多くの固形腫瘍では染色体解析が困難なこともあり、これまで知られている遺伝子再構成の報告は比較的少ない。特に前立腺がんではこれまで特徴的な遺伝子異常が認められず、その発症の分子機序について不明な点が多かったが、最近、核内転写因子である ERG 遺伝子と TMPRSS2-ERG、SLC45A3-ERG、NDRG1-ERG 等の遺伝子再構成が報告され注目されている。本研究では、日本人における ERG 融合遺伝子の出現頻度を明らかにする目的で、生検標本およびパラフィン包埋切片から RT-PCR 法、FISH 法、抗 ERG 抗体を用いた免疫染色法等の方法による遺伝子再構成の検出を試みた。

B. 研究方法

対象は PSA が 20ng/ml 以上の高値を示す進行前立腺がん症例の生検標本および前立腺がんの診断で前立腺摘出術を施行した手術症例である。生検標本およびパラフィン包埋切片から RT-PCR 法、FISH 法、抗 ERG 抗体を用いた免疫染色法等の方法を用いて遺伝子再構成の検出を試みた。FISH 法および抗 ERG 抗体を用いた免疫染色では、キメラ遺伝

子発現の有無が既知の前立腺がん培養細胞株を雄 Scid マウスに移植した Xenograft から作成したホルマリン固定パラフィン包埋切片を陽性および陰性対照として染色条件を決定した。

(倫理面への配慮)

施設倫理委員会の承認を得た研究計画により 2008年から2010年までの期間に前立腺がんの疑いで栃木県立がんセンターを受診し前立腺生検を実施した141例について本研究についての説明を行い、研究参加についての同意を取得の上、採血を実施するとともに、生検で癌と診断され前立腺摘出術を実施した約20症例の病理組織標本を本研究に使用した。また、その他に栃木県立がんセンターで前立腺摘出術を実施した89症例のパラフィン包埋病理組織標本を施設倫理委員会の承認を得て研究に使用した。前立腺生検標本については奈良県立医大泌尿器科との共同研究により奈良県立医大および栃木県立がんセンター施設倫理委員会の承認を得て、進行前立腺がんが疑われる症例について前立腺生検実施時の生検標本の一部を凍結保存し本研究に使用した。

C. 研究結果

RT-PCR 法および FISH 法による検討では、生検

標本の場合 35%(7/20 例)で融合遺伝子が検出された、一方、手術症例では 16.5%(18/109 例)で融合遺伝子が検出された。抗 ERG 抗体を用いた免疫染色では、マウス Xenograft を用いた予備実験で間質に存在する血管内皮細胞およびリンパ球では ERG 蛋白質の発現が認められた。一方、腫瘍細胞における ERG 蛋白質の発現は、キメラ遺伝子陰性の細胞株で検出されるものの、その発現強度は低く、キメラ遺伝子の発現の有無と細胞核における染色性は良好な一致を示すことを確認した。これらの標本を陽性および陰性対照として染色を行った結果、キメラ遺伝子陽性の症例ではいずれも中等度あるいは強度の ERG 蛋白質の発現が認められた。一方、キメラ遺伝子陰性の症例では 85%(77/91 例)の症例が ERG 蛋白質陰性であり、15%(14/91 例)程度の症例で ERG 蛋白質の中等度の発現が認められたが、ERG 蛋白質が強度の発現を示す症例は認められなかった。

D. 考察

ERG 融合遺伝子の陽性率は生検標本で 35% (7/20 例)、手術症例で 16.5%(18/109 例)であった。生検例に比して手術例の陽性率が低いのは、生検例では PSA が 20ng/ml 以上の比較的進行した症例が多数を占めるのに対して、手術例では前立腺検診で発見された根治手術可能なステージの症例が多く含まれるためと考えられた。抗 ERG 抗体を用いた免疫染色では、遺伝子再構成を伴う症例で細胞核が強く染色される一方、キメラ遺伝子陰性の症例でも 15%程度の症例で ERG 蛋白質の中等度の発現を示す事が明らかとなった。このことは各内転写因子である ERG 蛋白質の発現が前立腺がんの発症に関わる重要な因子であることが推測され興味深い。また免疫染色法のみではキメラ遺伝子の発現の有無を決定することは困難であるが、前立腺がん細胞は、通常、前立腺組織中に散在性に存在するため、油浸レンズを用いる FISH 法では、広い範囲を観察することは困難である。免疫染色法は FISH 法実施前にキメラ遺伝子の有無をスクリーニングし、FISH 法による観察が必要な部位を決定する第一段階のスクリーニング法として有用と考えられた。

E. 結論

前立腺がんにおける ERG 融合遺伝子の検出は RT-PCR, FISH 法による検討で生検症例の 35%(7/20 例)、手術症例の 16.5%(18/109 例)に認められた。抗 ERG 抗体を用いた ERG 蛋白質の免疫染色法による検出は FISH 法による観察が必要な部位を決定し、ERG 融合遺伝子の有無をスクリーニングするための方法として有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyakura Y, Sugano K, Nomizu T, Lefor A, Yasuda Y. Pathogenicity of A600V variant in exon 12 of the MSH2 gene detected in a Japanese kindred with Lynch syndrome. *Jpn J Clin Oncol.* 42:78-82, 2012.

2. 学会発表

1) 菅野康吉 : 尿路上皮癌の分子腫瘍マーカー開発の現状と障壁 第31回日本分子腫瘍マーカー研究会シンポジウム 平成23年10月2日(日) 名古屋国際会議場(愛知県)

2) Makiko Tahara, Futoshi Satoh, Takeshi Inoue, Yasuyuki Miyakura, Yasuyuki Yasuda, Kokichi Sugano : Colorectal cancer cell lines sensitive to 5-aza-dC respond to topoisomerase I inhibitor and DNA cross-linking agent 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Oct.3(Mon.)-5(Wed.), 2011 Nagoya Congress Center, Nagoya

3) Takeshi Inoue, Makiko Tahara, Tetsuro Kodama, Kiyohide Fujimoto, Yoshihiko Hirao, Kokichi Sugano : Antitumor effect of a triple angiokinase inhibitor, BIBF1120 against bladder cancer cell lines harboring FGFR3 mutations 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Oct.3(Mon.)-5(Wed.), 2011 Nagoya Congress Center, Nagoya

4) Kokichi Sugano, Kohji Tanakaya, Hideki Ishikawa, Junichiro Nasu, Yoshihiro Moriya, Teruhiko Yoshida, Yoichi Furukawa : Genomic

deletion of exon5 in MLH1 is a major founder mutation in Japanese kindred with Lynch syndrome 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Oct.3(Mon.)-5(Wed.),2011 Nagoya Congress Center, Nagoya

5) Yoshiaki Matsumura, Makito Miyake, Nobumichi Tanaka, Kiyohide Fujimoto, Yoshihiko Hirao, Tetsuro Kodama, Kokichi Sugano : Prevalence of ERG gene rearrangements in Japanese patients with prostate cancer 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Oct.3(Mon.)-5(Wed.),2011 Nagoya Congress Center, Nagoya

6) Yoshitomo Chihara, Motokiyo Yoshikawa, Masaomi Kuwada, Yi Luo, Makito Miyake, Yasushi Nakai, Satoshi Anai, Kokichi Sugano, Kiyohide Fujimoto, Hiroki Kuniyasu, Yoshihiko Hirao : Integrated Genetic Analysis of Allelic Imbalance and FGFR3 Mutation by SNP-based Pyrosequencing in Urothelial Cancer 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Oct.3(Mon.)-5(Wed.),2011 Nagoya Congress Center, Nagoya

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 小細胞肺がんの診断、治療の標的分子として、CADM1 スプライシング・バリエント (CADM1v8/9) を同定し、診断マーカー、治療標的として確立することを目的として研究を行った。この結果、CADM1v8/9 を小細胞肺がん細胞培養液の 92% で検出した。また、CADM1 が PI3K を活性化することを示した。一方乳がんでは、CADM1, 4.1B の不活化が悪性化に関わることを見出した。

A. 研究目的

肺がん、乳がん、泌尿器がん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 (SCLC) の診断、治療標的分子としての細胞接着分子 CADM1 の確立、乳がんの予後予測マーカー等について検討した。

B. 研究方法

1. 小細胞肺がん特異的に発現する細胞接着分子 CADM1 のスプライシング・バリエントの解明
小細胞肺がん特異的に発現する CADM1 スプライシング・バリエント (CADM1v8/9) に対する抗体を 2 種用いて、サンドイッチ法により、SCLC 細胞培養液の SCLC 断片を定量した。CADM1 非発現 SCLC 細胞 SBC5 に CADM1 を導入し、*in vitro* での凝集実験、細胞接着の共焦点顕微鏡による観察、ヌードマウスでの腫瘍形成実験を行った。また、CADM1 高発現 SCLC 細胞 NCI-H69 に CADM1 siRNA を導入し、*in vitro* での増殖実験を行った。

2. 乳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 と、その細胞内結合分子 4.1B の乳がん組織における発現の有無を免疫組織染色により、また遺伝子プロモーターのメチル化の有無を重亜硫酸処理により、解析した。乳がん組織は順天堂大学医学部乳腺・内分泌外科にて収集し、共同研究により解析した。

(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. 小細胞肺がん特異的に発現する細胞接着分子

CADM1 のスプライシング・バリエントの解明
小細胞肺がん組織の免疫組織染色では、34 例中 9 例 (26%) に CADM1 の過剰発現が認められた。小細胞肺がん細胞培養液では 13 例中 12 例 (92%) で、サンドイッチ法により CADM1 断片を検出した。一方、同じ培養液 6 例 (46%) に、ProGRP を検出した。この 6 例では全例、CADM1v8/9 が検出された。次に、CADM1 非発現 SCLC 細胞 SBC5 に CADM1v8/9 を導入したところ、*in vitro* での凝集能が著明に増加し、この凝集能は、Ca⁺⁺、Mg⁺⁺ イオンを除去しても変わらなかった。さらにヌードマウス皮下に注入すると、CADM1v8/9 発現細胞は CADM1 発現同様に、腫瘍形成能の促進が認められた。これに対し、CADM1 高発現 SCLC 細胞 NCI-H69 に CADM1 siRNA を導入し、その発現を抑制し *in vitro* で培養すると、3 次元のスフェロイド様の増殖が著しく抑制された。

2. 乳がんの進展に関わる CADM1-4.1B 細胞接着経路の異常

細胞接着分子 CADM1 はアクチンとの結合能を有する 4.1B と細胞内で結合する。手術摘出乳がん 67 例の免疫組織染色の解析から、CADM1 タンパク質、並びに 4.1B タンパク質の発現欠如、または著明低下が、それぞれ 45 例 (67%)、49 例 (73%) で認められた。これらの異常は臨床病期の進行に伴って高頻度に認められた。さらに、CADM1 と 4.1B の発現異常は、同一患者の腫瘍の非浸潤部と比較して、浸潤部でより高頻度に認められた。

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されると考えられる。一方、非小細胞肺がんや神経膠腫では CADM1, 4.1B、腎臓明細胞がんでは、CADM4, 4.1B の発現欠如、または著明低下が、病理学的悪性度や浸潤性の高い腫瘍において、高頻度で認められ

ることが報告されていた。

乳がんでは、外科切除後のホルモン、化学療法の必要性の有無の判断が、臨床的に大きな問題となっており、一部の症例では局所再発とともに遠隔転移による再発が認められる。そこで、このような再発を予知する分子マーカーが必要であるが、その中には、乳がんの浸潤、転移に関わる分子も含まれる可能性が高い。そこで本研究では、まず、乳がんについて CADM1, 4.1B の免疫組織染色を行った。そして、CADM1, 4.1B の発現欠如、低下がそれぞれ 67%、73% に認められ、特に病理学的悪性度の高い症例に有意に高頻度で認められたことから、CADM1 経路の不活化、異常が、乳がんの浸潤、転移に関わることが示唆された。このことは、さらに、同一症例の乳がん組織における CADM1, 4.1B の比較から、CADM1, 4.1B の発現欠如・異常の頻度が非浸潤部では低く、浸潤部では高い傾向にあることにより支持される。また、乳がん培養細胞における解析から、CADM1, 4.1B の発現欠如の分子機構として、染色体欠損、遺伝子座位のゲノム DNA のヘテロ欠失などに加え、遺伝子プロモーター領域のメチル化が重要であることが明らかになった。これらの結果から、乳がんでは、他の多くの上皮性腫瘍と同様、CADM1, 4.1B はがん抑制遺伝子として働くことが示された。

これに対し、CADM1 は ATL では異所性に高発現し、むしろ ATL 細胞の浸潤能を促進し、がん遺伝子のように働くこと、また ATL 細胞では CADM1 は細胞内で、RAC のグアニン・ヌクレオチド交換因子 (GWF) と結合することを、これまでに明らかにしてきた。本研究では、ATL と類似して、SCLC でも CADM1 の高発現を見出した。しかも、前年度の研究成果として、SCLC で発現するスプライシング・バリエント CADM1 v8/9 は、これまでに検討した限り、SCLC 以外では精巢にしか発現が認められない極めて疾患特異的な分子であり、一種の癌・精巢抗原と言えるものである点で、上皮型の CADM1 を発現する ATL とは著しく異なる。この特徴を生かして、まずは診断の分子標的としての可能性を検討している。最良の癌分子診断マーカーの一つは血清診断であることから、まず培養細胞の上清中に CADM1 断片が検出できるかどうかを検討し、抗 CADM1 抗体のサンドイッチ法を用いることにより、SCLC 細胞の 92% で CADM1 断片が検出可能なこと、この感度は ProGRP の 2 倍であること、かつ ProGRP で検出できる 6 例全例を検出できたことから、CADM1 断片の診断が極めて有望であることが示された。

さらに細胞膜タンパク質である CADM1v8/9 は、SCLC 治療の分子標的としても有望と考えられる。この点に関しては、第一のアプローチはヒト化抗体の作成であり、ベンチャー企業と共同での開発の可能性を探っている。本研究では、同時に低分子阻害剤の開発のための基礎研究を進める目的で、SCLC 下流経路の解析を行い、CADM1-MPP3-DLG-PI3Kp85 が順に複合体を形成することを示した。SCLC では、CADM1 は PI3K を活性化することにより、AKT や RAC の活性化を介して、細胞運動の促進する可能性が示された。さらに、この際用いた、固相化 CADM1 細胞外断片上に CADM1 発現 MDCK 細胞を重層して、既知の低分子化合物をスクリーニングするアッセイケイは、

24 穴プレートから 96 穴プレートへの変更など実用上の数点の改良を加えるのみで、新規低分子阻害剤のスクリーニングに転用可能なことから、今後、企業などとの共同研究を模索する必要がある。

本年度の研究をもとに、今後、血中 CADM1 のサンドイッチアッセイによる SCLC の血清診断医薬品の開発、また、CADM1 を標的とする SCLC 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、引き続き研究を進める予定である。

E. 結論

CADM1 が SCLC 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、また CADM1 が培養細胞上清中で検出可能なことを見出した。これを分子標的とする血清診断マーカーの開発へ結びつく重要な知見と考えられる。また、この経路の阻害による SCLC の浸潤・転移抑制医薬品の開発も、ヒト化抗体、低分子阻害剤ともに可能と考えられ、下流分子経路を同定した。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kikuchi S, Iwai M, Sakurai-Yageta M, Tsuboi Y, Ito T, Masuda T, Tsuda H, Kanai Y, Onizuka M, Sato Y, and Murakami Y. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer Science*, in press.

2) Mima T, Okada M, Hagiya M, Miyata Y, Tsutani Y, Inoue T, Murakami Y, Ito A. Notch2 and Six1 are up-regulated during progression of early-stage lung adenocarcinoma and define its unfavorable subset at advanced stages. *Clinical Cancer Research*, in press.

3) Nagara Y, Hagiya M, Hatano, N, Futai, E, Suo S, Takaoka Y, Murakami Y, Ishiura S, and Ito A. Tumor suppressor cell adhesion molecule 1 (CADM1) is cleaved by A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and subsequently cleaved by gamma-secretase complex. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.

4) Ito A, Ichianagi N, Ikeda Y, Hagiya M, Inoue T, Kimura KB, Sakurai MA, Hamaguchi K, and Murakami Y. Adhesion molecule CADM1 contributes to gap junctional communication among pancreatic islet beta cells and prevents their excessive secretion of glucagon. *Islet*. in press.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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*, 130:1329-1337, 2012.
- 8) 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*, 117:4396-4405, 2011.
- 9) Hagiwara 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*, 186:5983-5992, 2011.
- 10) Hosokawa Y, Hagiwara M, Iino T, Murakami Y, Ito A. Non-contact estimation of intercellular breaking force using a femtosecond laser impulse quantified by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1777-1872, 2011.
2. 学会発表
- 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 99 回日本泌尿器科学会総会、名古屋市、2011 年 4 月 21 日
 - 村上善則、伊藤彰彦、後藤明輝。膜タンパク質 CADM1 による細胞の接着と浸潤の制御。第 100 回日本病理学会総会ワークショップ、横浜市、2011 年 4 月 29 日
 - 萩山満、井上敬夫、村上善則、伊藤彰彦「CADM1 のスプライシングによる神経 - マスト細胞相互作用の発生時期特異的な制御」第 100 回日本病理学会総会、横浜市、2011 年 4 月 30 日
 - Yoshinori Murakami. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human oncogenesis. The 17th Charles Heidelberger International Symposium. 西安市、中国、2011 年 6 月 6 日
 - Yoshinori Murakami, Masayoshi Nagata, Mika Sakurai-Yageta, Taketo Kawai, Yumi Tsuboi, Miwako Iwai, Mari Masuda, Akiteru Goto, Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1/TSLC, in oncogenesis. The 3rd CREST-SBM International Conference: Mathematical Methods in Cancer Cell Biology, 広島市、2011 年 6 月 9 日
 - Akiteru Goto, Junichi Shibahara, Masashi Fukayama, Yoshinori Murakami: Pathological Role of CADM1 in Cholangiocarcinoma Related and Unrelated to Liver Fluke Infection. The 3rd International Symposium 2011 at Keimyung University Dongsan Hospital Cancer Center and Korea Regional Biobank. 大邱 (テグ) 市、韓国、2011 年 6 月 17 日
 - Akiteru Goto, Masayoshi Nagata, Masashi Fukayama, Yoshinori Murakami. Loss of CADM4 expression in human non-small cell lung cancer. 文部省科学研究費「がん研究分野の特性などを踏まえた支援活動」平成 23 年度がん若手研究者ワークショップ、茅野市、2011 年 9 月 1 日
 - 櫻井美佳、丸山智子、石村恵、柳川梓、尾山大明、近藤裕子、関谷禎規、岩本慎一、田中耕一、村上善則、MALDI 質量分析を用いた細胞間接着分子 CADM1 の N 型糖鎖の解析、第 59 回日本質量分析学会総合討論会、吹田市、2011 年 9 月 14 日
 - 櫻井美佳、丸山智子、石村恵、柳川梓、尾山大明、近藤裕子、関谷禎規、岩本慎一、田中耕一、村上善則、MALDI 質量分析を用いた細胞間接着分子 CADM1 の O 型糖鎖の解析、第 59 回日本質量分析学会総合討論会、吹田市、2011 年 9 月 15 日
 - 川合剛人、後藤明輝、岩井美和子、永田政義、森川鉄平、久米春喜、深山正久、本間之夫、村上善則、Aberrations of cell adhesion molecules, CADM1 and CADM4, in urinary bladder cancer、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月 3 日
 - 萩山満、伊東剛、村上善則、伊藤彰彦「組織構築を再現した培養形における細胞間接着の力学的解析: フェムト秒レーザーの応用」第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月 3 日
 - 後藤明輝、櫻井美佳、Chawait Pairojkul, Puangrat Yongvanit, 柴原純二、深山正久、村上善則、肝吸虫関連および非関連肝内胆管癌における CADM1 の発現: 日本及びタイ症例の比較研究、第 70 回日本癌学会年会、名古屋、2011 年 10 月 4 日
 - Yuka Takahashi, Miwako Iwai, Taketo Kawai, Atsushi Arakawa, Takeshi Ito, Mika Sakurai-Yageta, Akihiko Ito, Akiteru Goto,

- Noriko Ito, Mitsuru Emi, Mitsue Saito, Fujio Kasumi and Yoshinori Murakami. Identification of molecular targets involved in the progression and recurrence of breast cancer. 第70回日本癌学会年会、名古屋市、2011年10月4日
14. 石村恵、櫻井美佳、後藤明輝、村上善則、miR-375 および miR-214/199a による CADM1 の発現抑制とそのがん化への関与、第70回日本癌学会年会、名古屋市、2011年10月4日
 15. 村上成文、櫻井美佳、村上善則、細胞伸長アッセイの特異的阻害剤の検索による CADM1 シグナル伝達経路の解析、第70回日本癌学会年会、名古屋市、2011年10月4日
 16. Shigefumi Murakami, Mika Sakurai-Yageta and Yoshinori Murakami. Analysis of CADM1 signaling pathway through screening specific inhibitors by cell-based assay. The 26th European Cytoskeletal Forum (ECF) Meeting. ストリーサ市、イタリア、2011年10月29日
 17. 村上善則、齊藤光江、江見充、Copy Number Variation (CNV) の網羅的検索による癌のゲノム異常の解析、日本人類遺伝学会第56回大会シンポジウム、千葉市、2011年11月11日
 18. 川合剛人、後藤明輝、永田政義、岩井美和子、森川鉄平、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 の異常、日本人類遺伝学会第56回大会、千葉市、2011年11月11日
 19. Mika Sakurai-Yageta, Mari Masuda, Toshiaki Watanabe, and Yoshinori Murakami, The role of a cell adhesion molecule, CADM1, in human adult T-cell leukemia, The 8th China-Japan Joint Laboratory Workshop, 北京市、中国、2011年11月21日
 20. Yoshinori Murakami. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human oncogenesis. The 1st France-Japan Cancer Workshop, モンペリエ市、フランス、2011年11月23日
 21. Yoshinori Murakami. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human oncogenesis. The 18th East Asia Joint Symposium - Life Science Today in East Asia, 上海市、中国、2011年12月9日
 22. Yumi Tsuboi, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Akihito Ito, Yoshinori Murakami. Analysis of cell adhesion molecule 1 (CADM1)-mediated inactivation of c-*Src* pathway. 第34回日本分子生物学会年会、横浜市、2011年12月15日
 23. Hiroyuki Kogai, Mika Sakurai-Yageta, Yoshinori Murakami. Cleavage of CADM1 by Caspase-3 and its role in the induction of apoptosis. 第34回日本分子生物学会年会、横浜市、2011年12月16日
 24. 伊東剛、永田政義、山田大介、川合剛人、岩井美和子、市原博美、丸山智子、櫻井美佳、伊藤彰彦、後藤明輝、村上善則、遺伝子欠損マウスを用いた CADM1 の肺腫瘍抑制における役割の解明、文部省科学研究費「がん研究分野の特性などを踏まえた支援活動」平成23年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、大津市、2012年1月18日
 25. Taketo Kawai, Akiteru Goto, Miwako Iwai, Masayoshi Nagata, Teppei Morikawa, Shigeki Morita, Haruki Kume, Masashi Fukayama, Yukio Homma, and Yoshinori Murakami, Aberration of a cell adhesion molecule, CADM1, and its pathological or biological significance in urinary bladder cancer. The 27th European Association of Urology Annual Congress, パリ市、フランス、2012年2月25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

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 骨軟部肉腫に対するインターフェロン(IFN)遺伝子導入と自家造血幹細胞移植の複合療法の開発を行っている。本年度は、基礎開発として、自家造血幹細胞移植により腫瘍特異的に免疫抑制環境を打破できる機序の解明を行った。自家造血幹細胞移植を行ったマウスにおいて、脾臓では $CD4^+$ 細胞中における $CD4^+Foxp3^+$ 制御性T細胞の割合が非移植群と比較して優位に増加しているが、腫瘍局所ではむしろ制御性T細胞の浸潤・増殖が明らかに抑制されており、抗腫瘍免疫誘導を誘導するのに適した環境を作り出していることを明らかにした。また、臨床開発としては、IFN 遺伝子治療と造血幹細胞移植の複合療法開発の第1段階として、再発骨軟部肉腫 10 例を対象とした正電荷リポソーム包埋ヒト・型インターフェロン発現プラスミドの腫瘍内注入を繰り返す遺伝子治療単独の第 I 相臨床試験の実施計画書を完成した。

A. 研究目的

原発性悪性骨腫瘍には、骨肉腫、軟骨肉腫やユーイング肉腫などさまざまな種類があり、人口100万人に対して年間約4人の発生頻度と推定されている。軟部肉腫は、線維組織、脂肪組織、筋組織、血管組織、滑膜等の軟部組織から発生する、多くは中胚葉由来の稀な悪性腫瘍であり、日本での発生数は年間1500例程度と考えられている。両者とも、有効な薬剤をすべて投与された治療終了後の再発例に対しては、推奨すべき治療法がないのが現状である。

I型インターフェロン(IFN)は、5-FUなどの抗がん剤の殺細胞効果を増強する効果以外にも、腫瘍細胞の増殖抑制や細胞死誘導といった直接的な抗腫瘍効果と、腫瘍免疫賦活や血管新生抑制などの間接的な抗腫瘍効果の両者を発揮できる。このI型インターフェロンは、骨軟部肉腫細胞に対しても、増殖抑制や腫瘍細胞死誘導効果を発揮することが報告され、さらに、臨床研究でも、骨肉腫の術後補助療法としてインターフェロン療法が有用である可能性が示されている。しかし、その治療成績は十分満足できるものとはいえず、さらに抗腫瘍効果を増強する必要がある。

従来臨床試験では、組換えIFN蛋白質を皮下・筋肉・静脈内投与など全身投与していたが、I

FNの血中での半減期が短いために、投与した量の0.01%しか標的臓器に到達しないというデリバリー上の問題があった。しかし、遺伝子治療ではベクターを用いて腫瘍局所に強く持続的にIFN蛋白質を発現することにより、局所のコントロールと全身の抗腫瘍免疫を強く誘導することが可能であり、新たな骨軟部肉腫に対する治療戦略となる可能性がある。

一方、がんは免疫寛容状態を確立しているために、免疫療法に不応性であることが多い。そこで、我々は、腫瘍特異的免疫を賦活する効果をもつIFN免疫遺伝子治療に、免疫抑制性の環境を破壊し新鮮な免疫系を再構築する効果の期待できる造血幹細胞移植を合理的に組み合わせた新たな免疫遺伝子・細胞複合療法の開発を目指している。

本研究では、1. 前臨床研究と抗腫瘍機構解明のための免疫学的研究と、2. 複合療法の臨床試験の実施を2つの柱としている。臨床試験に関しては、現在、将来的な複合療法の開発を目指し、その第一段階としてIFN遺伝子治療単独の臨床研究の準備を進めている。

B. 研究方法

1. 前臨床研究と抗腫瘍機構解明のための免疫学的研究

自家造血幹細胞移植により腫瘍特異的に免疫抑制環境を打破できる機序の解明を行うために、BALB/cマウス骨髄移植モデルを用いて、腫瘍内に浸潤する免疫抑制性T細胞の動態を免疫染色やフローサイトメーターにより解析し、がんが免疫寛容を獲得し、造血幹細胞移植がそれを打破する過程を検討した。ついで、腫瘍内の樹状細胞に着目して、造血幹細胞移植が腫瘍の制御性T細胞に及ぼす影響を免疫学的に検討した。

2. 複合療法の臨床試験の実施

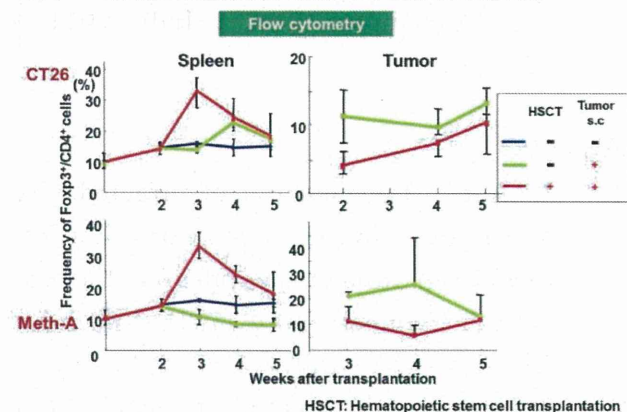
造血幹細胞移植とIFN免疫遺伝子治療複合療法開発の第1段階として、再発骨軟部肉腫を対象としたIFN- α 遺伝子治療の第I相臨床試験の臨床プロトコルを策定する。

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

自家造血幹細胞移植マウスにおいて、脾臓ではCD4⁺細胞中におけるCD4⁺Foxp3⁺制御性T細胞の割合が、非移植群と比較して優位に増加しているが、腫瘍局所ではむしろ制御性T細胞の浸潤・増殖が明らかに抑制されており、抗腫瘍免疫誘導を誘導

図1 自家造血幹細胞移植後の腫瘍における制御性T細胞の減少

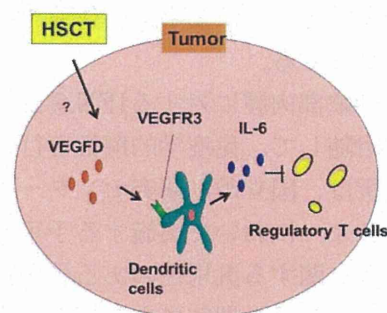


するのに適した環境を作り出していることを明らかにした(図1)。

ついで、造血幹細胞移植を行ったマウスの腫瘍内CD11c⁺細胞(樹状細胞)のサイトカイン発現解析したところ、IL-1 α 、IL-6、IL-12、TNF- α 等炎症性サイトカインの発現が明らかに亢進していた。IL-6は制御性T細胞の分化・増殖を抑制することが明らかとなっている。造血幹細胞移植後の腫瘍の微小環境がCD11c⁺細胞からのIL-6分泌を促進して、制御性T細胞を抑制している可能性が考えら

れた。そこで、96種類のマウスサイトカイン・ケモカインタンパク質を検出できる抗体アレイを用いて、造血幹細胞移植を行った腫瘍を解析した。すると、非移植群に比べてVEGF-Dの発現が3倍以上亢進していることが明らかとなった。腫瘍内のCD11c⁺細胞を、VEGF-Dにより刺激することで、IL-6の分泌を促すことが明らかとなった。さらに、VEGF-Dの受容体であるVEGFR-3に対する中和抗体を、移植マウスに投与すると、腫瘍内のCD11c⁺細胞からのIL-6の分泌は低下し、腫瘍内の制御性T細胞の頻度が増加することが示された。このように、自家造血幹細胞移植後に腫瘍内のVEGF-Dの濃度が高まり、CD11c⁺細胞に作用してIL-6の

図2 造血幹細胞移植後の腫瘍において制御性T細胞が減少する機序



分泌を促すことで腫瘍内の制御性T細胞が抑制される機序を初めて明らかにした(図2)。

2. 複合療法の臨床試験の実施

再発骨軟部肉腫10例を対象として、IAB-1(ヒト α 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤)の腫瘍内直接注入を繰り返し行う遺伝子治療単独の第I相臨床試験(用量設定試験)の臨床研究実施計画を策定し、国立がん研究センターの遺伝子治療倫理審査委員会に提出した。本臨床試験は、国立がん研究センター中央病院の臨床研究データセンターの支援をうけ、小児腫瘍科、骨軟部腫瘍科、血液腫瘍科、放射線診断科等及び研究所や、バクターの供給先である名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床試験支援センターとの共同研究として行う。

D. 結論

自家造血幹細胞移植が、腫瘍の免疫抑制環境を打破し、抗腫瘍免疫誘導を誘導するのに適した環境を作り出せることを明らかとした。GVHD発症が無い自家造血幹細胞移植と、IFN発現プラスミド

を用いた腫瘍内遺伝子導入の複合は安全性が高く、新たな免疫治療戦略となりうる。

E. 考察

近年、自家造血幹細胞移植では、がん関連抗原を認識するリンパ球が優先的に増殖するなど、様々な機序により抗腫瘍免疫を誘導できることが明らかとなっている。本研究では、腫瘍の免疫寛容環境を打破することも、この自家造血幹細胞移植の腫瘍免疫誘導機序の一つであることを示した。これは、腫瘍内IFN遺伝子導入だけでなく、腫瘍ワクチンなど様々な免疫療法と複合することが可能であり、発展性がある。今後は、予定通り、自家造血幹細胞移植後に腫瘍免疫を担うリンパ球の特徴を明らかとし宿主細胞との相互作用を解明し、抗腫瘍免疫をさらに効率よく誘導する治療戦略の開発に役立てる。

また、骨軟部肉腫に対するIFN遺伝子治療の臨床研究に附随して、免疫学的解析を行う。この免疫学的解析は、国立がん研究センターの免疫コアファシリティにおいて実施する予定であり、効果と安全性に関する汎用性のある評価技術の開発は、免疫療法の効果を期待できる症例を選抜して効率的に免疫療法の開発を進めるのに有用であり、本邦における免疫遺伝子治療の発展に寄与すると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

●論文発表

1. Narumi K, Udagawa T, Kobayashi A, Hara H, Kondoh A, Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Takeshita F, Ochiya T, Okada T, Yamagishi M, Yoshida T, Aoki K. In vivo interferon- γ gene transfer enhances antitumor immunity after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Gene Ther*, 19; 34-48, 2012
2. Udagawa T, Narumi K, Goto N, Aida K, Suzuki K, Makimoto A, Ochiya T, Yoshida T, Chikaraishi T, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplant

ation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma. *Hum. Gene Ther*, 23; 173-186, 2012

3. T. Yamazaki, K. Aoki, Y Heike, SW, Kim, T. Ochiya, T. Wakeda, RM. Hoffman, Y. Takaue, H. Nakagama and Y. Ikarashi. Real-time in vivo cellular imaging of graft-versus-host disease and its reaction to immunomodulatory reagents. *Immunol Lett.* 144; 33-40, 2012
4. Miura Y, Yamazaki S, Julia D, Brown E, Aoki K, Vivkers S, Yamamoto M. Infectivity-selective oncolytic adenovirus developed by screening of high diversity targeting ligand library in the format of adenovirus capsid. *Mol Ther.* in press.
5. Narumi K, Aoki K. Combination of immune gene therapy with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation against solid cancers. In: *Cellular and Genetic Practices for Translational Medicine* ed. by J-Y. Kwak and J-Y. Han. Research Signpost, Kerala, India 2011, p 227-246.

●学会発表

1. K. Aoki. Development of targeted virus therapy using the adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob (Symposium).第17回日本遺伝子治療学会学術集会. July 15-17, 2011
2. T Udagawa, K Narumi, T Ochiya, T Yoshida, K Aoki. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of type I interferon gene transfer for sarcoma.第17回日本遺伝子治療学会学術集会. July 15-17, 2011
3. T Udagawa, K Narumi, Y Ikarashi, S Ohnami, T Yoshida, K. Aoki. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses immunotolerant environm

ent in tumors and induces antitumor immunity. 第70回日本癌学会総会. Oct 3-5, 2011.

4. K. Aida, T. Udagawa, K. Narumi, K. Suzuki, N. Goto, Y. Ikarashi, S. Ohnami, T. Yoshida, K. Aoki. Inhibition of regulatory T cells enhances antitumor immunity induced by intratumoral IFN- γ gene transfer. 第70回日本癌学会総会. Oct 3-5, 2011.
5. Kazunori Aoki. Development of targeted virus therapy using the adenovirus library displaying random peptides on the fiber knob. MRCCMT International symposium. January 2011 (Busan)
6. K. Narumi, T. Udagawa, Y. Ikarashi, T. Ochiya, T. Yoshida and K. Aoki. In vivo delivery of interferon- γ gene enhances tumor immunity and suppresses immunotolerance after autologous hematopoietic stem cell transplantation. The American Society of Gene Therapy's 14th Annual Meeting. May 18- 21, 2011 (Seattle).

H. 知的財産権の出願・登録状況

●特許取得状況

1. Method of treating solid tumor (Patent No.: US 7,985,407 B2)

Date of Patent : Jul 26, 2011

Inventors : Kazunori Aoki, Teruhiko Yoshida

Assignee : National Cancer Center

がんの遺伝子・核酸医薬の開発

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にIL2遺伝子を封入して、悪性グリオーマのマウスモデルに投与すると、抗腫瘍免疫が増強された。マウス脳内接種グリオーマモデルにおいて、腫瘍を外科的に切除後、残存腫瘍にIL2遺伝子封入HVJ-Eの単回投与によって、60%のマウスが長期生存した。

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

マウス悪性グリオーマ細胞株RSV-MをC3H/HeN mouseの背部皮内に移植し、マウス由来のIL-2, IL-12, GM-CSF, IFN-βの発現プラスミドをそれぞれ封入したHVJ-Eを2日ごとに3回直接投与し、腫瘍増殖の抑制効果を比較した。IL-2遺伝子封入HVJ-EあるいはIL-2発現レトロウイルスベクターをマウスグリオーマの脳内接種モデルに単回投与し、マウスの生存率、免疫細胞の腫瘍への浸潤を検証した。マウスにRSV-M細胞を移植して腫瘍を形成させて切除し、残った腫瘍部位にIL-2遺伝子封入HVJ-Eを投与し、生存率を調べた。

（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

皮内腫瘍モデルでは、IL-2とIL-12遺伝子をそれぞれ封入したHVJ-Eが最も腫瘍抑制効果が強力で、IL-2封入HVJ-Eの方が腫瘍消失率が高かった（70% vs. 40%）。IL-2遺伝子封入HVJ-Eをマウスグリオーマの脳内接種モデルに単回投与し、IL-2遺伝子発現レトロウイルスと比較すると、HVJ-E投与群で、CD4⁺, CD8⁺のリンパ球の浸潤の有意な増強と、制御性T細胞の有意な抑制が認められ、有意な生存率の延長を認めた。切除後残存した腫瘍部位にIL-2

遺伝子封入HVJ-Eを単回投与すると60%のマウスが長期生存を示した。IL-2遺伝子を封入しないHVJ-Eでは35日で全例死亡した。

D. 考察

IL-2遺伝子は制御性T細胞の増殖も促進する欠点があるが、HVJ-Eに封入して用いることで、制御性T細胞の有意な抑制が見られ、これが抗腫瘍効果の増強の原因の1つであろうと推察される。

E. 結論

IL-2遺伝子封入HVJ-Eによる遺伝子治療は、悪性グリオーマの有効性の高い癌治療法となりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kiyohara, E., Tamai, K., Katayama, I., and Kaneda, Y.: The combination of chemotherapy with HVJ-E containing Rad51 siRNA elicited diverse anti-tumor effects and synergistically suppressed melanoma. Gene Therapy, in press.

2) Matsuda, M., Nimura, K., Shimbo, T., Hama saki, 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, 103, 19-31, 2011.

2. 学会発表

1) 金田安史：HVJ envelope vectorの抗腫瘍効果

の解明と高機能型ベクターの開発 第84回日本生
化学会大会 (シンポジウム) 平成23年9月24日 京
都

2) Yasufumi Kaneda : Multilateral anti-cancer
strategies using Sendai virus envelope vecto
r 2011 International Advanced Drug delivery
Symposium (Taiwan) 平成23年4月27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(miRNA)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。マイクロRNAが腫瘍バイオマーカーあるいは治療標的となる可能性は高く、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、miR-210 をモデルとして腫瘍細胞における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-1 α によって発現が誘導され、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。さらに miR-210 の強発現による細胞増殖抑制効果が確認され、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。また、細胞の表現型の変化に伴い特異的に変動する遺伝子を探索するため UT-7 細胞株の3種類の亜株を用いて mRNA マイクロアレイを行った。既存の miRNA マイクロアレイの結果と合わせてパスウェイ解析を行った結果、依存するサイトカインにより発現が変動する複数の遺伝子を抽出した

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 2 年)
 谷崎祐太 (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。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し、miRNAの発現異常は、がんを含む疾患で多く報告されている。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おり、がん治療の妨げとなっている。

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1: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することで、低酸素環境下における、がん細胞の特徴を捉え、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。

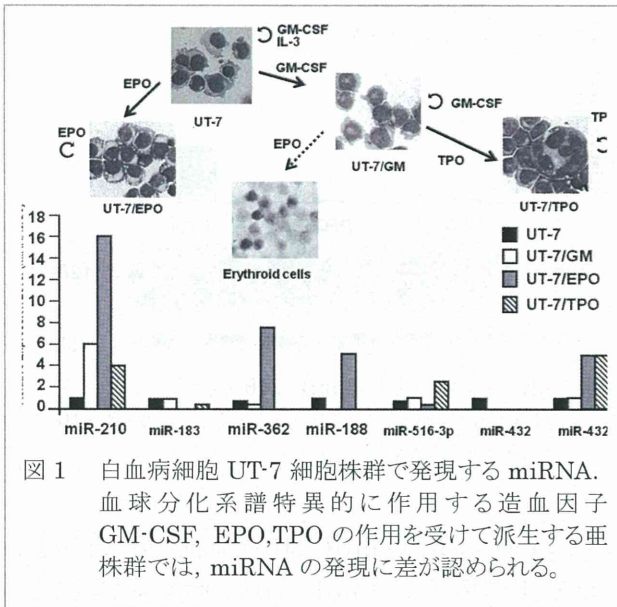


図1 白血病細胞 UT-7 細胞株群で発現する miRNA. 血球分化系譜特異的に作用する造血因子 GM-CSF, EPO, TPO の作用を受けて派生する亜株群では, miRNA の発現に差が認められる。

B. 研究方法

まず, 造血器腫瘍細胞株 UT-7 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。

さらに, 赤色蛍光蛋白質 dsRed 遺伝子の下流に miR-210 の相補鎖を組み込んだベクターを作製し, ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 に作製したベクターを導入し, 恒常的に dsRed を発現する細胞株を作製した。それら細胞株を 6 週齢のヌードマウスの乳腺に移植し, 腫瘍移植モデルマウスを作製した。移植後, 約 6 週間後に形成された腫瘍を摘出, ホルマリン固定後, 抗 HIF-1 α 抗体と抗 RFP 抗体を用いて免疫化学染色を行った(図2)。

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。

また, トランスフェリンを介した細胞内鉄代謝を確認するため, Alexa594 を標識したトランスフェリンを miR-210 強発現細胞株の培養上清に添加し, トランスフェリンの取り込みを観察した。さらに miR-210 強発現細胞株の細胞増殖を発色吸光度法により, 測定した。

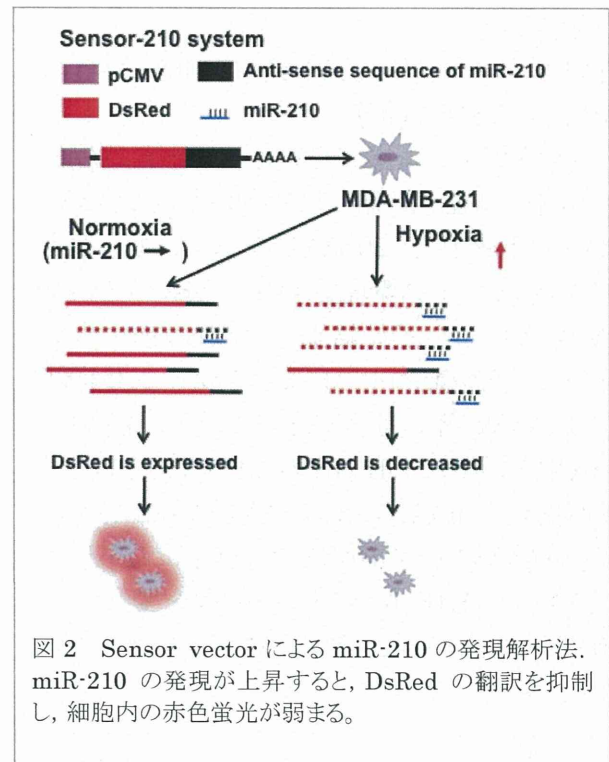


図2 Sensor vector による miR-210 の発現解析法. miR-210 の発現が上昇すると, DsRed の翻訳を抑制し, 細胞内の赤色蛍光が弱まる。

続いて細胞の表現型の変化に伴い特異的に変動する遺伝子を探索するため, UT-7 細胞株から派生した赤血球系巨核球系共通前駆細胞 (MEP) に相当する UT-7/GM, 赤血球系に分化した UT-7/EPO, 巨核球系に分化した UT-7/TPO をモデルとし, Affymetrix 社の Human Genome U133 Plus2.0 を使用して発現解析を行った。発現解析の結果は, MetaCore (Thomson Reuters) を用いて UT-7/GM を基準とした際, 1.5 倍以上変動した遺伝子を抽出し, miRNA のマイクロアレイの結果と合わせてパスウェイ解析を行った。(図3)さらに, UT-7/GM と比較して 1.5 倍以上の

変動を示した遺伝子群を調節する転写因子のリストを MetaCore の Transcriptional Analysis を用いて同定した。

Genomics	DNA	Single nucleotide polymorphism (SNP)array
	mRNA miRNA	Micro array
Proteomics	Protein	Protein array, LC/MS/MS

図3 細胞内分子の網羅的解析法の分類及び解析手法. mRNA及びmiRNAの網羅的解析はマイクロアレイにより解析できる。

(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 の発現解析】

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%酸素あるいは 1%低酸素の低酸素ストレス環境で培養し, 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4)。

MCF7細胞に, HIF-1α の siRNA を添加し, 48 時間後の miRNA-210 の発現量を調べたところ, 低酸素ストレス加環境では有意に低下した。したがって HIF-1α の転写制御を受けて, miRNA-210 の発現が誘導されることが明らかとなった(図5)。

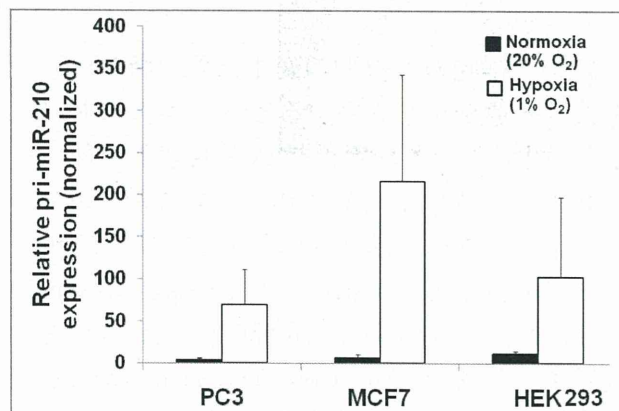
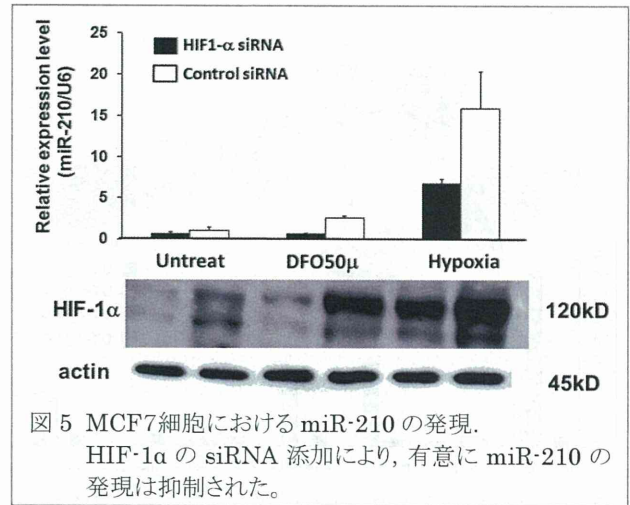
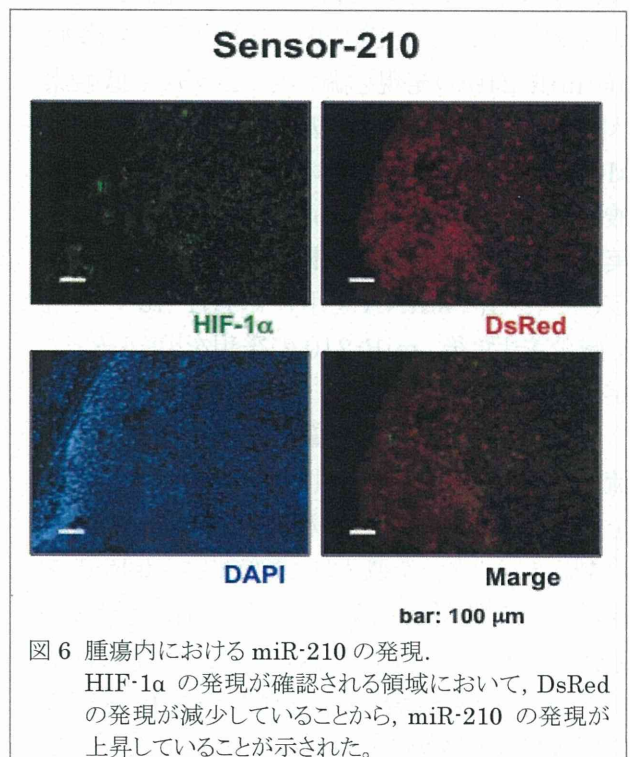


図4 固形腫瘍細胞における pri-miR-210 の発現. 1%低酸素下で 24 時間培養後, pri-miR-210 の発現レベルをリアルタイム PCR 法で定量し比較した。



【移植腫瘍における miR-210 発現領域の解析】

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, さらに HIF-1α 結合領域をすでに明らかにしているが, 腫瘍内における miR-210 の発現領域も腫瘍移植モデルマウスを用いて明らかにした。腫瘍内においても, HIF-1α の発現が強い低酸素領域において miR-210 の発現が認められた(図6)。



【miR-210 の標的遺伝子の同定】

Target Scan により, 複数の miR-210 の標的遺伝子候補を検索した。これらのうち, 腫瘍病態

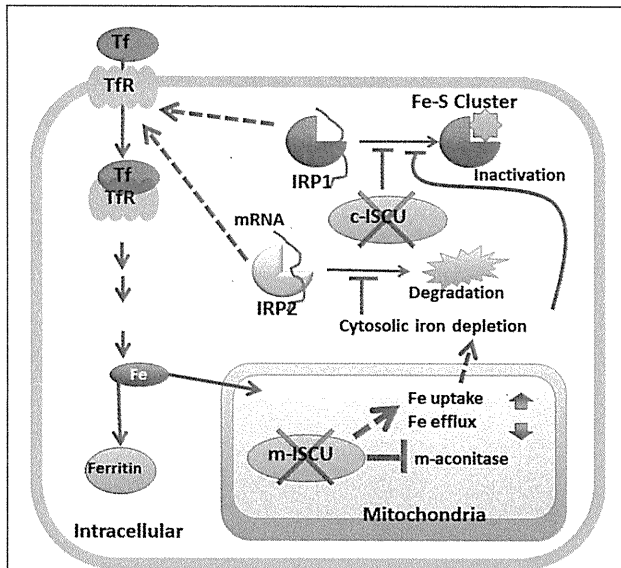


図7 ISCU-Tfによる鉄代謝の恒常性.
Wing-Hang Tong and Tracey A. Rouault.
Cell Metabolism (2006)

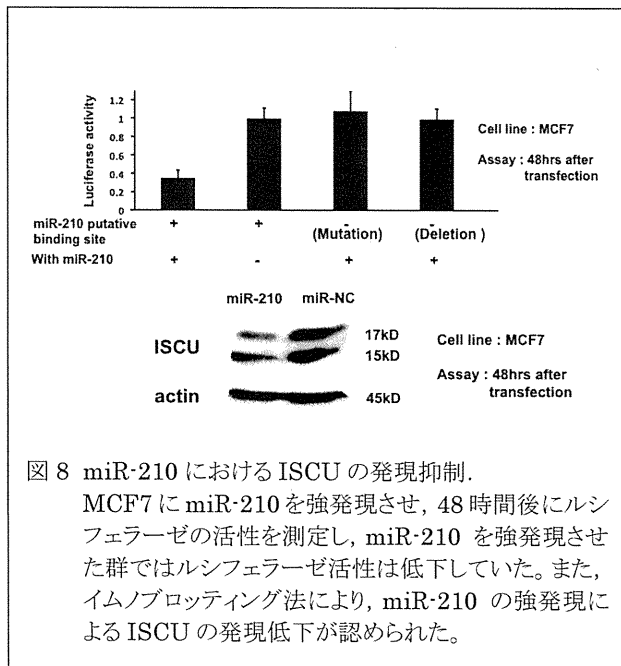


図8 miR-210 における ISCU の発現抑制。
MCF7 に miR-210 を強発現させ、48 時間後にルシフェラーゼの活性を測定し、miR-210 を強発現させた群ではルシフェラーゼ活性は低下していた。また、イムノブロットング法により、miR-210 の強発現による ISCU の発現低下が認められた。

に關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) に注目した。MCF7 細胞において miR-210 強制発現細胞では有意に ISCU の発現低下を認め、その発現低下は miR-210 が ISCU の 3'UTR に結合し、翻訳を抑制した結果であった (図8)。また、ISCU の発現抑制は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1 (TfR1) の発現上昇を誘導することが報告されているため、miR-210 の発現とこれら遺伝子発現の連鎖を解析した。この結果、miR-210 強制発

現細胞では有意に ISCU のみならず TfR1 の発現も低下した (図9)。すでに報告されている結果とは異なり、ISCU の発現低下による TfR1 の発現上昇が見られなかったため、miR-210 による TfR1 の発現低下が示唆された。詳細な解析結果より、miR-210 は ISCU 同様に TfR1 の 3'UTR に結合し発現抑制を行っていることが明らかになった (図9)。

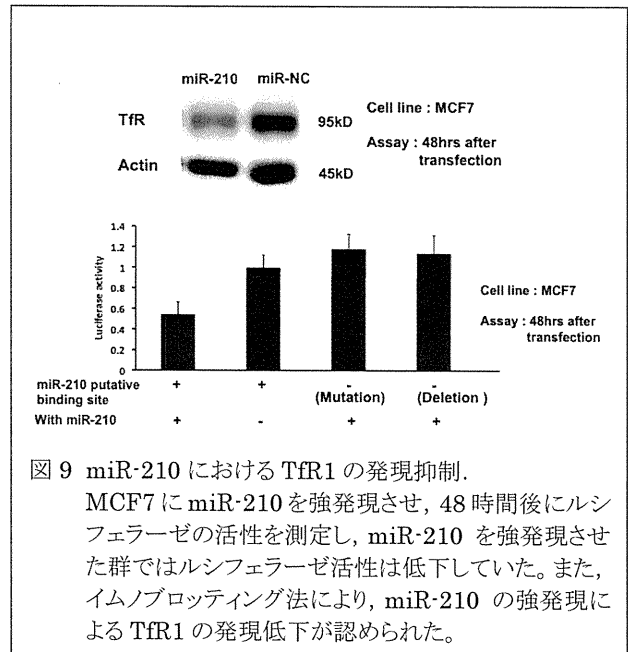


図9 miR-210 における TfR1 の発現抑制。
MCF7 に miR-210 を強発現させ、48 時間後にルシフェラーゼの活性を測定し、miR-210 を強発現させた群ではルシフェラーゼ活性は低下していた。また、イムノブロットング法により、miR-210 の強発現による TfR1 の発現低下が認められた。

【miR-210 強発現細胞におけるトランスフェリン取り込みの観察】

miR-210 を強発現させた MCF7 においてトランスフェリンの取り込みを観察した。その結果、miR-210 を強発現させた MCF7 では、トランスフェリンの取り込みが阻害された。miR-210 過剰発現による TfR1 の発現抑制は、トランスフェリンの取り込みを阻害し、細胞の鉄代謝に影響を与えることが示唆された (図10)。

【miR-210 強発現細胞における細胞増殖の測定】

がん細胞の増殖には鉄が必須因子であるため、miR-210 強発現による、トランスフェリンの取り込み阻害は MCF7 の細胞増殖に影響を与えると考え、生細胞数を測定した。miR-210 強発現細胞群では、対象群と比較して、増殖速度は8割程度に低下した (図11)。

【サイトカイン依存的に発現する遺伝子群の抽出】

UT-7/GM、UT-7/EPO 及び UT-7/TPO のマイクロアレイの結果から UT-7/GM を基準として UT-7/EPO 及び UT-7/TPO において、1.5 倍以上の遺伝子変動が見られた群を抽出した。その結果、UT-7/EPO では 2320 種類、UT-7/TPO では 3728 種類の遺伝子が抽出された。その中でもサイトカインに依存するパスウェイに着目したところ、がんに関与するとの報告がある複数の mRNA、miRNA が抽出された(表 1)。

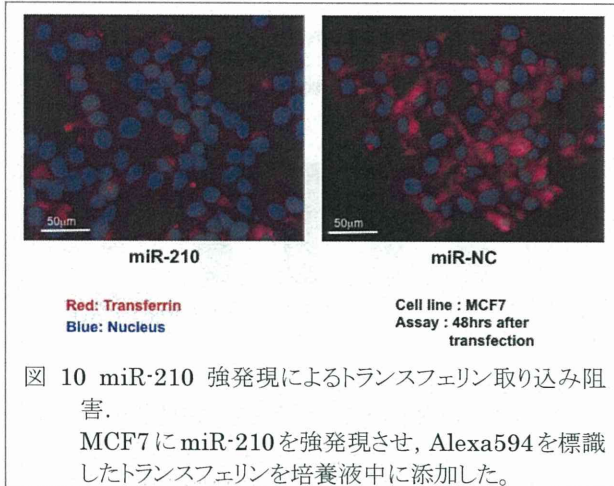


図 10 miR-210 強発現によるトランスフェリン取り込み阻害。
MCF7 に miR-210 を強発現させ、Alexa594 を標識したトランスフェリンを培養液中に添加した。

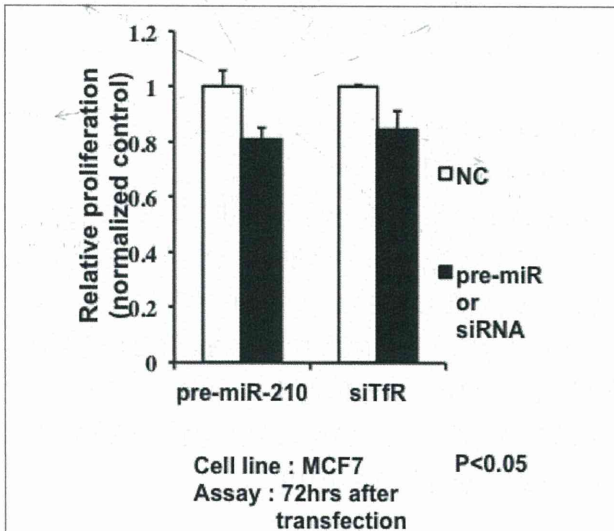


図 11 miR-210 における ISCU の発現抑制。
MCF7 に miR-210 を強発現し、72 時間後に生細胞数を測定した。同様に siRNA を用いて TfR1 の発現を抑制し、生細胞数を測定した。

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、miR-210 は鉄-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

ターの翻訳が抑制する。miR-210 の強発現はトランスフェリンの取り込みを阻害し、細胞増殖にも影響を与える。また、マイクロアレイを用いた網

UT-7/EPO		UT-7/TPO	
mRNA	miRNA	mRNA	miRNA
Elk-1	miR-210	C-Mpl	miR-144
Oncostatin M	miR-let-7i	Syk	miR-451
Plm-1	miR-217	HBD	miR-181a
p90RSK2	miR-let-7a-1	Lyn	miR-199b
Bcl-2	miR-186	PKC-ε	miR-223
TAP1	miR-365	SHPS-1	miR-320
Akt1	miR-let-7d	CyclinD1	miR-181d
SOS	miR-485-5p		miR-103
H-Ras	miR-127		miR-370
JNK2	miR-let-7b		miR-107
GATA-1	miR-98		miR-452
CREB1	miR-449a		miR-15a
GRB2	miR-130b		miR-335
CISH	miR-130a		
JAK-2	miR-18a		
PIAS3	miR-212		
TRCP3	miR-let-7c		
BAD	miR-489		
HBG1			
HBGA			
HBZ			
PKD			

図 12 血球分化系譜特異的に発現変動する遺伝子群。固系腫瘍において、発現変動することが報告されている遺伝子群も抽出された。

羅的遺伝子発現解析の結果、サイトカインに依存するパスウェイに複数の転写因子の変動がみられ、それらは、がん悪性化やがん細胞に特異的に転写因子であった。

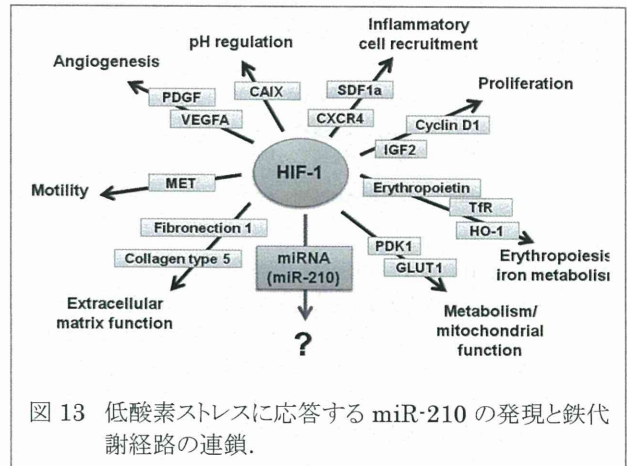
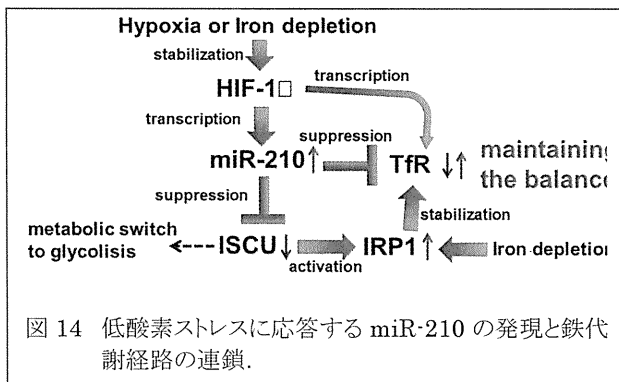


図 13 低酸素ストレスに応答する miR-210 の発現と鉄代謝経路の連鎖。

D. 考察

転写因子 HIF-1α による転写制御は低酸素ストレスによ細胞の腫瘍病態などに深く関与する(図 13)。この経路の中で、本研究は新たに、HIF-1α 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 14)。



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。さらに、miR-210の強発現はトランスフェリンの取り込みを阻害し、細胞増殖を抑制することから、治療薬としての可能性も見出せた。実際に鉄キレート剤は臨床において使用され、肝がんにおいて腫瘍の縮小が認められており、鉄代謝を標的とした、がん治療も注目されている。また、従来、造血器腫瘍と固形腫瘍は、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ルな解析が比較的容易である造血器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、今後の展開においても積極的に取り入れたい。今回得られた UT-7 亜株間のマイクロアレイ解析データは肺癌、神経系のがんなどで報告がある、Erythropoietin Receptor (EPOR)を介した細胞増殖の活性化に関与する遺伝子群の候補を挙げることに利用できた。今回の解析で抽出された UT-7/EPO 特異的変動を示した遺伝子と関連する報告は限られている。今後は今回得られた解析結果を基に UT-7/EPO に特異的に発現変動を示す遺伝子群が固形癌に適応できるものか、明らかにしてい

きたい。

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 TFR1 の発現を制御し、細胞増殖を抑制することから、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(投稿後改訂中)

2. 学会発表

- 1) Yusuke Yoshioka, Nobuyoshi Kosaka, Takashi Kato, Takahiro Ochiya. miR-210 Maintains Iron Homeostasis in Cancer Cells by Down-Regulating ISCU and TFR: RNAi&miRNA Europe 2011 Munich, Germany 8-9 September 2011. Poster Award Winner.
- 2) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広. microRNA-210 による鉄代謝制御と腫瘍内における役割. 第3回日本 RNAi 研究会, 口演, グランドプリンスホテル広島, 2011年8月26~27日
- 3) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広. miRNA-210 による新たな鉄代謝制御機構. 第84回日本生化学会, ポスター, 京都国際会館, 2011年9月21~24日
- 4) 吉岡祐亮, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広. miR-210 is an iron sensor and contributes to maintenance of iron homeostasis in breast cancer cells.(がん細胞における miR-210 による新たな鉄代謝制御機構). 第70回日本癌学会学術総会, 口演, 名古屋国際会議場, 2011年10月3~5日
- 5) 谷崎祐太, 吉岡祐亮, 永澤和道, 小坂展慶, 小松則夫, 落谷孝広, 加藤尚志. ヒト白血病細胞株における網羅的遺伝子発現プロファイリング. (Global Gene Expression Profiling of

Human Leukemia Cell Lines.)第73回日本
血液学会学術集会, 一般口演 OS-1-179, セッ
ション「AML:標的遺伝子」, 名古屋国際会議場
431+432 (3F), 2011年10月14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