

## 15-13 がん生物像を規定するがん組織内微小環境に関する研究

主任研究者 慶應義塾大学医学部 岡田 保典

本研究の主要な成果は以下の通りである。1) ヒト悪性腫瘍での膜型ADAMの発現を解析し、ADAM12 は glioblastomaに、ADAM28 は乳癌と肺癌で高発現し、いずれも増殖因子の代謝を通して腫瘍細胞の増殖に関わることを明らかにした。2) HB-EGFはシェディングにより細胞外と細胞内ドメインに分かれ、それぞれ増殖因子と転写制御解除因子として機能し、後者は細胞周期進行を制御することを示した。3) HGFアンタゴニストNK4の制癌治療剤としての可能性を示し、HGFリセプターシグナル変換にc-MetのSer<sup>985</sup>リン酸化が重要なことを明らかにした。4) HGF活性化因子の HGFAはHGF活性化により悪性腫瘍細胞の浸潤性増殖に関わり、HGFA阻害因子HAI-1 は多彩な生体内機能を持つことを示した。5) 癌組織間質に骨髄由来線維芽細胞の出現を証明し、線維芽細胞動員機構を明らかにした。6) 食道癌リンパ節転移関連遺伝子をスクリーニングするとともに、ケモカインリセプターのCXCR4の食道癌での役割を解析した。

分担研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
岡田 保典	慶應義塾大学医学部 教授	ヒトがん組織における膜型 ADAM の発現
東山 繁樹	愛媛大学医学部 教授	膜型増殖因子 HB-EGF の shedding と新規シグナリング
松本 邦夫	大阪大学大学院医学研究科 助教授	HGF をメディエーターとする癌 間質相互作用を介した浸潤・転移とその阻止
片岡 寛章	宮崎大学医学部 教授	細胞膜結合型インヒビターによる癌細胞周囲微小環境における生理活性物質活性化調節：HGF 活性化を例にとつて
石井 源一郎	国立がんセンター研究所 室長	がん間質を形成する線維芽細胞の生物学的不均一性についての研究
藤盛 孝博	獨協医科大学 教授	脈管侵襲、微小転移は明白な転移形成につながるか？
(班 友)		
白土 秀樹	国立病院九州医療センター 医師	頭頸部扁平上皮癌におけるリンパ節微小転移解析に関する研究：転移巣における SCC 抗原発現のメカニズム
鈴木 宏明	国立札幌病院 室長	肺癌および肺組織における CD44 の発現
草野 由理	国立名古屋病院 研究員	腫瘍細胞のシンデカン-2は発現量依存的に腫瘍組織微小環境を調整する

### 1. 研究目的

生体内におけるがん細胞の増殖・浸潤・転移などの生物学的多様性は、がん組織内微小環境によって規定されている。したがって、がん細胞は間質組織との密接な連携のもとにはじめて生存可能であり、がん組織内微小環境の理解なしにがん細胞の制御は不可能と考えられる。がん組織間質細胞が産生した細胞外マトリックスや増殖因子はがん細胞の増殖・運動・浸潤のバリアーや血管新生などの作用を営んでおり、局所で働くプロテアーゼは細胞外マトリックスや増殖因子の代謝に関わっている。また、血管新生は組織酸素化や栄養補給によるがん細胞の増殖・浸潤に必須である。本研究班では、がん生物像を規定するがん細胞周囲微小環境に関して、がん細胞周囲での増殖因子代謝におけるADAM (α disintegrin and metalloproteinase) の作用機序と細胞内シグナル、血管新生因子HGF (hepatocyte growth factor)の活性調節機構とその制御による浸潤・転移、がん間質細胞の由来、ヒトがん組織局所での遺伝子発現などについて解析し、がん組織微小環境モジュレーターの分子作用機構を基礎的に解析し、新規の間質標的治療法開発に役立てることを目的とする。

する。

平成 15-16 年度に実施した主な研究は、以下の通りである。(1) ヒト癌組織で発現亢進するプロテアーゼ型 ADAM 分子の同定とその機能解析。(2) ADAM12 の作用でシェディングされた HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor) の細胞内ドメインの役割解析。(3) HGF 分解産物である NK4 の制癌作用と HGF レセプターである c-Met のシグナル変換機構の解析。(4) HGF 活性化因子 HGFA activator (HGFA) と HGFA inhibitor (HAI-1) の生体内での機能検討。(5) ヒト癌細胞株移植マウスモデルでの癌組織内線維芽細胞の由来。(6) 食道癌リンパ節転移関連遺伝子のスクリーニングと CXCR4 発現解析。

### 2. 研究成果

平成 15-16 年度の研究により以下のことを明らかにした。

1). ヒト悪性腫瘍での膜型 ADAM の発現解析：

ヒトグリオーマでのメタロプロテアーゼ型 ADAM(ADAM8、9、10、12、15、17、20、21、28、30)の遺伝子発現を real-time PCR と RT-PCR で検討した結果、ADAM12 が glioblastoma に特異的に高発現

することを見出した。In situ hybridization では ADAM12 の遺伝子発現は glioblastoma 細胞に特異的にみられ、免疫染色でも glioblastoma 細胞膜上に染色され、イムノブロット法により組織内では活性型分子として存在していた。また、ADAM12 の mRNA 発現レベルはグリオーマ細胞の増殖能と正の相関を示した。ADAM12 は HB-EGF を細胞表面で切断し増殖因子活性をもつ細胞外ドメインを放出することから、HB-EGF のシェディングを検討したところ、ADAM12 発現レベルとシェディングは相関した。さらに、ADAM12 を高発現するヒト glioblastoma 組織と glioblastoma 細胞株を ADAM 特異的インヒビター存在下で培養すると、HB-EGF のシェディングが有意に抑制された。以上のデータから、ヒトグリオーマで発現された ADAM12 は HB-EGF のシェディングを通してグリオーマ細胞の増殖に関わると推定された。一方、ヒト乳癌と肺癌組織においては、分泌型 ADAM28s と膜型 ADAM28m の遺伝子発現が癌組織において非癌部よりも有意に高値を示した。ADAM28 特異的モノクローナル抗体を作製し免疫染色したところ、ADAM28 は癌細胞に局在し、癌組織内においては ADAM28 は活性型酵素として存在することがイムノブロット法で示された。これらの癌組織では、ADAM28 の mRNA 発現レベルは癌細胞の増殖能と正の相関を示した。また、リコンビナント ADAM28s は IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein-3) を分解して IGF-I/IGFBP-3 複合体から IGF-I を遊離することを示すと同時に、乳癌組織における ADAM28 の発現レベルは IGFBP-3 の分解と相関し、ADAM インヒビターや ADAM28 抗体での癌組織の処理により分解が抑制された。これらのデータは、ADAM28 が IGFBP-3 の分解を通して乳癌細胞の増殖に関わることを示唆している。

2). HB-EGF カルボキシ末端ペプチド (HB-EGF-C) の機能解析：

HB-EGF の shedding によって産生される HB-EGF-C は速やかに核内に移行し、遺伝子転写リプレッサの一つ PLZF と結合し、これを核外に汲み出す反応を誘導することを明らかにした。これによって、PLZF により転写抑制を受けていたサイクリン A の遺伝子転写が活性化された。よって、HB-EGF は shedding により細胞外ドメインと細胞内ドメインに分かれ、各々増殖因子と転写抑制解除因子として機能し、細胞増殖を 2 方向から制御することを明らかにした。一方、HB-EGF shedding の生理的意義を解析するため、HB-EGF を恒常的に分泌する遺伝子改変マウスと HB-EGF の分泌が抑制される shedding 抵抗性遺伝子改変マウスを作製した。HB-EGF を恒常的に分泌すると、キメラ状態で死亡した。その原因として心筋細胞の肥大ならびに形態形成異常、皮膚の表皮ケラチノサイトの過増殖による肥厚が観察された。一方、HB-EGF shedding 抵抗性マウスはホモマウスに拡張型心筋症の症状が現れ、6-8 ヶ月で死亡することが明らかとなった。以上のことから、HB-EGF の shedding 制御は少なくとも皮膚、心形成ならびに

それらの機能維持に必須であることが示唆された。さらに、培養細胞を用いて細胞周期制御の側面から解析した結果、HB-EGF shedding は細胞周期の G1-S 期への進行過程でもっともよく誘導されることを明らかにした。また、early G1 期では HB-EGF-C は細胞膜に局在し、PLZF は核に局在するが、S, G2 期になると、各々の局在は大きく変化し、HB-EGF-C が核に移行し、PLZF は細胞質に移行することを確認した。これらのことから、HB-EGF の shedding は細胞周期進行と連動しており、HB-EGF-C シグナルが細胞周期進行を制御する可能性を示唆した。

3). NK4 による制癌作用と c-Met/HGF レセプターシグナル変換能に関する ON/OFF 制御機構の解析：

NK4 はその 2 機能性 (HGF アンタゴニスト活性 / 血管新生阻害活性) に基づき新しい制癌法になることが期待された。マウス大腸癌細胞を脾臓内に移植すると高頻度に肝転移をきたすとともに、転移巣辺縁部では著しい浸潤とともに c-Met レセプターのチロシンリン酸化が認められ、癌細胞の浸潤には HGF をメディエーターとする癌-間質相互作用が関与することが示唆された。そこで NK4 遺伝子治療を施したところ、大腸癌細胞の肝転移が強く抑制されるとともに、血管新生阻害を介して転移巣の成長が抑制された。さらに、転移巣辺縁部では c-Met のチロシンリン酸化が抑制されることと一致して癌細胞浸潤は強く抑制された。したがって、NK4 により腫瘍血管新生ならびに HGF を介した癌-間質相互作用を同時に阻害することが悪性化阻止につながる制癌法になることが確認された。一方、c-Met レセプターのシグナル変換能は傷害・細胞間接着などによって制御され、正常組織においてはたとえ HGF が結合しても活性化されない OFF 状態にある。c-Met シグナル変換能を c-Met の juxtamembrane 領域の Ser<sup>985</sup> のリン酸化に注目して解析したところ、Ser<sup>985</sup> は PKC ならびに protein phosphatase-2A によってリン酸化 / 脱リン酸化の制御を受け、Ser<sup>985</sup> がリン酸化された状態では HGF による c-Met の活性化は抑制されるとともに、これと一致して HGF の生物活性が抑制された。すなわち、Ser<sup>985</sup> のリン酸化は c-Met を介したシグナル伝達能の抑制機構の一つであることを明らかにした。最近、複数のヒト癌において c-Met-juxtamembrane 領域に変異が報告されており、c-Met シグナル変換能における抑制機能の喪失が発癌・癌悪性化に関与することが示唆された。

4). HGF の活性調節機構：

活性のない前駆体の形で産生分泌される HGF の活性化分子機構を解明するために、HGFA 活性化能の強い HGF activator (HGFA) と、その内因性インヒビターである HGFA inhibitor type 1 (HAI-1) に着目して研究し、以下の成果を得た。(a) HGFA と HAI-1 の癌組織 (大腸癌、腎癌、骨髄腫、神経膠芽腫) における発現とその意義について検討し、癌組織において HGFA による HGF 活性化が生じていることを示した。(b) HGFA の強制発現により、神経膠芽腫細胞の in vivo における浸潤性増殖が亢進することを確認した。

(c) HGFA ノックアウトマウスを作製し、傷害組織における HGF の急速な活性化に、HGFA が重要な役割を持つことを明らかにした。(d) HAI-1 ノックアウトマウスを作製し、HAI-1 が胎盤の発生に必須であることを明らかにし、また HAI-1 には HGF 活性化調節以外の、予想外の重要な生体内機能が存在することを示した。以上のデータは、HGF 活性化機構が癌組織における HGF 活性化に重要な役割を持つことを示唆しており、HGF 活性化機構は癌細胞の浸潤転移抑制を目的とした分子標的治療のターゲットとなる可能性があり、HAI-1 の生体内機能については更なる基礎的研究の必要性を示している。

5).  
がん間質に取り込まれる線維芽細胞の起源と動員機構：

がん間質内の筋線維芽細胞は起源が不均一であり、骨髄由来と非骨髄由来（既存組織由来）の線維芽細胞が存在していることが明らかとなった。また、腫瘍形成早期（2週間）には、がん間質に動員される線維芽細胞の大半はがん胞巣周囲の間質組織由来線維芽細胞であるのに対し、腫瘍形成後期（4週間）では、骨髄由来の線維芽細胞が末梢血を介してがん間質の形成に参画していた。さらに、骨髄由来の線維芽細胞の動員機構には、(a)腫瘍の間質成分の占める割合が重要であること、すなわち、間質形成能の高い腫瘍では、骨髄より線維芽細胞を動員する能力が高いこと、(b)腫瘍の間質形成能、および骨髄からの線維芽細胞の動員には、腫瘍細胞の生物学的性格のみならず、腫瘍生着臓器の微小環境もまた重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

6). 食道癌リンパ節転移関連遺伝子のスクリーニングと CXCR4 の発現解析：

食道扁平上皮癌のリンパ節転移関連因子のスクリーニングを行うため、食道癌培養細胞株 T.Tn よりリンパ節転移株 T.Tn-AT1 を分離した。次いで、T.Tn と T.Tn-AT1 における遺伝子発現の違いを 9206 個の遺伝子をスポットしている CodeLink Bioarray (Motorola) を用いて検索し、発現差の顕著な 9 遺伝子 (KAL1, HPGD, NDN, REG1A, CXCR4, SPOCK, DIAPH2, AIF1, VNN2) をクローニングした。これらの遺伝子は、細胞接着、遊走、炎症、増殖、分化に関する遺伝子であり、転移過程で重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、種々の口腔扁平上皮癌細胞株におけるケモカインレセプターの発現検討により、浸潤転移能の高い細胞では CXCR4 の高発現が認められ、そのリガンドである SDF-1 により遊走能と浸潤能の促進が示された。また、CXCR4 シグナルは Src family kinases を介して ERK1/2 あるいは Akt/PKB を活性化することを明らかにした。ヒト食道扁平上皮癌の免疫組織化学を行ったところ、非癌部扁平上皮の傍基底層や腫瘍細胞が CXCR-4 陽性を示し、細胞質と核のいずれかあるいは両方に顆粒状の陽性所見を認めた。

7). 班友の研究成果：

白土班友は、扁平上皮癌のマーカーとして広く臨

床の場で用いられている SCC 抗原が serine proteinase inhibitor である SCCA1/SCCA2 であることを示してきた。また、その発現を *in situ* hybridization で解析し、腫瘍細胞周囲に浸潤した T リンパ球に特異的に発現することを明らかにした。このことは、サイトケラチンと SCCA1/SCCA2 の発現を同時に検索することにより、頭頸部扁平上皮癌のリンパ節転移を解析できる可能性を示唆している。鈴木班友は、RT-PCR とシーケンス法で肺組織や気管支組織に多種類の CD44 スプライズバリエーションを同定した。同定したバリエーションのうち 2 種は新規のものであった。また、正常組織と比較して癌組織で発現低下していた転写産物は、variant exon v3, v4, v5, v6, v7 を有しており、この産物の機能解析を進めている。草野班友は、各シンデカンのタンパク質芯細胞外ドメイン組換えペプチドに対する抗体を作製し、マウスルイス肺癌由来で転移能の異なる株細胞から精製したシンデカンを認識することや相互に交叉性がない特異性の高い抗体であることを確認した。その抗体を基質に用い、個々のシンデカンからの刺激により細胞内に誘導されるアクチン細胞骨格形成能を検討した結果、シンデカン分子間には機能特異性があること、シンデカン-2 はインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  の結合情報のみならず、シンデカン-4 からのシグナル伝達においてもその下流に位置し、制御していることを示した。本研究結果は、シンデカン-2 と-4 のシグナル伝達系では階層性があり、シンデカン-2 と-4 との間にクロストークしていることを示唆するものであり、シンデカン-2 は発現量依存的に、フィブロネクチン受容体としてその細胞応答性を制御する鍵となる分子であることを示すものであった。

### 3. 倫理面への配慮

本研究では、ヒト悪性腫瘍組織の手術検体を用い、これら組織での mRNA と蛋白質レベルの発現解析を行うことから、解析に関して患者本人のインフォームドコンセントを得た上で関係者の人権保護に十分配慮した。組換え遺伝子の担癌マウスへの導入とノックアウトマウスの解析は組換え遺伝子実験に該当し、安全対策については十分な注意を払ってきた。また、以上の研究計画については、各研究施設の倫理委員会と組換え遺伝子実験安全委員会の承認を得て行っている。