

2013/3006B

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22年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 石井 源一郎

平成26年（2014年）5月

目 次

I. 総合研究報告

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
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	----- 7
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	----- 11
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
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
がん間質の免疫微小環境に関する研究 平岡 伸介	----- 27
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	----- 33
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 39

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略事業）
総合研究報告書

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。主にごん間質細胞の生物像に焦点を当て、研究期間内に以下の3項目の検討を行った。

- 1) Podoplanin 陽性がん関連線維芽細胞が、がん進展に及ぼす生物機構
- 2) がん幹細胞の腫瘍形成能に影響を及ぼす間質細胞の生物像
- 3) CD204(+)マクロファージが、がん転移に及ぼす生物機構

A 研究目的

1889年、Pagetが”seed and soil” theoryを提唱して以来、がんの生体内における増殖には、”seed (がん細胞)” および ”soil (間質細胞により構成されるがん組織微小環境)” 双方の生物学的性質が重要であることが示唆されてきた。がん細胞の周囲に動員されるがん間質細胞は、接着相互あるいは液性因子を介してがん細胞の生存増殖に影響を与えている。近年の報告では、がん間質細胞は、非がん部間質細胞とは異なる生物像を呈しており、この特異な生物像が、がんの進展に影響を与えている可能性が示唆されている。すなわち、がんの進展、転移過程には、間質細胞の生物像が深く関わっており、がんの悪性像の一部は、間質細胞の生物像により規定されている可能性があると考えられた。

本研究の目的は、ヒト病理組織検体を用いて、がん間質細胞が、がんの転移形成過程に及ぼす分子機構を解析し、診断・治療法開発のための基盤を作製することである。

B 研究方法

1) Podoplanin 陽性がん関連細胞が、がん進展に及ぼす生物機構：

a) ヒト肺腺癌および扁平上皮癌切除検体(n=304、n=142)を用いて、Podoplanin 発現陽性のがん関連

線維芽細胞が動員されている症例の臨床病歴学的検討を行った。

b) 肺腺癌細胞株 A549 細胞を用いて Podoplanin 陽性線維芽細胞の腫瘍形成能に関わる意義を動物モデルを用いて検討した。具体的には、A549+ Podoplanin 陽性線維芽細胞、A549+Podoplanin 陰性線維芽細胞をそれぞれ SICD マウス皮下に移植し、腫瘍生着率、腫瘍体積を継時的に測定した。

c) 細胞内ドメイン欠損 Podoplanin を遺伝子導入し、変異 Podoplanin 発現線維芽細胞を作製した。これら変異 Podoplanin 発現線維芽細胞が、腫瘍生着に与える影響を検討した。

2) がん幹細胞の腫瘍形成能に影響を及ぼす間質細胞の生物像：

a) 外科的に切除された肺腺癌症例(n=107)を用いて、リンパ管内腫瘍細胞の性状、特にがん幹細胞マーカー発現とリンパ節転移形成との関連を免疫組織学的に検討した。

b) 我々が確立した single cell derived colony assay 法を用い(*Pathol. Int.* 2013)、A549-ALDH1 活性陽性細胞、A549-ALDH1 活性陰性細胞の浮遊培養下におけるコロニー性状を検討した。

3) CD204(+)マクロファージが、がん転移に及ぼ

す生物機構；

- a) 肺癌切除検体に付着していた肺静脈より血液を採取し(n=106)、単位体積当たりの CD204(+)マクロファージ数を測定した
- b) 免疫不全マウスの尾静脈より、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。
- c) 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。

4) 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) Podoplanin陽性がん関連細胞が、がん進展に及ぼす生物機構；

- a) Podoplanin陽性がん関連線維芽細胞が動員されている症例では、有意に予後不良であった(腺癌および扁平上皮癌)。陽性例では、脈管浸潤、胸膜浸潤の頻度が有意に高かった。
- b) Podoplanin陽性線維芽細胞は、A549細胞の生着能を有意に亢進させた。さらにこれらの現象は、線維芽細胞のPodoplanin分子発現をノックダウンすることにより、キャンセルされた。
- c) 変異Podoplanin発現線維芽細胞は、Podoplanin発現線維芽細胞と比較して腫瘍の生着を有意に減少させた。以上の結果より、線維芽細胞に発現するPodoplanin分子の細胞内ドメインは、腫瘍生着亢進に関与している可能性が示唆された。

2) がん幹細胞の腫瘍形成能に影響を及ぼす間質細胞の生物像；

a) 1) リンパ管内腫瘍細胞が ALDH-1 陰性症例では、有意にリンパ節転移巣を有すること、2) リンパ管内腫瘍組織内に CD204(+) マクロファージが多く浸潤する症例では、有意にリンパ節転移巣を形成したこと、を見出した。

b) ALDH1 活性陰性細胞が形成する浮遊コロニーは、より大型のコロニーを形成する傾向を示した。以上より、ALDH1 活性陰性のリンパ管内腫瘍細胞は、転移形成能が高い“がん始原細胞”である可能性が示された。

3) CD204(+)マクロファージが、がん転移に及ぼす生物機構；

a) 肺静脈中の CD204(+)マクロファージ数 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。

b) CD204(+)マクロファージと A549 細胞をマウス尾静脈より注射した群では、他の群よりも有意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。

c) MMPs inhibitor を用いることにより、CD204(+)マクロファージにより促進された肺転移巣は有意に抑制された。

D 考察

Podoplanin 陽性がん関連細胞が、がん進展に及ぼす生物機構；

今回我々が施行した検討より、がん関連線維芽細胞、特に Podoplanin を発現している細胞は、腫瘍進展に促進的に働く間質細胞であることが判明した。分子機構の完全な解明には至っていないが、Podoplanin の細胞内ドメインが、腫瘍生着に重要であることを考慮すると、線維芽細胞における RhoA の活性が一因と推定された。また、Podoplanin (+)がん関連線維芽細胞が動員されている症例では、血管、胸膜浸潤頻度が高かったことは、これらの間質細胞ががん細胞の局所浸潤能に影響を与えている可能性を示唆している。現在、がん細胞と線維芽細胞の共培養系を新たに確立し、Podoplanin (+)がん関連線維芽細胞が、がん細胞の局所浸潤に及ぼす分子機構を検討中である。

b) がん幹細胞の腫瘍形成能に影響を及ぼす間質細胞の生物像；

今回の検討から、ALDH1 活性陰性の腫瘍細胞に

は、がん始原細胞が濃色されていることが推定された。臨床病理学的検討の結果から、CD204(+)マクロファージが、がん始原細胞(ALDH1 活性陰性の脈管内腫瘍細胞)の生物像に影響を及ぼす間質細胞である可能性が示唆された。この仮説は、下記 c)にて見出された結果を支持するものと思われた。

c) CD204(+)マクロファージが、がん転移に及ぼす生物機構；

今回の結果は、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、生着/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

がん間質細胞(Podoplanin 陽性がん関連線維芽細胞、CD204 陽性マクロファージ)は、がんの悪性像に寄与することが判明した。特に、がん細胞の局所浸潤あるいはがん細胞の生着/転移過程において、上記間質細胞の機能的な重要性が示された。さらに、これら間質細胞の機能阻害は、がん進展を抑制した。以上の結果より、がん間質細胞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. Kojima M, Ishii G, Atsumi N, Nishizawa Y, Saito N, Ochiai A. CD133 expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Cancer Sci* 2010 Apr;101(4):906-12.
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. Ishii G, Hashimoto H, Asada K, Ito T, Hoshino A, Fujii S, Kojima M, Kuwata T, 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.

4. Yamane, Ishii G, Goto K, Kojima M, Nakao M, Shimada Y, Nishiwaki Y, Nagai K, Kohroggi 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.
5. Shimada Y, Ishii G, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K. Extratumoral vascular invasion is a significant prognostic indicator and a predicting factor of distant metastasis in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010 Jul;5(7):970-5.
6. Ohtaki Y, Ishii G, Nagai K, Ashimine S, Kuwata T, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Takeyoshi J, Ochiai A. Stromal Macrophage Expressing CD204 Is Associated with Tumor Aggressiveness in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2010 Oct;5(10):1507-15.
7. 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 Sep;5(9):1361-8.
8. Aokage K, Ishii G, Yoshida J, Hishida T, Nishimura M, Nagai K, Ochiai A. Histological progression of small intrapulmonary metastatic tumor from primary lung adenocarcinoma. *Pathol. Int* 2010 Dec;60(12):765-73.
9. Hoshino A, Ishii G*, Ito T, Aoyagi K, Ohtaki Y, Nagai K, Sasaki H, Ochiai A. Podoplanin-positive fibroblasts enhance lung adenocarcinoma tumor. *Cancer Res.* 2011 Jul 15;71(14):4769-79.
10. 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.
11. Takahashi Y, Ishii G, Taira T, Fujii S, Yanagi S, Yoshida J, Nishimura M, Nomori H, Nagai K, Ochiai A. Fibrous stroma is associated with poorer prognosis in lung squamous cell carcinoma patients. *J Thorac Oncol.* 2011 Sep;6(9):1460-7.
 12. Maeda R, Ishii G, Yoshida J, Hishida T, Nishimura M, Nagai K. Influence of cigarette smoking on histologic subtypes of stage I lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011 Apr;6(4):743-50.
 13. Ichinokawa H, Ishii G, Nagai K, Yoshida J, Nishimura M, Hishida T, Suzuki K, Ochiai A. Clinicopathological characteristics of primary lung adenocarcinoma predominantly composed of goblet cells in surgically resected cases. *Pathol. Int.* 2011, Jul;61(7):423-9.
 14. Takuwa T, Ishii G, Nagai K, Yoshida J, Nishimura M, Hishida T, Neri S, Hasegawa S, Ochiai A. Characteristic immunophenotype of solid subtype component in lung adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2012,Nov;19(12):3943-52/
 15. Neri S, Ishii G, Taira T, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Ochiai A. Recruitment of podoplanin positive cancer-associated fibroblasts in metastatic lymph nodes predicts poor prognosis in pathological N2 Stage III lung adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2012,Nov;19(12):3953-62.
 16. Ito S, Ishii G, Hoshino A, Hashimoto H, Neri S, Kuwata T, Higashi M, Nagai K, Ochiai A. Tumor promoting effect of podoplanin-positive fibroblasts is mediated by enhanced RhoA activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, May 25;422(1):194-9.
 17. Makinoshima H, Ishii G, Kojima M, Fujii S, Higuchi Y, Kuwata T, Ochiai A. PTPRZ1 regulates calmodulin phosphorylation and tumor progression in small-cell lung carcinoma. *BMC Cancer* 2012 Nov 21;12:537.
 18. Matsumura Y, Ishii G, Aokage K, Kuwata T, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Ochiai A. Morphophenotypical characteristics of intralymphatic cancer and stromal cell susceptible to lymphogenic metastasis. *Cancer Sci.* 2012 Jul;103(7):1342-7.
 19. Itoh M, Ishii G, Nagai K, Maeda R, Nakano Y, Ochiai A. Prognostic significance of cancer associated stromal cells in stage I lung adenocarcinoma patients. *Chest* 2012, Jul;142(1):151-8.
 20. Maeda R, Ishii G, Ito M, Yoshida J, Hishida T, Nishimura M, Nagai K, Ochiai A. Number of circulating endothelial progenitor cells and intratumoral microvessel density in non-small cell lung cancer patients: differences in angiogenic status between adenocarcinoma histological subtypes. *J Thorac Oncol.* 2012 Mar;7(3):503-11.
 21. Hirayama S, Ishii G, Nagai K, Ono S, Kojima M, Yamauchi C, Aokage K, Hishida T, Yoshida J, Suzuki K, Ochiai A. Prognostic impact of CD204-positive macrophages in lung squamous cell carcinoma: possible contribution of CD204-positive macrophages to the tumor-promoting microenvironment. *J Thorac Oncol.* 2012 Dec;7(12):1790-7.
 22. Taira T, Ishii G, Nagai K, Yoh K, Takahashi Y, Matsumura Y, Kojima M, Ohmatsu H, Goto K, Niho S, Takashima H, Inoue H, Ohe Y, Ochiai A. Histopathological features of the tumor budding in squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2012 Jun;76(3):423-30.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
26. 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.
 27. 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
 28. [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
 29. 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
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. 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
 34. 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
 35. 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.
 36. 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
 37. 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. 特許
特にありません。

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

研究分担者：岡田 保典 慶應義塾大学医学部病理学教室

研究要旨

MMP (matrix metalloproteinase) と ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 遺伝子ファミリーはメタロプロテアーゼドメインを共有する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。本研究では、これらの分子に関する詳細な解析により、以下のような結果を得た。①血管内皮細胞で発現誘導された MMP-13 は、endostatin の形成によりメラノーマ細胞の肺転移を抑制した。②Snail は E-cadherin 発現抑制と MMP 発現亢進によりヒト腎細胞がんの悪性化に関わっていることが示された。③ADAM28 は connective tissue growth factor (CTGF) と von Willebrand factor (VWF) を分解し、VEGF₁₆₅ 誘導性血管新生と転移促進に働いていることを示した。④がん細胞での ADAM28 遺伝子発現には、Src の活性化による MEK/ERK と PI3K/mTOR シグナル経路が関わることを実証した。⑤肺がん患者血清中の ADAM28 は肺がんの診断、病期、再発、リンパ節転移の診断法として有用なことを示した。⑥ADAM28 に対する完全ヒト型中和抗体を開発し、移植ヒトがん細胞の増殖・転移を抑制することを明らかにした。

A. 研究目的

MMPは主として細胞外マトリックスの分解を介してがん細胞の増殖・進展に関わるとされているが、これまでの MMP に関する研究は、がん細胞が発現する MMP 分子の作用に関する研究が主体を占めており、がん組織間質細胞や血管内皮細胞などに由来する MMP 分子の転移での役割解析研究や上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) での MMP 分子の発現に関する情報は少ない。一方、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、ADAM 遺伝子ファミリー分子の網羅的解析により、ヒト乳がんや肺がんで ADAM28 のがん細胞特異的発現とがん細胞の増殖・転移との相関を示し、insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) の分解により insulin-like growth factor-I (IGF-I) を遊離し、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限られており、がん細胞における遺伝子発現機構や転移促進作用機構は不明である。また、ADAM28 を標的とした診断や特異的インヒビターも開発されていない。

B. 研究方法

・ MMP-13 遺伝子欠損 (KO) マウスでの肺転移実験: MMP-13 KO マウスと野生型マウスの尾静

脈内へ B16BL6 マウスメラノーマ細胞を注入し、注入後 1 日から 3 週間までの肺転移を病理組織学およびバイオイメージング法で定量した。また、メラノーマ細胞注入前後の肺組織での MMP-13、SDF-1 α 、CXCR4 遺伝子発現を定量 PCR で測定し、MMP-13 と endostatin の発現を免疫ブロット法により検討し、MMP-13 発現細胞を免疫組織学的に同定した。さらに、メラノーマ細胞の scratch wound 法による遊走実験、Matrigel 浸潤アッセイ、Matrigel 上ヒト臍帯静脈血管内皮細胞培養による内皮細胞間浸潤アッセイを行った。

・ ヒト腎がん組織での Snail、Slug、E-cadherin 発現検討: 腎細胞がん、非腫瘍性腎組織について RNA を抽出し、Snail、Slug、E-cadherin 発現を定量 PCR によって測定した。また、腎細胞がんおよび転移性腎がんにおける Snail、Slug、E-cadherin、MMP-2、MMP-9 発現を免疫組織学的に調べた。

・ ADAM28 の新規基質探索: 酵母 two-hybrid system によりヒト肺 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、結合候補分子として CTGF と VWF を見出した。これらタンパク質を活性型 ADAM28 とインキュベートし、その分解を SDS/PAGE で検討した。

・がん遺伝子導入形質転換細胞株とヒトがん細胞株での 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とヒト乳がん、肺がん、卵巣がん、大腸がん細胞株において、ADAM28 の発現を RT-PCR 法とイムノブロット法で解析した。また、これらの細胞株を 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。さらに、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。

ADAM28 特異的 ELISA 法の開発と肺がん患者血清中の ADAM28 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、非小細胞肺がん患者と健常者血清中の ADAM28 濃度を測定し、臨床病理学的因子との相関を統計学的に処理した。

・ヒト型抗 ADAM28 抗体開発: ヒト型抗体ライブラリーHuCAL を用いて ADAM28 と反応する抗体をスクリーニングし、6種類の候補抗体が得られ、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 ADAM9、10、12、17、ADAMTS1、4、5、MMP-1、2、3、7、9、13 との交差反応を検討した。また、ADAM28 高発現乳がん細胞株と肺がん細胞株をヒト型抗 ADAM28 抗体で処理後、IGF-I 誘導性細胞増殖抑制効果について検討した。さらに、キメラ遺伝子 Venus-Luciferase を導入した乳がんと肺がん細胞株を用いて、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. メラノーマの肺転移における宿主肺組織由来 MMP-13 の役割: メラノーマ細胞の肺転移は、野生型マウスに比べて MMP-13 KO マウスで 2.5-5.7 倍増加した。野生型マウスでは、メラノーマ細胞注入後 1 日目から MMP-13 は肺血管内皮細胞で発現誘導された。肺組織での SDF-1 α と CXCR4 の発現は両群間で差は認められなかったが、野生型マウスでは肺組織での endostatin 産生亢進を認めた。また、メラノーマ細胞の遊走、Matrigel 浸潤、血管内皮細胞間遊走は、endostatin 添加により濃度依存性に阻害された。

2. ヒト腎臓明細胞がんでの EMT と MMP の作用: 腎臓明細胞がんでの Snail、MMP-2、MMP-9 の発現は、病期、組織学的悪性度、肉腫様がん細胞と正の相関を示した。また、これらの免疫組織学的染色程度は、予後不良因子であった。腎がん細胞株で Snail 発現を抑制すると、E-cadherin 発現の上昇とともに、vimentin、MMP-2、MMP-9 の有意な発現抑制がみられ、遊走能と Matrigel 浸潤能が有意に抑制された。

3. ADAM28 の新規基質探索: ADAM28 結合分子として CTGF と VWF を見出した。ADAM28 は CTGF の C 末端部に結合するとともに、濃度および時間依存性に CTGF を切断した。CTGF は VEGF₁₆₅ と複合体を形成して血管新生活性をブロックするが、ADAM28 は本複合体のうち CTGF を選択的に分解し、VEGF₁₆₅ の血管新生活性を賦活化した。ヒト乳がん組織においては、ADAM28 と VEGF は主としてがん細胞に染色され、CTGF はがん細胞と間質線維芽細胞に陽性であった。一方、ADAM28 は VWF 分解活性を持つことが明らかとなった。ヒトがん細胞株を VWF とインキュベートするとアポトーシスを誘導し、その作用は ADAM28 の発現や活性に依存することが示された。また、マウス転移モデルにおいては、ADAM28 は VWF の分解を通して、VWF 誘導性アポトーシスの回避により転移促進に作用することが実証された。

4. ADAM28 の Src による発現誘導: がん遺伝子による形質転換細胞株では、v-Src で形質転換した細胞株でのみ ADAM28 発現誘導が認められた。

ADAM28 発現は、Src kinase 阻害剤でほぼ完全に発現抑制され、PI3 kinase 阻害剤あるいは MAP kinase 阻害剤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。同様な阻害パターンは、ヒト乳がん、肺がん、卵巣がん、大腸がん細胞株においても認められた。また、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. ヒト肺がん患者における血清中 ADAM28 測定：ADAM28 を測定できる ELISA 系を開発し、血清中でのレベルを測定したところ、ヒト非小細胞肺がん患者では健常者に比べ 4.6 倍高値であり、肺がんのステージ、再発、リンパ節転移と正の相関を示した。

6. ヒト型抗 ADAM28 中和抗体の開発：性質の異なる二種類の抗体を開発した。このうち、1 抗体はイムノブロット法でリコンビナント ADAM28 を認識し、他の ADAM、ADAMTS、MMP とは交差反応しないことが証明された。本抗体は、ADAM28 の酵素活性を阻害し、ヒト乳がんと肺がん細胞の増殖と転移を有意に抑制し、マウスの生存期間も改善した。

D. 考察

MMP-13 KO マウスを用いた我々の実験結果から、肺組織局所で MMP-13 により endostatin が産生され、メラノーマ細胞の遊走や血管内皮細胞間浸潤を抑制することで肺転移が抑制される機序が明らかとなった。腎がんでは、Snail が E-cadherin の発現抑制と MMP-2 や MMP-9 発現亢進により、EMT を介したがん細胞遊走・浸潤を促進していることが示された。

ADAM 分子の基質特異性は高く、通常の方法では ADAM の基質探索はきわめて困難である。我々は酵母 two-hybrid 法を用いて網羅的に探索し、CTGF と VWF を同定した。CTGF は VEGF₁₆₅ と複合体を作り血管新生活性をブロックするが、ADAM28 は CTGF の分解により VEGF₁₆₅ の血管新生活性を賦活化することを明らかにした。また、ADAM28 は VWF の分解により、VWF 誘導性がん細胞アポトーシスを回避させることでがん細胞転移に貢献していることを初めて明らかにした。

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実証し、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示した。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。

ADAM28 に対する ELISA 系を開発し、肺がん患者においては、血清レベルががんの病期、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、肺がんの新規スクリーニング法として将来的に期待される。一方、本研究課題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 特異抗体を開発できたことである。これらの抗体は、ヒト肺がん乳がん細胞株の IGF-I 誘導性細胞増殖を抑制する中和抗体であり、そのうち 1 抗体はマウス生体内でがん細胞増殖・転移の抑制効果と生存期間延長を示し、肺がんに対する治療薬剤となることが期待される。

E. 結論

①MMP-13 はメラノーマ細胞が肺血管内へ到達すると血管内皮細胞で発現誘導され、endostatin の形成によりメラノーマ細胞の血管外への遊出阻害で肺転移抑制的に作用することが示された。

②Snail は E-cadherin 発現抑制と MMP 発現亢進により腎細胞がんの悪性化に関わっていることが明らかとなり、Snail が腎細胞がんの治療標的になり得る可能性が示された。

③ADAM28 の新規基質として CTGF と VWF を同定し、ADAM28 は CTGF の切断により VEGF₁₆₅ 血管新生活性を賦活化し、血管内で VWF を分解することで転移促進に働いていることを示した。

④がん細胞での ADAM28 遺伝子発現には、Src の活性化による MEK/ERK と PI3K/mTOR シグナル経路が関わることを実証した。

⑤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。

⑥ADAM28 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., 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.

(2). 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.

(3). Fukuda H., Mochizuki S., Abe H., Okano H. J., Hara-Miyauchi C., Okano H., Yamaguchi N., Nakayama M., D'Armiento J. and Okada Y.: Host-derived MMP-13 exhibits a protective role in lung metastasis of melanoma cells by local endostatin production. *Brit J Cancer* 105:1615-1624, 2011.

(4). Mikami S., Katsube K., Oya M., Ishida M., Kosaka T., Mizuno R., Mukai M. and Okada Y.: Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. *Lab Invest* 91:1443-1458, 2011.

(5). Mochizuki S., Soejima K., Shimoda M., Abe H., Sasaki A., Okano H.J., Okano H. and Okada Y.: Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. *J Natl Cancer Inst* 104: 906-922, 2012.

(6). 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他(特許申請)

(1). Miyakoshi A., Matsumoto R., Katoh S., Hayami Y., Mochizuki S., Shimoda M. and Okada Y.: Anti-ADAM28 antibodies for therapeutics for carcinomas. 2012年11月9日、国際特許出願。出願番号 61724484。

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）
総合研究報告書

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

膵がんにおいて、孤在性浸潤が高頻度に見られる群では、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、独立した予後因子であることが示された。膵がん細胞の高度神経周囲浸潤株は、Schwann 細胞との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。膵がんのマイクロアレイ解析から、EMT に伴い高発現を示す分子として SMAD3 を同定した。SMAD3 の高発現は、リンパ節転移や術後生存率低下と有意な相関を示した。RNAi により SMAD3 の発現を抑制すると、EMT の抑制および運動能の低下が認められた。膵がん臨床検体を用いた蛍光二重染色により、25%の膵がん症例で primary cilia が検出され、その陽性症例では、有意にリンパ節転移が認められ、予後不良であることを示した。早期肝細胞がん症例のプロテーム解析から、早期がん脱分化に伴い高発現を示す分子として Talin 1 を同定した。Talin 1 の高発現は、門脈浸潤、無再発生存と有意に相関した。早期肝細胞がんの新規マーカーCAP2 に関して、ゼブラフィッシュ、肝がん細胞株での発現機能解析に加えて、肝がん切除検体を用いた検討を行い、CAP2 高発現は、腫瘍径、分化度、門脈侵襲、肝内転移と有意に相関することを示した。

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

1) 膵がんにおける孤在性浸潤の意義

浸潤性膵管がんの組織標本上、間質内に単独で浸潤するがん細胞の数をもって、個々の症例の孤在性浸潤(solitary cell infiltration, SCI)の程度を評価した。高SCI(10高倍視野内に7以上の孤在性浸潤細胞と定義)群では、術後生存期間が短く、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。また、SCI程度とEMTの特徴であるE-cadherin発現減少およびvimentin発現増加との間に相関が認められた。

2) 膵がん神経周囲浸潤の分子機構

膵がん神経周囲浸潤マウスモデルにより同定された、高浸潤株Capan-1および低浸潤株AsPC-1を用い、マウスSchwann細胞との非接触共培養を行った。その結果、Capan-1では運動能の低下が、AsPC-1では亢進が見られた。このとき、共培養後のヒト膵がん細胞は、単独培養したもの 비해、高分化で接着性が増した形態を示した。

3) 膵がんにおけるSMAD3の機能解析

膵がん臨床検体を免疫不全マウスの膵臓へ移植した膵がんモデルマウスを用い、マイクロアレイ解析により、SCIの程度に伴い発現量が変動する遺伝子としてSMAD3を同定した。免疫組織染色の結果、SMAD3高発現は、血管侵襲、リンパ節転移、WHOグレードとの間に相関が見られたが、SMAD4染色性との間に相関は見られなかった。また、EMTの指標であるE-cadherin発現低下やVimentin発現上昇、高度SCIとの間には有意な相関が見られた。in vitro実験において、RNAiにより膵がん細胞のSMAD3発現量を抑制したところ、SMAD4遺伝子変異の有無に関わらず、EMT誘導は抑制され、細胞運動能は低下した。

4) 膵がんにおけるprimary ciliaの意義

蛍光二重染色法にてacetylated α -tubulinおよび γ -tubulinの共局在を確認することに

より、膵がん症例100検体中25検体からprimary ciliaが検出されたが、立方状から低円柱状のがん細胞からなる高分化な腺管部に多く見られた。Primary cilia陽性症例では、陰性症例に比して、リンパ節転移が高頻度に認められ、また術後生存期間は短かった。

5) 肝細胞がん多段階発がんのプロテオーム解析

早期肝細胞がん結節および非がん部肝組織を用いた二次元液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析によるプロテオーム解析を行い、早期肝細胞がん発現が上昇するTalin 1を同定した。免疫組織染色の結果、肝細胞がんの脱分化に伴いTalin 1の発現漸増が認められた。また、Talin 1発現上昇を伴うがん細胞数の割合が結節内全がん細胞数の50%以上の症例群では、50%未満の症例群と比べ、門脈浸潤を伴う率が有意に高く、無再発生存期間が短かった。

6) CAP2の機能解析、悪性化への関与

肝がんを高発現するCAP2は、ゼブラフィッシュの心筋・骨格筋に発現がみられ、アクチンとの共局在を認めた。モルフォリノにより受精後の胚でCAP2発現を抑制すると、ショートボディ表現型をもつ胚の増加を認めた。肝がん細胞株において、CAP2はlamellipodiaに局在し、CAP2発現抑制によりlamellipodia形成の抑制と運動性低下を認めた。肝がん切除検体を用いた免疫組織学的検討によりCAP2高発現は、腫瘍径、分化度、門脈侵襲、肝内転移と有意な相関がみられた。

D. 考察

1) 膵がんにおける孤在性浸潤の意義

低分化がん成分が膵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、膵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、顕著なEMTの組織学的形態像とみなすし、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) 膵がん神経周囲浸潤の分子機構

膵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、膵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。

3) 膵がんにおけるSMAD3の機能解析

同所性移植膵がんモデルマウスを用いたマイクロアレイ解析により、EMT関連因子としてSMAD3が同定された。およそ半数の症例でSMAD4の腫瘍内陽性を認めたが、EMT様特徴との相関は見られなかった。しかし、SMAD3高発現とEMT様特徴との間に相関が見られ、術後生存率低下に関連していた。これらの結果から、SMAD4変異の有無に関わらず、SMAD3がEMTを介した膵がん悪性化に関与していることが示唆された。RNAiにより膵がん細胞のSMAD3発現量を抑制することにより、TGF- β によるEMT誘導は抑制され、さらにSMAD4変異細胞においては、TGF- β の関与しないEMTが抑制されたことから、SMAD3は、TGF- β またはそれ以外によるEMT誘導に関与し、がん悪性化に関与することが示唆された。

4) 膵がんにおけるprimary ciliaの意義

Primary ciliaのがんにおける役割はほとんど解明されていない。本研究では、初めて、膵がん臨床検体からprimary ciliaを検出した。高分化な腺管を構成するがん細胞で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。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。浸潤先進部ではEMTに特徴的な現象が見られる一方、primary ciliaは検出されなかったことから、primary ciliaは、EMT関連分子とは異なる機構でがん悪性化に関与していると考えられる。

5) 肝細胞がん多段階発がんのプロテオーム解析

肝細胞がんのプロテオーム解析により、腫瘍進展に伴い発現が上昇するTalin 1を同定し、予後予測にも有用である可能性が示唆された。肝移植手術症例の摘出全肝から厳選、採取された早期肝がん結節などの検体に対する最新のプロテオーム解析技術の適用は、肝発がん、悪性化に関与する未知の分子を発見するための有用な手段となり得ることが、本研究により示された。

6) CAP2の機能解析、悪性化への関与

Cyclase-associated proteinは出芽酵母にお

けるRas調節性アデニル酸シクラーゼ活性に重要な分子として見出され、哺乳類では2つのホモログ(CAP1/2)が知られているが、高等脊椎動物や哺乳類におけるCAP2の機能については殆ど知られていない。そこで、脊椎動物の発生ならびに肝細胞がんにおけるCAP2の機能を検討した。CAP2は脊骨格筋発生に関与するとともに、がん細胞の運動性と関わり肝細胞がんの悪性化に重要であることが示唆された。

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。膵がんの孤在性浸潤、神経周囲浸潤、primary ciliaの臨床病理学的意義、さらにSMAD3の分子機構の検討を行い、新たな知見が得られた。肝細胞がんのプロテオーム解析、さらにTalin 1およびCAP2の機能解析、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

論文発表 (発表誌名・巻号・ページ・発行年)

- 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: 891-896, 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: 1339–1345, 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: 1731–1737, 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.
 - 8 Kanamori H, Kawakami T, Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Ebinuma H, Masugi Y, Du W, Nagasaka K, Ogiwara A, Kyono Y, Tanabe M, Saito H, Hibi T, Sakamoto M. Identification by Differential Tissue Proteome Analysis of Talin-1 as a Novel Molecular Marker of Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 80: 406–415, 2011.
 - 9 Tsuchiya K, Komuta M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Itakura J, Nakanishi H, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Enomoto N, Sakamoto M, Izumi N. Expression of keratin19 is related to high recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Oncology* 80: 278-288, 2011.
 - 10 Yamazaki K, Masugi Y, Sakamoto M. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma: altering transforming growth factor- β signaling in hepatocarcinogenesis. *Dig Dis* 29: 284-288, 2011.
 - 11 Yokoo H, Yasuda J, Nakanishi K, Chuma M, Kamiyama T, Todo S, Hirohashi S, Sakamoto M. Clinicopathological significance of nuclear factor- κ B activation in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 41: 240-249, 2011.
 - 12 Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Masugi Y, Makino S, Sakamoto M. Involvement of hepatocellular carcinoma biomarker, cyclase-associated protein 2 in zebrafish body development and cancer progression. *Exp Cell Res* 319: 35-44, 2013.
 - 13 Fukuma M, Tanese K, Effendi K, Yamazaki K, Masugi Y, Suda M, Sakamoto M. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 regulates epithelial cell phenotype and survival of hepatocellular carcinoma cells. *Exp Cell Res* 319:113-121, 2013.
 - 14 Emoto K, Masugi Y, Yamazaki K, Effendi K, Tsujikawa H, Tanabe M, Kitagawa Y, Sakamoto M. Presence of primary cilia in cancer cells correlates with prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hum Pathol* 45: 817–825, 2014.
 - 15 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. Labo Invest (in press) 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

研究分担者 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 関連分子を同定し、その機能を明らかにして、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、扁平上皮がんが発現が亢進している TSC22D4/THG-1、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。TMEPAI は多くのがん細胞で発現が亢進しており、TGF- β シグナルのネガティブフィードバック制御因子として機能していた。TSC22D4/THG-1 は扁平上皮癌で発現が亢進し、細胞増殖を促進していた。MafK は、乳癌細胞で上皮間葉転換を誘導するとともに、GpnmB の発現誘導を介して腫瘍形成を促進した。

A. 研究目的

がんの発生と進展に関わる新規 TGF- β 関連分子を同定し、その腫瘍形成促進作用の分子機構を明らかにして、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。同定した分子に対してモノクローナル抗体を作製して臨床病理学的解析を行うとともにがんの診断にも応用することを目指した。さらに、これらの腫瘍形成促進因子が、がん幹細胞の増殖動態に及ぼす作用を解析することを目的とした解析ソフトウェアとシミュレーションソフトウェアを開発した。

B. 研究方法

TGF- β によって発現が誘導される遺伝子をいくつかの実験系で網羅的にスクリーニングし、その中から、がん組織で発現が亢進しているものを選択して、その過剰発現細胞やノックダウン細胞を作製して、*in vitro*における細胞増殖、浸潤、スフェア形成、上皮間葉転換(EMT)、免疫不全マウスにおける皮下移植実験での腫瘍形成、尾静脈注射後の肺における腫瘍形成などを検討した。また、同定された分子の予測された種々の機能ドメインに変異を導入して分子レベルでの作用や腫瘍形成に対する影響を解析し、機能ドメインの同定を行った。さらに、DNA マイクロアレイ解析やプロテオミクス解析による結合タンパク質のスクリーニングを行い、その中から同定した腫瘍促進因子の腫瘍形成能に関

与する標的分子の同定を行った。

同定された新規腫瘍形成誘導分子に対して、必要に応じてモノクローナル抗体を作製して、ウエスタンブロットティング、蛍光免疫染色、組織染色などに使用した。

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、固定後パラフィン包埋したスフェア内の細胞増殖動態を、連続切片の Ki-67 抗体による染色を行って 3 次元再構築像を解析する方法を検討した。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 次元再構築を行って解析した。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。また、スフェア内におけるがん幹細胞と娘がん細胞の増殖動態とスフェアサイズの関係性をシミュレーションするソフトウェアを開発した。

(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

TGF- β によって発現が誘導されることを同定した TMEPAI は、がん組織で発現が亢進しているという論文が複数報告されていたため、TMEPAI の TGF- β による発現誘導に関わるシス

エレメントを同定した。また、TMEPAI は TGF- β のシグナル伝達分子である Smad2, Smad3 に特異的に結合し、Smad のリン酸化を抑制することで、TGF- β シグナルのネガティブフィードバック制御を行う機能をもつことを明らかにした。さらに、抗 TMEPAI 抗体を樹立し、肺腺癌細胞株 (Calu3, NCI-H23) ならびに口腔扁平上皮癌細胞株 HSC4 において、TMEPAI が過剰発現していることを示した。これらの細胞で 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した。また、スフェア形成実験と NOD-SCID マウス皮下移植実験で腫瘍形成、尾静脈注射後の肺における Calu3 細胞の腫瘍形成を検討し、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が著しく低下することを確認した。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、これらの変異体発現細胞群の腫瘍形成能とともに、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ており、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相同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。加えて、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 は、TGF- β によって誘導される分子として発見された TGF- β stimulated clone 22 (TSC22D1)のファミリー分子であることから注目した。TSC22D4/THG-1 の組織中での発現を検討したところ皮膚や食道粘膜などの重層扁平

上皮の基底層でのみ特異的に発現していた。また、扁平上皮癌組織では、食道癌の 92%、子宮頸癌の 80%、肺扁平上皮癌の 67%でがん細胞集団にびまん性の TSC22D4/THG-1 の発現が認められた。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、RasG12V と TSC22D4/THG-1 の 2 重導入細胞では、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 は、Ras/MAPK 経路によるリン酸化を受けることが認められたため、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発現させた細胞を作製したところ、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 細胞と 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も作製して、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 を免疫沈降した際に共沈するタンパク質のマスマスペクトロメトリ解析で同定した。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る分子があったため、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、腫瘍形成促進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。

化学発癌物質の解毒代謝や抗酸化分子の誘導を担う転写因子である Nrf2 の活性を TGF- β が抑制することを発見した。Nrf2 活性の抑制機構を解析したところ、Nrf2 の標的遺伝子のひとつである Heme oxygenase-1 の発現誘導は、TGF- β シグナルによって転写因子 MafK が誘導されることに抑制されることが明らかになった。乳腺上皮

細胞株 NMuMG における MafK の作用を検討したところ、MafK は NMuMG 細胞に EMT を誘導し、強い腫瘍形成誘導能をもつことが示された。そこで乳癌細胞で MafK の発現を調べたところ、調べたほとんどのマウス乳癌細胞株で MafK の発現が亢進していることが確認された。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 細胞に高度のスフェア形成能と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-Mock 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のに対し、NMuMG-MafK 細胞は、未分化な充実性の細胞集団を形成し、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。その結果、MafK は強力な EMT 誘導能を示したが、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 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。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。

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、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、これらを腫瘍形成能に関与する候補標的遺伝子と考え、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と 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、乳癌細胞株 4T1 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ることが確認された。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、浸潤能、腫瘍形成能も有意に低下することが確認された。さらに、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は、シグナル伝達に関与することが示唆される hemITAM モチーフがあり、このモチーフ内にあるチロシン残基のリン酸化が、シグナル伝達に関わっていることが示唆されたため、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 ファミリーのチロシンキナーゼ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実験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 次元再構築を加えて、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、この系における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。