

201313006A

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

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

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 石井 源一郎
平成26年(2014年)5月

目 次

I. 総括研究報告

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

石井 源一郎

----- 1

II. 分担研究報告

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：ADAM28
の遺伝子発現とヒト型抗 ADAM28 抗体の開発とがん細胞増殖・転移抑制に関する研究

岡田 保典

----- 9

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に関する研究

坂元 亨宇

----- 13

3. がんの発生と進展における TGF- β 関連分子の作用に関する研究

加藤 光保

----- 17

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

----- 23

5. がん間質の免疫微小環境に関する研究

平岡 伸介

----- 27

6. がん間質相互作用における糖鎖認識分子とがん細胞グリコームの役割の解明と
臨床応用に関する研究

神奈木 玲児

----- 31

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 35

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

石井 源一郎

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略事業）
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

研究代表者：石井 源一郎 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
臨床腫瘍病理分野 ユニット長

研究要旨

本研究は、動物モデル・試験管内モデル、ならびに対応するヒト病理組織検体を用いて、ヒトがんの病態に関わる新しい分子基盤を明らかにするとともに、診断・治療法開発のための基盤を作製することを目的として遂行された。本年度は、がん組織を構成する非がん細胞の生物学的意義、特に CD204(+)マクロファージが、がん転移に及ぼす生物機構を解析した。CD204(+)マクロファージは、病理病期が進行した肺腺癌において多数浸潤していた。また、癌組織より流出する血液内（肺静脈内）CD204(+)マクロファージ数は、独立した再発予測因子となった。さらには、CD204(+)マクロファージは動物モデルにおいて、肺腺癌細胞の転移を促進した。以上の結果より、がん細胞の転移形成には、非がん細胞である CD204(+)マクロファージの関与も重要であることが示された。

A 研究目的

がんの転移過程は 1) 原発巣からの離脱, 2) 脈管内を移動, 3) 標的臓器にて転移巣を形成、の過程を経て進行する。肺腺癌病理検体を用いた検討から、原発巣内の脈管内の癌細胞の周囲にはしばしば非癌細胞（リンパ球・単球・マクロファージ）を認めており(Cancer Sci. 2012)、これら非癌細胞は癌細胞と共に、脈管にて特殊ながん微小環境を形成している可能性が示唆された。M2 マクロファージの代表である CD204(+)マクロファージは、腫瘍促進的に働くことが報告されている。また、様々な癌腫において、CD204(+)マクロファージ浸潤数と悪性度との相関が示されてきた。以上の知見を踏まえ、腫瘍より流出する血液内の CD204(+)マクロファージは、がん細胞の転移形成に寄与するのではないかという仮説を立て研究を遂行した。

B 研究方法

1) がん組織より流出する血液内に存在する

CD204(+)マクロファージ数の測定：ヒト肺腺癌切除検体(n=106)に付着している肺静脈より血液を 5-10ml 採取し、単核球を分離した。抗 CD14 および抗 CD204 抗体を用いて、1ml 中の CD204(+)マクロファージ数を症例ごとに測定した。

2) がん細胞との相互作用により、CD204(-)マクロファージは CD204(+)マクロファージ数へ変換されるかの検討：肺腺癌細胞株 PC-9, A549 の培養上清を用いて、CD204(-)マクロファージを培養し、経時的に CD204(+)陽性細胞の割合を検討した。陰性コントロールとして、線維芽細胞の培養上清を用いた。

3) CD204(+)マクロファージ数が、肺腺癌細胞の肺転移へ及ぼす影響の検討；

免疫不全マウスの尾静脈より、肺腺癌細胞株 A549 と CD204(+)マクロファージあるいは CD204(-)マクロファージを注入し、肺転移数を比較検討した。

4) CD204(+)マクロファージと CD204(-)マクロフ

アージの遺伝子プロファイルの比較; cDNA マイクロアレイを用いて、CD204(+)マクロファージと CD204(-)マクロファージの遺伝子プロファイルの比較検討を行った。発現値に3倍以上の差を認めたものを、有意な遺伝子発現と判断した。

5) MMPs inhibitor による、転移の抑制実験:

MMP inhibitor である SB-3CT

((4-phenoxyphenylsulfonyl)methylthiirane)を同時投与することにより、CD204(+)マクロファージによる転移促進がキャンセルされるかどうかを、上記動物実験モデルを用いて検討した。

6) CD204(+)マクロファージによる、癌細胞の浸潤亢進機構の解明:

Matrigel をコートした chamber を用いて、invasion assay を施行した。上層には A549+CD204(+)マクロファージ、A549+CD204(-)マクロファージを、下層には血清を含んだ培地を配置し、22 時間後 filter 下面に浸潤した A549 数をカウントした。

7) 倫理面への配慮

平成15年厚生労働省告示第255号「臨床研究に関する倫理指針」ならびに平成19年8月16日改正文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い、倫理面に十分配慮して研究をすすめた。手術材料の残余の組織などの研究利用につき、文書で包括的または個別の同意を得た。ヒト組織を用いる研究においては所属施設の倫理委員会の承認を得た後に行い、動物実験は、動物愛護管理法(環境省)、厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針(厚生労働省)、カルタヘナ法(文部科学省)等の法令、指針に基づく動物実験に関する指針に則って実施した。

C 研究結果

1) がん組織より流出する血液内に存在する

CD204(+)マクロファージ数と臨床病理: 106 症例において、肺静脈中の CD14 かつ CD204 陽性マクロファージ数は平均 14500/1ml であった。肺静脈中の CD14 かつ CD204 陽性マクロファージ数が多い症例(中央値より大きい)では、術後2年以内の再発頻度が有意に高かった($p < 0.01$)。また、原発巣における CD204(+)マクロファージ数と肺

静脈血中の CD204(+)マクロファージ数は正の相関を示した。

2) がん細胞との相互作用により、CD204(-)マクロファージは CD204(+)マクロファージ数へ変換されるかの検討: 肺腺癌細胞株 PC-9, A549 の培養上清により、CD204(+)陽性細胞の割合が増加した。一方線維芽細胞の培養上清は、CD204(+)陽性細胞の割合に変化を与えなかった。

3) CD204(+)マクロファージ数が、癌細胞株転移へ及ぼす影響:

A549+CD204(+)マクロファージの同時投与群は、A549+CD204(-)マクロファージの同時投与群と比較して、30 日後の肺転移数が有意に増加していた。肺転移巣には、CD204(+)細胞が多数浸潤していた。

4) CD204(+)マクロファージと CD204(-)マクロファージの遺伝子プロファイルの比較: CD204(+)マクロファージにおいては、各種 MMPs およびケモカインの発現が有意に増加していた。特に MMP7, MMP9 は、100 倍以上の高値を示した。

5) MMP inhibitor による、腫瘍転移の抑制実験:

上記の cDNA マイクロアレイの結果を考慮し、CD204(+)マクロファージ由来の MMPs が転移促進に寄与すると考えた。MMPs inhibitor である SB-3CT を同時投与することにより、CD204(+)マクロファージによる転移促進がキャンセルされた。

6) CD204(+)マクロファージによる、癌細胞の浸潤亢進機構の解明:

A549+CD204(+)マクロファージ群において、filter 下面に浸潤した A549 は有意に多かった。

D 考察

CD204+マクロファージは、各種炎症性サイトカイン、MMP, angiogenic factor などの発現を介して、腫瘍進展に寄与することが報告されてきた。実際、我々も、原発巣において CD204+が多く浸潤している症例では、有意に予後が不良であることを肺癌症例を用いて報告してきた。しかし、CD204(+)マクロファージのがん進展促進機構は、主に原発巣の微小環境において検討されており、転移への関与は報告されていなかった。本研究の着想は、CD204(+)マクロファージは、腫瘍細胞とともに、原発巣の血管内にも多数浸潤して

いるという特徴的な病理像に基づくものである。上記現象は CD204(+)マクロファージが、腫瘍から流出する血流内にも流れ出ている可能性を示唆していた。

肺切除検体の肺静脈より血液を採取し、単位体積当たりの CD204 数を検討した結果、high group では、有意に早期再発(2年以内)を起こしていることが確認された。上記現象の生物機構を解明するため、動物モデルにおいて CD204+マクロファージと癌細胞をマウス尾静脈より注射し、肺転移巣を検討した結果、他の群よりも優位に肺転移巣を形成した。cDNA マイクロアレイによる検討では、CD204(+)マクロファージは、CD204(-)マクロファージと比べ、MMPs の発現が高いことが判明した。このことは、以前の報告と同様であり、本研究で用いた CD204(+)マクロファージが特殊な細胞でないことが示された。MMPs inhibitor を用いたところ、肺転移巣は有意に抑制された。また、in vitro における matrigel invasion assay を用いることにより、癌細胞の基底膜浸潤は、CD204(+)マクロファージにより促進されることを見出した。以上の結果は、がん細胞が血管外へ浸潤する過程(extravasation)において、CD204(+)マクロファージがその MMPs 活性を介して、がん細胞の血管基底膜浸潤を促進し、転移形成に寄与している可能性を示している。すなわち、MMP inhibitor は、CD204+マクロファージが多く流れている症例においては、転移抑制に寄与するものと思われた。

E 結論

CD204(+)マクロファージは、MMPs の活性を介してがん細胞の転移を促進することが示された。以上の結果より、循環血液中の CD204(+)マクロファージの MMPs 活性を標的とする戦略は、がん細胞転移抑制の新しい治療基盤となすものと思われた。

F 研究発表

論文発表

1. Kaseda, K, Ishii G, Aokage, K; Takahashi, A; Kuwata, T; Hishida, T; Yoshida, J; Kohno, M; Nagai, K; Ochiai, A. Identification of intravascular tumor microenvironment features predicting the

recurrence of p-stage I lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2013 Sep;104(9):1262-9.

2. Kinoshita T, Ishii G, Hiraoka N, Hirayama S, Yamauchi C, Aokage K, Hishida T, Yoshida J, Nagai K, Ochiai A. Foxp3+ regulatory T cells coexisting with cancer associated fibroblast are correlated with a poor outcome in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2013 Apr;104(4):409-15.
3. Ono S, Ishii G, Nagai K, Takuwa T, Yoshida J, Nishimura M, Hishida T, Aokage K, Fujii S, Ikeda N, Ochiai A. Podoplanin-positive cancer associated fibroblast could have prognostic value independent of cancer cell phenotype in stage I lung squamous cell carcinoma: Utility of combining analysis of both cancer cell phenotype and cancer associated fibroblast phenotype. *Chest* 2013, Apr;143(4):963-70.
4. Ichinokawa H, Ishii G, Nagai K, Kawase A, Yoshida J, Nishimura M, Hishida T, Ogasawara N, Tsuchihara K, Ochiai A. Distinct clinicopathologic characteristics of lung mucinous adenocarcinoma with KRAS mutation. *Human Pathol.* 2013 Dec;44(12):2636-42.
5. An J, Enomoto A, Weng L, Kato T, Iwakoshi A, Ushida K, Maeda K, Ishida-Takagishi M, Ishii G, Ming S, Sun T, Takahashi M. Significance of cancer-associated fibroblasts in the regulation of gene expression in the leading cells of invasive lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013, Mar;139(3):379-88
6. Ishii G, Hashimoto H, Astumi N, Hoshino A, Ochiai A. Morphophenotype of floating colonies derived from a single cancer cell has a critical impact on tumor-forming activity. *Pathol. Int* 2013 Jan;63(1):29-36
7. Shiozawa T, Ishii G, Goto K, Nagai K, Mimaki S, Ono S, Niho S, Fujii S, Ohe Y, Tsuchihara K, Ochiai A. Clinicopathological characteristics of EGFR mutated adenosquamous carcinoma of the lung. *Pathol. Int* 2013, Feb;63(2):77-84

8. Nishijima N, Ishii G, Nagai K, Atsumi N, Aokage K, Tokunaga Y, Ichinokawa H, Ohe Y, Ochiai A. Cancer-initiating cell marker-positive cells generate metastatic tumors that recapitulate the histology of the primary tumors. *Pathol. Int* 2013, Feb;63(2):94-101.
9. Takahashi A, Ishii G, Kinoshita T, Yoshida T, Umemura S, Hishida T, Yoh K, Niho S, Goto K, Ohmatsu H, Ohe Y, Nagai K, Ochiai A. Identification of prognostic immunophenotypic features in cancer stromal cells of high-grade neuroendocrine carcinomas of the lung. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Nov;139(11):1869-78.
10. Yoshida T, Ishii G, Goto K, Yoh K, Niho S, Umemura S, Matsumoto S, Ohmatsu H, Nagai K, Ohe Y, Ochiai A. Solid Predominant Histology Predicts EGFR tyrosine-kinase inhibitor response in patients with EGFR Mutation-positive lung adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Oct;139(10):1691-700.
11. Kirita K, Ishii G, Matsuwaki R, Matsumura Y, Umemura S, Matsumoto S, Yoh K; Niho S, Goto K, Ohmatsu H, Ohe Y, Nagai K, Ochiai A. Identification of biological properties of intralymphatic tumor related. *PLoS One*, 2013 Dec 23;8(12):e83537
12. Zenke T, Ishii G, Ohe Y, Kaseda K, Yoshida T, Matsumoto S, Umemura S, Yoh K, Niho S, Goto K, Ohmatsu H, Kuwata T, Nagai K, Ochiai A. Aldehyde dehydrogenase 1 expression in cancer cells could have prognostic value for patients with non-small cell lung cancer who are treated with neoadjuvant therapy: identification of prognostic microenvironmental factors after chemoradiation. *Pathol.Int*. 2013. Dec;63(12):599-606
13. Maeda R, Ishii G, Neri S, Aoyagi K, Haga H, Sasaki H, Nagai K, Ochiai A. Circulating CD14+CD204+ cells as a possible therapeutic target to prevent postoperative recurrence in non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol*. 2014 Feb;9(2):179-88.
14. Kojima M, Higuchi Y, Yokota M, Ishii G, Saito N, Aoyagi K, Sasaki H, Ochiai A. Human subperitoneal fibroblast and cancer cell interaction creates microenvironment that enhances tumor progression and metastasis. *PLoS One*. 2014 Feb 4;9(2):e88018
15. Matsuwaki R, Ishii G, Zenke Y, Neri S, Aokage K, Hishida T, Yoshida J, Fujii S, Kondo H, Goya T, Nagai K, Ochiai A. Immunophenotypic features of metastatic lymph node tumors to predict recurrence in N2 lung squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. in press.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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：**ADAM28** の遺伝子発現とヒト型抗 **ADAM28** 抗体の開発とがん細胞増殖・転移抑制に関する研究
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に関する研究
坂元 亨宇
3. がんの発生と進展における **TGF- β** 関連分子の作用に関する研究
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. がん間質相互作用における糖鎖認識分子とがん細胞グリコームの役割の解明と臨床応用に関する研究
神奈木 玲児

**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：
ADAM28 の遺伝子発現とヒト型抗 ADAM28 抗体の開発とがん細胞増殖・転移抑制**

分担研究者 岡田 保典 慶應義塾大学医学部病理学教室
研究協力者 望月 早月 慶應義塾大学医学部病理学教室

研究要旨

ADAM28 (a disintegrin and metalloproteinase 28) は、ヒト肺がんや乳がん細胞特異的に高発現し、がん細胞の増殖・転移に関わっている。本研究では、種々のがん遺伝子導入による形質転換細胞株とヒトがん細胞株での検討により、ADAM28 遺伝子発現には Src の活性化が重要であり、その下流の MEK/ERK と PI3K/mTOR の両経路が関与していることを明らかにした。また、ヒト型抗体ライブラリー (Human Combinatorial Antibody Library) をスクリーニングし、2種類の性質の異なるヒト型抗 ADAM28 抗体(211-14 と 211-12)を開発した。211-14 抗体は、分泌型 ADAM28 に特異的なアミノ酸配列を認識し、ADAM28 の insulin-like growth factor binding protein-3 分解活性を阻害するとともに、insulin-like growth factor-I 誘導性のがん細胞増殖を抑制した。また、乳がん細胞株の局所での増殖と自然転移を有意に抑制し、肺がん細胞株の肺転移も有意に抑制するとともに、生存率を著しく改善した。

A. 研究目的

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 遺伝子ファミリーは、MMP (matrix metalloproteinase) 近縁遺伝子ファミリーであり、両ファミリー分子はがん組織内微小環境因子代謝によりがん細胞の増殖・浸潤・転移に関わっている。MMP は細胞外マトリックス分解が主体であるのに対し、ADAM は増殖因子代謝、膜タンパク質のシェディング、細胞接着作用などを通して多彩な作用を発揮する。我々は、ヒト肺がんと乳がんにおいて ADAM28 ががん細胞特異的に高発現し、発現レベルとがん細胞の増殖・転移が正の相関を示すことを明らかにしてきた。また、がん細胞由来の ADAM28 は、insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) の分解により insulin-like growth factor-I (IGF-I) の活性を上げることで増殖促進に作用することを証明し、von Willebrand factor (VWF) 分解を通して VWF 誘導性がん細胞アポトーシスを抑制し、血管内での生存亢進により血行性転移を促進することを実証した。これら一連の実験的データから、ADAM 分子の中でも特に ADAM28 はヒトがん細胞増殖・転移に深く関わる分子として注目されている。しかし、ADAM28 のがん細胞における遺伝

子発現調節機構は不明であり、ADAM28 を標的とした分子特異的インヒビターもいまだ開発されていない。

本研究では、種々のがん遺伝子で形質転換した Madin-Darby canine kidney epithelial cells (MDCK) 細胞株とヒトがん細胞を用いて ADAM28 遺伝子発現に関わるがん遺伝子の同定とその下流の細胞内シグナル伝達機構を解析した。また、ヒト型抗体ライブラリー (Human Combinatorial Antibody Library: HuCAL) より ADAM28 に対する完全ヒト型特異抗体を開発し、ADAM28 を標的とする新規治療薬開発のための基礎研究を行った。

B. 研究方法

・がん遺伝子導入形質転換細胞株での ADAM28 発現解析：MDCK イヌ腎上皮細胞にがん遺伝子 (v-Src、LMP1、ErbB2、Ha-RAS、c-Fos) を導入した形質転換細胞株において、ADAM 分子の発現を RT-PCR 法で検討し、免疫ブロット法と免疫組織化学染色法により ADAM28 分子の発現を解析した。

・がん遺伝子形質転換細胞株の皮下移植における腫瘍形成能の検討：ヌードマウスに上記がん遺伝子形質転換細胞を移植し、腫瘍形成能を検討した。また、v-Src/MDCK 細胞では、移植後抗 ADAM28 マウスモノクローナル抗体(297-2F3)を投与し腫瘍形成抑制効果を検討した。

・ADAM28 発現に関わる細胞内シグナルの検討：がん遺伝子形質転換細胞株および ADAM28 発現・非発現ヒトがん細胞株を Src 阻害剤 (PP-2、Radicicol)、PI3 kinase 阻害剤 (LY294002)、MAP kinase 阻害剤 (PD98059、U0126 など)で処理し、ADAM28 発現に関わる細胞内シグナルを検討した。

・ヒトがん組織における ADAM28 と活性型 Src の発現検討：ヒト肺がん、乳がん、大腸がん組織について、免疫組織化学染色により ADAM28 とリン酸化 Src の発現について検討した。

・ヒト型抗 ADAM28 抗体のスクリーニング：潜在型 ADAM28 と活性型 ADAM28 を用いて、ヒト型抗体ライブラリー-HuCAL からこれら抗原と反応する抗体をスクリーニングした。

・ADAM28 に対する反応性と特異性の検討：潜在型 ADAM28、活性型 ADAM28、潜在型 ADAM28 産生 Sf9 培養上清を用いて上記スクリーニングで得られた 6 種類の候補抗体(211-02、211-06、211-12、211-14、211-26、213-09)について、免疫沈降法と IGFBP-3 分解活性抑制実験を行った。次いで、イムノブロット法で反応性を検討した。また、211-14 抗体の交差反応性を調べるため、ADAM9、10、12、17、ADAMTS1、4、5、MMP-1、2、3、7、9、13 を電気泳動し、イムノブロット法で検討した。

・211-14 抗体のエピトープ解析と親和性測定：ADAM28 の各ドメインからなるリコンビナントタンパク質、および分割ペプチドを合成し、211-14 抗体を用いたイムノブロット法によりエピトープを決定した。また、ADAM28 と 211-14 抗体の親和性は、Biacore を用いて解析した。

・ヒト型抗 ADAM28 抗体による ADAM28 活性阻害効果の検討：活性型 ADAM28 とヒト型抗 ADAM28 抗体(211-14 と 211-12)を種々のモル比でインキュベート後、IGFBP-3 の分解活性抑制効果をイムノブロット法により検出した。また、ADAM28 高発現乳がん細胞株と肺がん細胞株 (MDA-MB231 と PC-9)をヒト型抗 ADAM28 抗体で処理後、IGF-I 誘導性細胞増殖抑制効果について BrdU 細胞増殖 ELISA 法で検討した。

・腫瘍細胞増殖・自然転移モデルと肺転移モデルでの 211-14 抗体の作用効果：キメラ遺伝子 Venus-Luciferase を導入した乳がんと肺がん細胞株(MDA-MB231^{fluc-cp156} と PC-9^{fluc-cp156})を用いて、NOD/SCID マウス乳房皮下脂肪組織内移植による増殖・自然転移モデルと尾静脈内注入による肺転移モデルでの 211-14 抗体の作用を検討した。

・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。また、マウスを用いた動物実験は、動物実験委員会の承認を得て、動物実験等の実施に関する基本指針に従って動物愛護上の配慮を行って実施した。ヒトがん患者の組織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. v-Src 形質転換細胞での特異的な ADAM28 発現誘導：v-Src、LMP1、ErbB2、Ha-Ras、c-Fos で形質転換した MDCK イヌ腎上皮細胞株では、v-Src で形質転換した細胞株で特異的に ADAM28 の発現誘導が認められ、本細胞は細胞間接着のない浮遊細胞となった。

2. ADAM28 中和抗体による v-Src 形質転換細胞の腫瘍形成抑制：形質転換細胞株をヌードマウス皮下移植すると、v-Src 形質転換細胞株では最

も強い腫瘍形成があり、その腫瘍形成は抗 ADAM28 中和抗体(297-2F3)の局所投与で抑制された。

3. ADAM28 遺伝子発現における Src の活性化および下流の MEK/ERK と PI3K/mTOR の関与 : v-Src 形質転換細胞株では ADAM28 発現が上昇しており、Src kinase 阻害剤(radicol)でほぼ完全に発現抑制された。PI3 kinase 阻害剤(LY294002)あるいは MAP kinase 阻害剤(PD98059, U0126)では部分的に抑制され、両経路の阻害剤処理で完全消失した。ヒト乳がん、肺がん、卵巣がん、大腸がん細胞株においても ADAM28 発現と Src のリン酸化は正の相関を示し、ADAM28 高発現がん細胞株では、Src kinase、PI3 kinase および MAP kinase の阻害剤処理で発現抑制された。

4. ヒトがん組織における ADAM28 とリン酸化 Src の共発現 : ヒト肺がん、乳がん、大腸がんの免疫組織染色で ADAM28 とリン酸化 Src ががん細胞で共発現していた。

5. ヒト型 ADAM28 抗体の獲得 : フェージディスプレイ法を用いてヒト型抗体ライブラリー (HuCAL)から、抗原と反応する 6 種類のヒト型 ADAM28 候補抗体(211-02、211-06、211-12、211-14、211-26、213-09)が得られた。

6. 211-14 と 211-12 抗体の ADAM28 特異的反応 : 211-14 と 211-12 抗体は ADAM28 を免疫沈降し、IGFBP-3 分解活性抑制作用を有することから、ADAM28 に反応する抗体であることが示された。しかし、イムノブロット法では 211-14 抗体のみがリコンビナント ADAM28 を認識した。また、211-14 抗体は他の ADAM、ADAMTS、MMP とは交差反応しなかった。

7. 211-14 抗体のエピトープと ADAM28 への親和性: Epitope mapping 解析により、211-14 抗体は ADAM28 のシステインリッチドメインと分泌型特異的ドメインの連結部位にあることが明らかとなった。また、211-14 抗体と ADAM28 の親和性は、 $K_D=94.7$ pM であった。

8. ADAM28 活性阻害作用 : 211-14 と 211-12 抗体

は、ADAM28 による IGFBP-3 の分解を 1:1 のモル比で阻害し、両抗体とも ADAM28 高発現ヒト乳がんと肺がん細胞株の IGF-I 誘導性細胞増殖を抑制した。

9. 211-14 抗体の癌細胞増殖・転移抑制作用 : MDA-MB231^{fluc-cp156} 細胞のマウス乳房皮下脂肪組織移植による増殖・自然転移モデルでは、211-14 抗体処理により局所でのがん細胞増殖が有意に抑制された。また、導入したキメラ遺伝子を RT-PCR で検出することで各臓器への転移率を検討したところ、対照 IgG 投与群と比べて、211-14 抗体投与群の肺、心臓、肝臓、腎臓、脳への転移が抑制された。また、PC-9^{fluc-cp15} 肺がん細胞の肺転移は 211-14 抗体投与により有意に抑制され、マウスの生存率も著しく改善された。

D. 考察

がん遺伝子導入形質転換細胞とヒトがん細胞での解析から、ADAM28 遺伝子発現誘導に Src の活性化が関わることを本研究により初めて明らかとなった。また、Src の下流で MEK/ERK と PI3K/mTOR の両経路を経て ADAM28 の発現が上昇することを実証した。Src についてはこれまで多くの研究があり、種々のヒト疾患において潜在的な治療標的分子と考えられている。特に、乳がん、肺がん、大腸がんなどで Src は高発現しており、Src を標的とした阻害剤治療の開発が進められており、一部のがんで有効性が知られている。本研究での結果は、Src 阻害剤によるがん細胞増殖抑制作用の少なくとも一部は Src による ADAM28 発現抑制に基づく可能性が考えられる。

本年度の研究で得られたもう一つの成果は、性質の異なる 2 種類の完全ヒト型抗 ADAM28 特異抗体 (211-14 と 211-12)を開発できたことである。211-14 抗体は、分泌型 ADAM28 特異的抗体であり、ADAM28 酵素活性を阻害するのみならず、ヒト肺がんと乳がん細胞株の IGF-I 誘導性細胞増殖を抑制する中和抗体である。マウスでのがん細胞増殖・転移モデルにおいて、がん細胞増殖・転移の抑制効果と生存期間延長が示されたことから、本抗体は肺がんに対する治療薬剤となることが期待される。211-14 抗体は分泌型

ADAM28 に特異的であるが、同抗体を用いた免疫細胞染色では、ADAM28 は細胞膜上に局在す分泌型および膜型 ADAM28 の共通領域における 3 次構造を認識することが明らかとなっており、動物実験によるがん細胞の増殖・転移に対する作用解析が今後必要である。

E. 結論

がん細胞における ADAM28 の遺伝子発現には、Src の活性化と MEK/ERK および PI3K/mTOR の細胞シグナルが関わることを実証した。また、ADAM28 に対する 2 種類の完全ヒト型中和抗体を開発し、そのうち 1 抗体はマウスでの移植がん細胞の増殖・転移を有意に抑制することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mochizuki S. and Okada Y.: ADAM28. In: Handbook of Proteolytic Enzymes. Ed by Rawlings N.D. and Salvesen G.S. Elsevier Ltd, Oxford, UK. pp1136-1139, 2013.
- 2) Abe H., Mochizuki S., Ohara K., Ueno M., Ochiai H., Kitagawa Y., Hino O., Sato H. and Okada Y.: Src plays a role in ADAM28 expression in *v-src*-transformed epithelial cells and human carcinoma cells. Am J Pathol 183:1667-1678, 2013.
- 3) Mikami S., Oya M., Mizuno R., Kosaka T., Katsube K. I. and Okada Y.: Invasion and metastasis of renal cell carcinoma. Med Mol Morphol, 2014, in press.

2. 学会発表

- 1) 岡田保典:第 72 回日本癌学会総会。Promotion of cancer cell proliferation and metastasis by ADAM28 and possibility of ADAM28 target therapy. Symposium. 2013 年 10 月 3 日-5 日。
- 2) Satsuki Mochizuki, Hitoshi Abe, Masyuki Shimoda, Noriko Aramaki-Hattori, Yuka Miyamae, Akira Miyakoshi, Kanehisa Kojoh and Yasunori Okada: Selective inhibition of ADAM28 activity by human anti-ADAM28 antibodies suppresses cancer cell proliferation and metastasis. Pan Pacific Connective Tissue Society Symposium. November 24-27, 2013.

ることから、ADAM28 の細胞膜上でのアンカー機構があると推定された。一方、211-12 抗体は Hong Kong.

G. 知的財産権の出願・登録状況
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

病理材料・in vivo モデルを用いたがんの浸潤転移機構解明

研究分担者 坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部病理学教室 教授

研究要旨

膵がんにおける primary cilia の意義を解明するため、臨床検体を用いて、その有無と臨床病理学的特徴について検討した。蛍光二重染色により acetylated α -tubulin および γ -tubulin の共局在を認めることで primary cilia を検出したところ、全 100 例中 25 例の膵がん症例が陽性であった。Primary cilia 陽性症例では、陰性症例と比べ、有意にリンパ節転移が認められ、予後不良であった。Primary cilia は膵がんの悪性化に関連しており、新しい予後因子としての有用性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトのがん組織は、多段階発がん過程により、あるいはがん間質相互作用などの多様な細胞間相互作用により、多彩な発育進展様式を示す。そして、各臓器がんの病理学的特性は、臨床的特性と対応することが示されてきている。なかでも癌の浸潤転移は、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

パラフィン標本の免疫蛍光染色法が臨床検体を用いた primary cilia の評価に有効か否かを確認するため、まずは膵がん細胞株 PANC-1 および

CFPAC-1 のセルブロックを作製し、primary cilia 検出を試みた。その結果、Anti-acetylated α -tubulin の抗体で染色(FITC で検出)される棒状構造と、その基部に anti- γ -tubulin で染色(rhodamine で検出)される基底小体の共局在を認めることで、primary cilia を検出することが可能であると判断した。また、primary cilia を有する細胞の割合は、血清飢餓状態にさらすことにより増加することが示された。

次に、当院で手術された膵がんの症例 100 例に対し、上述の免疫蛍光染色法を用いて primary cilia を検出したところ、25 例の症例において、primary cilia をがん細胞に検出した。組織学的に検討したところ、primary cilia 陽性のがん細胞は、立方状から低円柱状の構造をもち、高分化な腺管部に見られることが多かった。一方、複雑な乳頭状構造を呈する部、粘液豊富な高円柱状がん細胞からなる部、篩状構造を呈する部、弧在性浸潤を呈する部では、primary cilia が認められなかった。また、間質の繊維芽細胞では、高率に primary cilia が認められた。

膵がんにおける primary cilia の意義を検討するため、primary cilia 検出の有無と臨床病理学的因子との間の相関解析(カイ 2 乗検定)を行った。3 視野内で少なくともひとつのがん細胞に primary cilia を検出した場合に primary cilia 陽性症例としたところ、陽性症例では、陰性症例に比べ有意にリンパ節転移が認められた($p = 0.016$)。予後との相関を検討したところ、単変量解析では、primary cilia 陽性と($p = 0.002$)、腫瘍径($p = 0.009$)、分化度($p = 0.001$)、リンパ節転移($p = 0.008$)が有意な因子であった。この 4 因子に断端の評価($p = 0.195$)を加えた 5 つの因子について多変量解析を行ったところ、primary cilia を有すること($p = 0.001$)と分化度($p < 0.001$)が独立した予後不良因子であることが示された。

D. 考察

Primary cilia は基底小体を基として伸長する細胞小器官である。その構造・機能は motile cilia と異なっており、近年、正常組織において発生、分化、平面極性、シグナル伝達に関わっていることが明らかとなってきた。現在、in vitro 研究を中心に様々な検討が行われているが、がんにおける primary cilia の役割はほとんど解明されていない。本研究では、膵がん臨床検体を用いた蛍光二重染

色において、primary cilia を、膵がん細胞で初めて検出した。primary cilia を有する膵がん細胞の割合は症例ごとに差があったが、3 視野内にひとつでも primary cilia を有するがん細胞を認めた場合を陽性症例としたところ、25%の膵がん症例が陽性であった。高分化な腺管を構成するがん細胞に primary cilia が検出される傾向があったが、primary cilia と腫瘍全体の分化度との相関は認められなかった。

一般的に、膵がんは、その腫瘍内に不均一な分化度をもつがん細胞が混在している。特に浸潤先進部では、間質内を単独で浸潤する分化度の低いがん細胞(弧在性浸潤細胞)が高頻度に見られ、そのような症例においては高率にリンパ節転移が確認される(平成 22 年度に報告)。また、平成 24 年度に報告した膵がんで高発現する SMAD3 に関しても、低分化ながん細胞の核内で検出され、高発現症例ではリンパ節転移が高頻度に見られた。弧在性浸潤細胞や SMAD3 高発現は、EMT に特徴的な現象(E-cadherin 発現低下や vimentin 発現上昇など)と関連しており、EMT を介したがん細胞の運動能亢進がリンパ節転移に寄与していると考えられる。一方、primary cilia は弧在性浸潤細胞からは検出されなかったが、リンパ節転移との相関が見られた。このことから、primary cilia は、EMT 関連分子とは異なる機構でリンパ節転移に関与していると考えられる。

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、primary cilia の膵がん悪性化への関与について検討し、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 (発表誌名・巻号・ページ・発行年)

Emoto K, Masugi Y, Yamazaki K, Effen di K, Tsujikawa H, Tanabe M, Kitagawa Y, Sakamoto M. Presence of primary cilia in cancer cells correlates with prog

nosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. Hum Pathol 45(4): 817–825, 2014.

Yamazaki K, Masugi Y, Effendi K, Tsujikawa H, Hiraoka N, Kitago M, Shinoda M, Itano O, Tanabe M, Kitagawa Y, Sakamoto M. Upregulated SMAD3 promotes epithelial–mesenchymal transition and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. Lab Invest (in press) 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし。

2. 実用新案登録
特になし。

3. その他
特になし。

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 筑波大学医学医療系 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し、診断や新規治療方法の開発に応用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、扁平上皮がんで発現が亢進している TSC22D4/THG-1、新たに乳がん細胞株で発現が亢進していることを見いだした MafK が、がんの発生に及ぼす作用を培養実験と免疫不全マウスへの移植実験で検討するとともに、その作用機序を分子レベルで解析した。本年度は、TMEPAI が肺腺癌細胞の腫瘍形成能に関与していることを報告し、TSC22D4/THG-1 も食道癌細胞と子宮頸癌細胞、MafK は、乳癌細胞で腫瘍形成に関与していることを明らかにした。また、MafK には上皮間葉転換誘導能があることを見いだすとともに、MafK による腫瘍形成を担う標的遺伝子として Gpnmb を同定した。

A. 研究目的

がんの発生と進展に関わる新規 TGF- β 関連分子として注目した TMEPAI、TSC22D4/THG-1、MafK の発がんにおける作用を明らかにし、新たな発がん促進機序の解明に基づく、新規診断方法と分子標的治療を開発することを研究目的とした。今年度は、特に肺腺癌細胞の腫瘍形成における TMEPAI の作用と我々が解明して、すでに論文発表を行っている TMEPAI の TGF- β /Smad シグナル抑制作用が腫瘍形成促進の主な機序なのかそれ以外の標的分子があるのかを検討することを目的とした。また、食道癌と子宮頸癌で、TSC22D4/THG-1 の腫瘍形成促進能を検討すると共に、TSC22D4/THG-1 結合タンパク質を同定し、その中から TSC22D4/THG-1 による腫瘍形成誘導活性に関与する標的分子の同定を試みた。MafK についても乳癌の腫瘍形成能への関与について動物実験で確認するとともに、その分子機構について解析することを目的とした。さらにこれらの分子群のがん幹細胞の分裂増殖動態に対する作用を解析するためのアッセイ方法の確立を目指した。

B. 研究方法

肺腺癌細胞 (Calu3, NCI-H23) ならびに口腔扁平上皮癌細胞 HSC4 において、TMEPAI をノックダウンして TGF- β に対する反応性の変化を確認能に関与する標的遺伝子を siRNA によるノック

するとともに、スフェア形成能と NOD-SCID マウス皮下移植実験での腫瘍形成能、尾静脈注射後の肺における腫瘍形成能を検討した。また、TMEPAI の既存の機能ドメインである Smad Interaction Motif (SIM) と PY モチーフの変異体を作成し、これらの変異体の腫瘍形成能を検討した。TSC22D4/THG-1 の腫瘍形成能についてはヒト角化細胞株 HaCaT に過剰発現させて検討するとともに、食道癌細胞株 TE13、子宮頸癌細胞株である 154, 234 細胞で TSC22D4/THG-1 のノックダウンを行って検討した。さらに TSC22D4/THG-1 に結合するタンパク質を産業総合研究所夏目徹博士との共同研究でスクリーニングし、その中から TSC22D4/THG-1 による腫瘍形成に関与する標的分子の同定を行った。

MafK の腫瘍形成能については、マウス乳癌細胞株 4T1 細胞でのノックダウンとともに乳腺上皮細胞株 NMuMG での過剰発現細胞 (NMuMG-MafK) を作製して確認した。また、NMuMG 細胞では、上皮間葉転換 (EMT) が誘導されていることが示唆されたため、E-cadherin、Occludin、N-cadherin、fibronectin などの EMT マーカー分子の発現を確認し、さらに E-cadherin の遺伝子発現に対する MafK の作用を検討した。また、NMuMG-MafK 細胞で発現レベルが変化した遺伝子を DNA マイクロアレイ解析で検討し、発現亢進が確認された分子の中から腫瘍形成ダウンのスフェア形成能に対する作用によって

スクリーニングし、同定された分子を NMuMG 細胞に発現させて、その機能を EMT 関連分子のウエスタンブロッティング、スフェア形成能、nude マウスにおける腫瘍形成能によって解析した。

上記の分子群のがん幹細胞における機能を解析する方法として、NMuMG-MafK 細胞をモデルとして用い、スフェア内の細胞増殖動態を、連続切片を Ki-67 抗体で染色して 3 次元再構築を行って解析した。また、スフェア培養時に 1-5 日間 BrdU を取り込ませて培養した後に BrdU 抗体による染色とその 3 次元再構築によって解析した。その際にみずほ情報総研の永田毅博士と共同で 3 次元再構築を行ったスフェア内の陽性核の数を自動カウントするソフトウェアの開発を行った。

(倫理面での配慮)

組替え 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

肺腺癌細胞 (Calu3, NCI-H23) ならびに口腔扁平上皮癌細胞 HSC4 において、TMEPAI をノックダウンすると TGF- β 刺激による Smad2 のリン酸化が有意に亢進することを確認した。また、スフェア形成能と NOD-SCID マウス皮下移植実験での腫瘍形成能、尾静脈注射後の肺における腫瘍形成能を検討し、TMEPAI のノックダウンによっていずれの細胞でもスフェア形成能と腫瘍形成能の著しい低下を確認した。さらに、TMEPAI の機能ドメインである Smad Interaction Motif (SIM) と PY モチーフの変異体を作成し、これらの変異体を内在性 TMEPAI をノックダウンさせた Calu3 細胞にドキシサイクリン投与に依存して誘導的発現が得られる細胞株を樹立した。現在、これらの細胞群の腫瘍形成能を確認するとともに、Smad のリン酸化以外の細胞内シグナル伝達分子に対する作用も解析し、がん化に重要な働きをもつことがすでに知られている分子のリン酸化に TMEPAI が関与していることを見いだした。現在、この分子のリン酸化の腫瘍形成における役割を解析するとともに、この経路の腫瘍形成能における意義についても検討している。一方、TMEPAI をノックダウンした HSC4 細胞では、変異 TMEPAI の安定な発現が得られなかったため、CRISPR/Cas9 システムを用いた HSC4-TMEPAI ノックアウト細胞の作製を開始

した。また、TMEPAI の一次配列と Public Data Base 中の種々の分子の機能ドメイン配列との同一性を詳細に検討したところ、TMEPAI にはこれまで知られていなかった機能ドメインもあることが示唆されたため、この配列にも変異を導入して、腫瘍形成における役割に関する検討を開始した。さらに、TMEPAI のファミリー分子である C17orf1 についても、機能解析を行い、TMEPAI と同様に TGF- β /Smad 経路の抑制活性があることを明らかにした。

TSC22D4/THG-1 をヒト角化細胞株 HaCaT に過剰発現すると表皮様の重層構造を形成する Air-liquid 界面培養において Ki-67 の発現が著しく亢進することを見いだした。しかし、この HaCaT-THG1 細胞自体には腫瘍形成能は認められなかった。そこで HaCaT-RasG12V 細胞を作製すると、この細胞には腫瘍形成能が確認されたため、RasG12V と TSC22D4/THG-1 の 2 重導入細胞を作製して検討したところ、HaCaT-RasG12V 細胞が形成する腫瘍に比べ 3-4 倍に腫瘍径が増大することが確認された。また、TSC22D4/THG-1 の腫瘍形成促進作用には、Ras/MAPK 経路によるリン酸化が重要であることが示唆されたため、このリン酸化部位を同定し、リン酸化を受けない変異体を作製したところ、HaCaT-RasG12V 細胞の腫瘍形成を抑制する活性があることを見いだした。次に、食道癌細胞株 TE13 で TSC22D4/THG-1 のノックダウンを行うと、通常の培養条件での増殖能も低下し、スフェア形成能、nude マウス皮下における腫瘍形成能も低下することが確認された。しかし、子宮頸癌細胞株である 154, 234 細胞では、増殖能の低下が著しく細胞株の維持培養が困難であったため、新たにドキシサイクリン依存的な誘導的ノックダウン細胞を作製して、この細胞でもスフェア形成能、腫瘍形成能が低下することを証明した。さらに TSC22D4/THG-1 に結合するタンパク質を TSC22D4/THG-1 の免疫沈降で共沈するタンパク質のマスマスペクトロメトリー解析で同定した。この中に TSC22D4/THG-1 による腫瘍形成に関与することが強く示唆された分子があったため、この分子との結合能を失った TSC22D4/THG-1 変異体を作成したところ、腫瘍形成能がほぼ消失したため、TSC22D4/THG-1 による腫瘍形成促進には、この分子との結合による機能抑制が関与していることを見いだした。この結果については現在論文投稿中である。

MafK の腫瘍形成能については、マウス乳癌細

胞株 4T1 細胞で恒常的に発現していた MafK をノックダウンすることで、スフェア形成能、C57BL/6 マウス皮下における腫瘍形成能ならびに皮下移植時の肺転移能が著しく低下することを確認した。さらに乳腺上皮細胞株 NMuMG 細胞での過剰発現細胞 (NMuMG-MafK) を作成したところ、スフェア形成能、腫瘍形成能のない NMuMG 細胞に高度の腫瘍形成能が誘導された。この際の病理組織学解析において、コントロールの NMuMG 細胞は管状構造をもつ過誤腫様の細胞集団を形成し、腫瘍性の増殖を示さなかったが、NMuMG-MafK 細胞は、未分化な充実性の細胞集団が形成され、Ki-67 染色で高い陽性細胞比率を示し、高度の浸潤性増殖を示すことが明らかとなった。この腫瘍で E-cadherin の染色を行ったところ、コントロールでは、E-cadherin 陽性であったのに対し、NMuMG-MafK 細胞では E-cadherin の発現が消失しており、MafK には脱分化を誘導する強い活性があることが示唆された。そこで、MafK には EMT を誘導する作用がある可能性を考え、E-cadherin、Occludin、N-cadherin、fibronectin などの EMT マーカー分子群の発現をウエスタンブロットティングと蛍光免疫染色で確認した。MafK は EMT 誘導能をもち、既存の EMT 誘導転写因子の発現には影響しなかったため、新規の EMT 誘導転写因子であることが示唆された。既知の EMT 誘導転写因子は、E-cadherin 遺伝子の転写制御領域に結合し、その発現を抑制することが知られているため、MafK についても検討したところ、MafK は直接発現制御領域に結合し、その転写を抑制することも明らかになった。さらに、NMuMG-MafK 細胞で発現レベルが変化した遺伝子を DNA マイクロアレイ解析で網羅的に検討した。発現亢進が RT-PCR 法によって確認された遺伝子の中に、現在乳癌の悪性化に関与することが示唆されている分子群があったため、これらの分子群の中から腫瘍形成能に関与する候補標的遺伝子を siRNA によってノックダウンし、スフェア形成能に対する作用を検討した。その結果、細胞膜糖タンパク質である Glycoprotein NMB (Gpnmb) をノックダウンすると NMuMG-MafK 細胞のスフェア形成能、nude マウスにおける腫瘍形成能が著しく低下することを見いだした。そこで、4T1 細胞で MafK をノックダウンすると Gpnmb の発現が低下したため、乳癌細胞においても MafK の恒常的発現に依存して Gpnmb の発現が亢進していたことが確認された。さらに、Gpnmb のノックダウ

ンによって 4T1 細胞のスフェア形成能、腫瘍形成能も有意に低下することが確認された。また、NMuMG-Gpnmb 細胞でも MafK と同様に EMT が誘導されていることが確認された。Gpnmb の細胞内ドメインにある hemITAM モチーフにあるチロシン残基は、このモチーフをもつ分子でシグナル伝達に必須であるため、これをフェニルアラニンに置換したところ、Gpnmb の腫瘍形成促進活性は完全に消失した。このことから、Src ファミリーによってリン酸化されることが示唆される本構造が Gpnmb による腫瘍形成能に必須の構造であることが明らかになった。また、Gpnmb の細胞外にある種々の既知ドメインの変異体の作製や Gpnmb の細胞外に特異的に結合する分子のスクリーニングを行って、この分子を標的とした新たな分子標的治療の開発に着手した。

MafK と Gpnmb は、通常の 2 次元培養下での細胞増殖を全く促進しないのに腫瘍形成能の著しい亢進を誘導する。このことは、MafK/Gpnmb が乳癌の幹細胞の動態に影響していることを示唆している。そこで、これらの分子群のがん幹細胞における機能を解析する方法として、NMuMG-MafK 細胞のスフェア形成実験をモデルとして用い、スフェアをパラフィン包埋してその連続切片を Ki-67 抗体で染色した後に 3 次元再構築を行い、スフェア内における増殖細胞をカウントする系を立ち上げるとともに、スフェア培養時に 1-5 日間 BrdU を取り込ませて培養した後の BrdU 抗体による染色とその 3 次元再構築によって、増殖細胞の動態を解析した。その結果、スフェア内では、早い増殖を示す細胞群と間欠的な増殖を示す細胞群が混在することが示された。現在、スフェア形成能をもつ細胞群がどちらに属しているかなど、がん幹細胞を同定し、その動態に対して MafK/Gpnmb が及ぼす作用を解析する研究を開始している。

D. 考察

TGF- β で発現が誘導される TMAPAI と MafK ならびに TGF- β の標的遺伝子である TSC22 のファミリー分子である TSC22D4/THG-1 が、腫瘍形成に深く関わっていることを証明し、その作用機序の一端を明らかにした。これらの分子群は、我々の研究によってがんの発生・進展に関与することが独自に発見されたもので、日本初の新たな分子標的治療の開発に応用されることが強く期待されるシーズである。MafK の標的遺伝子であることを見いだした Gpnmb は、すでに抗が

ん剤を結合させたモノクローナル抗体による第2相臨床試験が行われている分子であり、我々は、この分子を標的とした全く新しいGpnmB阻害薬の開発に着手している。GpnmBは細胞表面に発現する糖タンパク質であるとともに、がん幹細胞の増殖に関与することが示唆される分子であり、この分子を標的とした治療方法は、がんの再発の元となる幹細胞を標的とした治療方法として注目される。TMEPAI, TSC22D4/THG-1, MafKも、がん治療の有望な標的であり、今後の研究の発展が期待される。また、これらの分子群は種々のがん細胞で高度に発現が亢進する分子群であり、これらの分子群の発現解析が、がんの早期診断や予後判定に有効であることも期待される。我々は、これらの分子群に対するモノクローナル抗体や遺伝子改変マウスの作製を行っており、これらの研究シーズを臨床病理学的研究や診断法の開発に応用することも強く期待される。

E. 結論

発癌に関わる新規 TGF- β 関連分子として、TMEPAI, TSC22D4/THG-1, MafKならびにGpnmBを同定し、その作用機序の一端を明らかにした。今後、これらの分子群の検出や機能を制御する方法を開発することで、がんの新しい診断法・治療法・予防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, Maeyama K, Sakata N, Itoh F, Akatsu R, Nakata M, Katsu Y, Ikeno S, Togawa Y, Thanh Thao Vo Nguyen TT, Watanabe Y, **Kato M** and Itoh S. C18 ORF1: A Novel Negative Regulator of TGF- β Signaling. **J. Biol. Chem.** *in press*.

Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Shiba A, Noguchi M, Itoh S and **Kato M**. TMEPAI/PMEPA1 enhances tumorigenic activities in lung cancer cells. **Cancer Sci.** 105: 334-341, 2014.

Yoon JH, Jung SM, Park SH, **Kato M**, Yamashita T, Lee IK, Sudo K, Nakae S, Han JS, Kim OH, Oh BC, Sumida T, Kuroda M, Ju JH, Jung KC, Park SH, Kim DK, and Mamura M. Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin

degradation of Smad4, thereby derepressing Eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. **EMBO Mol. Med.** 5: 1720-1739, 2013.

Okita Y, Kamoshida A, Suzuki H, Itoh K, Motohashi H, Igarashi K, Yamamoto M, Ogami T, Koinuma D, and **Kato M**. Transforming Growth Factor- β induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the heme oxygenase-1 gene. **J. Biol. Chem.** 288: 20658-20667, 2013.

2. 学会発表

Kato M. Tumorigenic activities of TGF- β target genes; TMEPAI and MafK. (Oral) LICR TGF- β meeting in Uppsala 2013 (Uppsala, Sweden) 2013年5月30日～6月1日

Suzuki H. Roles of Tsc-22 family proteins in tumorigenesis. (Oral) LICR TGF- β meeting in Uppsala 2013 (Uppsala, Sweden) 2013年5月30日～6月1日

Okita Y. MafK promotes tumor formation and invasion/metastasis of breast cancer cells through induction of EMT. (Poster) LICR TGF- β meeting 2013 (Uppsala, Sweden) 2013年5月30日～6月1日

Vo Nguyen TT. Autocrine TGF- β induces TMEPAI and potentiates tumorigenic activity in lung cancer cell lines. (Poster) LICR TGF- β meeting in Uppsala 2013 (Uppsala, Sweden) 2013年5月30日～6月1日

Watanabe Y. Roles of PARP on BMP signaling. (Poster) LICR TGF- β meeting in Uppsala 2013 (Uppsala, Sweden) 2013年5月30日～6月1日

沖田結花里. 乳腺上皮細胞の上皮間葉転換と腫瘍形成における小 Maf 群転写因子の役割. (Poster) 第102回日本病理学会総会(札幌) 2013年6月6日～8日

加藤光保. がんの発生と進展における TMEPAI の作用. (Oral) 第102回日本病理学会総会(札幌) 2013年6月6日～8日

鈴木裕之. 細胞増殖、分化、がん化における Tsc-22 ファミリータンパク質の役割. (Poster) 第 32 回分子病理学研究会 (吉野) 2013 年 7 月 20 日～21 日

Kato M, Vo Nguyen TT, Watanabe Y. Tumorigenic activities of a TGF- β target gene TMEPAI in Lung Cancer Cells. (Poster) FASEB Science Research Conferences-The TGF-beta superfamily: signaling in development & diseases (Colorado, USA) 2013 年 7 月 28 日～8 月 2 日

鈴木裕之、加藤光保. 細胞増殖、分化、がん化における Tsc-22 ファミリー分子の役割. (Poster) 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3 日～5 日

渡邊幸秀、加藤光保、伊東進. TGF- β シグナル抑制分子 TEMPAI の癌の進展における役割. (Poster) 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3 日～5 日

沖田結花里、鈴木裕之、加藤光保. 乳がん細胞の上皮間葉転換と転移における MafK の役割. (Oral) 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3 日～5 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2012-140549

特開 2014-006100

画像システム、画像処理方法及び画像処理プログラム