

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

研究成果の要旨

本年度の主な研究成果は以下の通りである。1) 潜在型 MMP-7 は CD151 との結合を介して細胞膜上で活性化されることを明らかにするとともに、ヒト子宮内膜癌の低分化型腺癌での両分子の共存と癌細胞周囲での活性化を証明した。2) シェディングで切り残された HB-EGF のカルボキシ末端細胞内ドメインのシグナルが、増殖因子による c-myc 遺伝子発現に必須であることを明らかにした。3) 正常肝細胞の接触阻害機構の解析を通して、c-Met/HGF リセプターシグナルの不活性化に LAR が関わることを示した。4) HGF 活性化因子の HGFA とその活性阻害因子 HAI-1 に関して、腫瘍細胞とノックアウトマウスによる解析で HGFA による HGF 活性化が浸潤性増殖に関わることを明らかにした。5) 癌組織間質に骨髄由来線維芽細胞が出現し、それらの I 型コラーゲン産生能と細胞マーカーを明らかにした。6) ケモカインリセプターの CXCR4 の癌細胞における核発現機構とヒト食道癌における臨床病理学的意義を示した。

研究者名および所属施設

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	細胞—細胞外マトリックスインターフェイスで働く MMP/ADAM の作用機構
東山 繁樹	愛媛大学医学部 教授	癌細胞増殖における HB-EGF CTF シグナリングの役割
松本 邦夫	大阪大学大学院医学系研究科 助教授	がん-間質相互作用を介した浸潤・転移・血管新生制御とその阻止
片岡 寛章	宮崎大学医学部 教授	ヒト癌組織における HGF 活性化機構
石井 源一郎	国立がんセンター東病院臨床開発センター 室長	がん間質に動員される線維芽細胞の起源・機能の不均一性
藤盛 孝博	獨協医科大学 教授	微小転移の生物学的・臨床的意義：癌細胞の異所環境での生き残りが転移能を決定しているのか？
鈴木 宏明	北海道がんセンター 室長	肺癌および肺組織における接着分子 CD44 の発現についての研究
瀧口 総一	九州がんセンター 研究員	クロマチン構造変換因子の発がんの癌転移における意義

研究報告

1 研究目的

ヒトがん細胞がもつ増殖・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ことから、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である。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分解や増殖因子代謝に関わっている。また、血管新生は組織酸素化や高栄養状態によりがん細胞の増殖・浸潤に必須である。本研究班では、これらのがん組織内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。今年度遂行した主な研究課題は、以下の通りである。(1)ヒト子宮内膜癌での潜在型 MMP-7(matrix metalloproteinase-7)の CD151 を介した細胞膜上活性化機構の解析。(2) HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor) カルボキシ末端細胞内ドメインの機能解析。(3) HGF(hepatocyte growth factor) レセプター c-Met のシグナル調節に関与する膜貫通型チロシンフォスファターゼ LAR の作用解析。(4) HGF activator (HGFA)、HGFA inhibitor (HAI-2)、H2RSP(HAI-2 related small peptide)の機能解析と癌組織内発現。(5) 癌組織間質に出現する骨髄由来線維芽細胞の性質とマーカーの検討。(6) CXCR4 の核発現機構とヒト食道癌組織での臨床病理学的意義の解析。

2 研究方法

潜在型 MMP-7 の CD151 を介したヒト子宮内膜癌細胞膜上での活性化実験では、潜在型 MMP-7 結合分子を酵母 two-hybrid system でスクリーニングし、MMP-7 と CD151 の分子間相互作用を免疫沈降法、binding assay、免疫染色を用いて解析し、MMP-7 活性を in situ zymography 法で検出した。また、ヒト子宮内膜腺癌組織における作用を調べた。HB-EGF のカルボキシ末端ドメインの機能解析実験では、アデノウイルスベクターを用いて HB-EGF 遺伝子を HB-EGF 遺伝子欠損 MEF 細胞に発現させて c-myc 遺伝子発現の有無を検討した。膜貫通型チロシンフォスファターゼ LAR による Met シグナル調節機構の解析では、初代肝細胞の培養環境を変えることにより、LAR の Met との複合体形成と Met の脱リン酸化を検討した。組織内での HGF 活性制御機構の解析研究では、HAI-1 ノックアウ

トマウスを作製し、胎盤の形成障害を詳細に検討するとともに、HAI-1 遺伝子を腫瘍細胞で発現させ、浸潤・増殖能の変化を調べた。癌組織間質における線維芽細胞の検討実験では、GFP Tg・RAG-1^{-/-} マウスの骨髄細胞を移植したマウスに肺癌細胞株を移植し、GFP 陽性骨髄由来線維芽細胞の出現と性質を調べた。CXCR4 の核発現実験では癌細胞株とヒト食道癌組織を用いて主として免疫染色法で検討した。

3 研究成果

本年度の研究成果として以下のことを明らかにした。

(1) 潜在型 MMP-7 の CD151 を介したヒト子宮内膜癌細胞膜上での活性化 :

酵母 two-hybrid system により潜在型 MMP-7 結合分子としてテトラスパニンの 1 分子である CD151 をスクリーニングした。酵母 two-hybrid assay により潜在型 MMP-7 の propeptide と CD151 の C 末端細胞外ループが相互作用することが示され、両分子の細胞膜上での共存は免疫沈降法、共焦点顕微鏡による観察および結合実験により示された。また、クロスリンクしたカルボキシメチル化トランスフェリンを用いた in situ zymography を開発し、CD151 発現細胞の細胞膜上で潜在型 MMP-7 が活性化することを実証した。ヒト子宮内膜癌では、低分化型腺癌で MMP-7 と CD151 は共存し、in situ zymography により癌細胞周囲で MMP-7 の活性化を認め、その活性化に CD151 との相互作用が必要であることを示した。

(2) 増殖因子刺激での c-myc 発現における HB-EGF カルボキシ末端ドメインの関与 :

マウス胚性線維芽細胞 (MEF 細胞) に EGF, bFGF(basic fibroblast growth factor), PDGF(platelet-derived growth factor) 等の増殖因子を作用させると、c-myc 遺伝子が初期応答遺伝子の一つとして反応し、細胞増殖が生じる。これに対し、HB-EGF 遺伝子欠損 MEF 細胞ではこれら増殖因子刺激による c-myc 遺伝子発現が顕著に抑制されるが、各種増殖因子受容体から引き起こされる MAP キナーゼカスケード等の活性化に見られる増殖シグナルに変化がない事を確認した。一方、同遺伝子欠損 MEF 細胞にアデノウイルスベクターを用いて HB-EGF 遺伝子を戻すと、野生型 MEF と同程度の c-myc 遺伝子発現を観察した。以上のデータは、増殖因子刺激による c-myc 遺伝子発現は受容体からのシグナル伝達で必要十分ではなく、HB-EGF カルボキシ末端細胞内ドメインのシグナルが増殖因子による c-myc 遺伝子発現に必須のステップとなっている事を示唆している。また、HB-EGF-C シグナルが

BCL6 による cyclin D2 遺伝子発現抑制を解除するデータを得ており、細胞増殖制御の側面における HB-EGF-C シグナルの重要性を示した。

(3)膜貫通型チロシンフォスファターゼLARによるMetシグナル調節：

HGF は低細胞密度下の初代培養肝細胞の DNA 合成を強く促進するのに対して、高細胞密度においては DNA 合成を促進しない。このとき低細胞密度では HGF による Met の活性化（チロシンリン酸化）が持続されるのに対して、高細胞密度では HGF 刺激後、膜貫通型チロシンフォスファターゼ LAR が Met と複合体を形成するとともに、Met を脱リン酸化（不活化）することを見出した。Met-LAR 複合体形成による Met の活性化抑制は contact inhibition における新しい分子機構の一つであり、Met-LAR による Met シグナルの OFF 機構の異常が細胞癌化、癌悪性化に関与することが示唆された。

(4)組織内でのHGF活性化制御機構の解析：

悪性神経膠腫細胞を用いた実験において、内因性 HGF 発現細胞株で HGFA 発現が浸潤性増殖を亢進させることを明らかにし、HGF 活性化機構が癌細胞の浸潤性増殖に重要な役割を持つことを示した。HAI-1 ノックアウトマウスを作製したところ、胎盤における迷宮層形成障害により胎生約 10.5 日で致死となった。HGF およびその受容体 MET のノックアウトマウスも胎盤迷宮層の形成異常を示し致死となるが、致死期は E12.5 - E14.5 と明らかに HAI-1 ノックアウトマウスの方が早期に致死となることや、HAI-1 の標的酵素とされている HGFA とマトリプレースのノックアウトマウスは胎盤に異常をきたさない事実から、HAI-1 には HGF 活性化調節以外の生体内機能を有することが明らかとなった。一方、膜型 HAI-1 の過剰発現は *in vivo* において悪性神経膠腫細胞の増殖を亢進させるのに対し、分泌型 HAI-1 ではむしろ抑制的な効果を示した。上記の実験結果は、HGF・MET シグナリングにおける HGF 活性化機構の重要性を示しており、HGF 活性化機構は癌細胞の浸潤性増殖抑制を念頭においた分子標的治療の候補となると考えられる。HAI-2 遺伝子の下流に存在し、HAI-2 とキメラ分子を形成する H2RSP 遺伝子を見出した。H2RSP は、正常消化管上皮の増殖帯の細胞では細胞質に発現し、分化した腺管上層部の上皮細胞では核内に移行した。一方、腺癌細胞では H2RSP 発現は低下するのに対し、癌の浸潤先端部の癌細胞では細胞質内に高発現した。また、癌細胞株に H2RSP を強制発現すると、細胞増殖活性が抑制された。

(5)癌組織間質における線維芽細胞の検討：

GFP Tg・RAG-1^{-/-}マウスの骨髄細胞を骨髄移植したマウスを用いて、ヒト肺癌細胞株を皮膚移植し、移植癌組織内の GFP 陽性細胞数と I 型コラーゲン産生能および骨髄由来線維芽細胞のマーカーを検討した。また、正常皮膚、損傷皮膚、気管内ブレオマイシン投与肺を対照とした。癌細胞移植片では他の対照群に比較し有意に多くの GFP 陽性線維芽細胞の動員があり、これらの細胞は I 型コラーゲン産生を示した。また、これらの GFP 陽性細胞の半数近くは CD45、Thy-1、 α -smooth muscle actin を発現していた。これらの結果から、癌間質には骨髄由来線維芽細胞が高頻度に動員され、I 型コラーゲンの産生により組織線維化に関与していることが明らかになり、CD45 分子の発現はその起源の上で興味深いと考えられた。

(6)CXCR4 核発現機構とヒト食道癌組織における臨床病理学的意義：

癌細胞株において CXCR4 が核に発現することを免疫染色で認めたため、細胞株より核、細胞膜、細胞質の各成分を準備しイムノプロットした結果、核での発現を証明した。また、細胞株を低酸素やコンフルエント状態で培養すると、その局在は核から細胞質と細胞膜へ移行することを認めた。ヒト食道癌組織での CXCR4 の局在を調べたところ、核陽性像は分化度の低い癌で高頻度にみられ、陽性群は陰性群に比べて有意に予後が悪いことを示した。また、CXCR4 の核発現する食道癌では SDF-1 α (CXCR4 のリガンド) が高頻度で発現し、リン酸化 EGF 受容体発現も核で増強していた。以上のデータより、CXCR4 は細胞過密接触や低酸素環境下では膜に発現させることでその場での生存に作用し、浸潤の際には核へと移行し、浸潤・転移に関わる可能性があるかと推定された。

(7)班友の研究成果：

鈴木班友は、正常気管、肺癌、肺組織に新規の CD44 スプライスバリエントを同定した。本バリエントの解析により、新しい splice acceptor site の存在を示し、培養細胞を用いて本 acceptor site を用いて splicing が生じることを証明した。瀧口班友は、クロマチンの修飾に関与する蛋白質複合体中のコリプレッサー蛋白である MTA family の MTA1 ノックアウトマウスでの解析から、本分子がステロイド応答性遺伝子や血管新生に関わる可能性を示し、現在なお検討中である。

4 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。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Shiomi, T., Okada, Y., et al., Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151. *Lab. Invest.*, 85: 1489-1506, 2005.
2. Nemori, R., Okada, Y., et al., Development of in situ zymography to selectively localize active matrix metalloproteinase (matrilysin-1). *J. Histochem. Cytochem.*, 53: 1227-1234, 2005.
3. Matsumura, S., Okada, Y., et al., Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J. Clin. Invest.*, 115: 599-609, 2005.
4. Nakada, M., Okada, Y., et al., Human glioblastomas overexpress ADAMTS-5 that degrades brevican. *Acta Neuropathol.*, 110: 239-246, 2005.
5. Ohtsuka, T., Okada, Y., et al., ADAM28 is overexpressed in human non-small cell lung carcinomas and correlates with cell proliferation and lymph node metastasis. *Int. J. Cancer*, 118: 263-273, 2006.
6. Itoh, Y., Higashiyama, S., et al., IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine*, 29: 275-282, 2005.
7. Shirakata, Y., Higashiyama, S., et al., Heparin-binding EGF-like growth factor is essential for keratinocyte migration in skin wound healing. *J. Cell Sci.*, 118: 2363-2370, 2005.
8. Mifune, M., Higashiyama, S., et al., G protein coupling and second messenger generation are indispensable for metalloproteinase-dependent, heparin-binding epidermal growth factor shedding through angiotensin II type-1 receptor. *J. Biol. Chem.*, 280: 26592-26599, 2005.
9. Tokumaru, S., Higashiyama, S., et al., Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J. Immunol.*, 175: 4662-4668, 2005.
10. Hirao, F., Higashiyama, S., et al., Alternative recycling of E-cadherin depends on metalloprotease activity of ADAM9. *Exp. Cell Res.*, 12: 331-339, 2005.
11. Kikugawa, T., Higashiyama, S., et al., PLZF regulates Pbx1 transcription and Pbx1-HoxC8 complex leads to androgen-independent prostate cancer proliferation. *Prostate*, 2006, in press.
12. Higashiyama, S. and Nanba, D., ADAM mediated ectodomain shedding of the EGFR ligands in receptor cross talk. *Biochimica. Biophysica. Acta.*, 1751: 110-117, 2005.
13. Machide, M., Matsumoto, K., et al., Contact inhibition of hepatocyte growth regulated by functional association of the c-Met/HGF receptor and LAR protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 2006, in press.
14. Fujiwara, H., Matsumoto, K., et al., Suppression of peritoneal implantation of gastric cancer cells by adenovirus vector-mediated NK4 expression. *Cancer Gene Ther.*, 12: 206-216, 2005.
15. Fukuta, K., Matsumoto, K., et al., Multiple biological responses are induced by glycosylation-deficient hepatocyte growth factor. *Biochem. J.*, 388: 555-562, 2005.
16. Namiki, Y., Matsumoto, K., et al., Preclinical study of a "tailor-made" combination of NK4-expressing gene therapy and gefitinib (ZD1839, Iressatrade mark) for disseminated peritoneal scirrhous gastric cancer. *Int. J. Cancer*, 118:1545-1555, 2006.
17. Murakami, M., Matsumoto, K., et al., Suppression of metastasis of human pancreatic cancer to the liver by transportal injection of recombinant adenoviral NK4 in nude mice. *Int. J. Cancer*, 117: 160-165, 2005.
18. Hosseinkhani, H., Matsumoto, K., et al., Enhanced suppression of tumor growth using a combination of NK4 plasmid DNA-PEG engrafted cationized dextran complex and ultrasound irradiation. *Cancer Gene Ther.*, 2006, in press.
19. Ogura, Y., Matsumoto, K., et al., Peritumoral

- injection of adenovirus vector expressing NK4 combined with gemcitabine treatment suppresses growth and metastasis of human pancreatic cancer cells implanted orthotopically in nude mice and prolongs survival. *Cancer Gene Ther.*, 2006, in press.
20. Ono, K., Matsumoto, K., et al., Involvement of hepatocyte growth factor in the development of bone metastasis of a mouse mammary cancer cell line, BALB/c-MC. *Bone*, 2006, in press.
21. Miyata, S., Kataoka, H., et al., Diverse roles of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) in the growth of glioblastoma cells *in vivo*. *Cancer Lett.*, 227: 83-93, 2005.
22. Tanaka, H., Kataoka, H., et al., Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) is required for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 5687-5698, 2005.
23. Tjin, E., P., M., Kataoka, H., et al., Follicular dendritic cells catalyze hepatocyte growth factor (HGF) activation in the germinal center microenvironment by secreting the serine protease HGF activator. *J. Immunology*, 175: 2807-2813, 2005.
24. Uchinokura, S., Kataoka, H., et al., Role of hepatocyte growth factor activator (HGF activator) in invasive growth of human glioblastoma cells *in vivo*. *Int. J. Cancer*, 118: 583-92, 2006.
25. Sangai, T., Ishii, G., et al., Effect of differences in cancer cells and tumor growth sites on recruiting bone marrow-derived endothelial cells and myofibroblasts in cancer-induced stroma. *Int. J. Cancer*, 115: 885-892, 2005.
26. Kodama, K., Ishii, G., et al., Laminin 5 expression protects against anoikis at aerogenous spread and lepidic growth of human lung adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*, 116: 876-884, 2005.
27. Ishii, G., et al., *In vivo* immunophenotype of bone-marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem cells*, 23: 699-706, 2005.
28. Ishii, G., et al., *In vivo* and *in vitro* characterization of human fibroblast recruited selectively into human cancer stroma. *Int. J. Cancer*, 117: 212-220, 2005.
29. Miyamoto, S., Ishii, G., et al., Blockade of paracrine supply of insulin-like growth factors using neutralizing antibodies suppresses the liver metastasis of human colorectal cancers. *Clin. Cancer Res.*, 11: 3494-502, 2005.
30. Lu, J., Ishii, G., et al., Chemopreventive effect of peroxisome proliferator-activated receptor $\{\gamma\}$ on gastric carcinogenesis in mice. *Cancer Res.*, 65: 4769-4774, 2005.
31. Nakamura, M., Ishii, G., et al., Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. *Biochem Biophys Res Commun.*, 333: 1011-1016, 2005.
32. Tominaga, K., Fujimori, T., et al., Prediction of colorectal neoplasia by quantitative analysis of estrogen receptor gene in non-neoplastic epithelium from patients with ulcerative colitis. *Clin Cancer Res.*, 11: 8880-8885, 2005.
33. Fujii, S., Fujimori, T., et al., Methylation of the oestrogen receptor gene in non-neoplastic epithelium as a marker of colorectal neoplasia risk in longstanding and extensive ulcerative colitis. *Gut*, 54: 1287-1292, 2005.
34. Chibana, Y., Fujimori, T., et al., Tumor cell dissociation score highly correlates with lymph node metastasis in superficial esophageal carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 20: 1371-1378, 2005.
35. Suzuki, H., et al., Lung adenocarcinoma and invasion. In: *Progress in Oncogene Research* (ed. Peale LS), Chapter V, p127-148, Nova Science Publishers, NY, 2005.
36. Yaguchi, M., Takiguchi, S., et al., Identification and characterization of the variants of metastasis-associated protein 1 generated following alternative splicing. *Biochem. Biophys. Acta*, 1732: 8-14, 2005.