

平成 21 年 6 月 2 日現在

**研究種目：基盤研究 (C)**  
**研究期間：2007～2008**  
**課題番号：19590323**  
**研究課題名 (和文)**  
**PDGFd 関連因子を標的とした悪性中皮腫診断および治療法確立への試み**  
**研究課題名 (英文)**  
**Meaning of factors which are related to PDGFd in malignant mesothelioma diagnosis and establishment of new therapy.**  
**研究代表者**  
**山本 英幸 (YAMAMOTO HIDEYUKI)**  
**兵庫医科大学・医学部・助教**  
**研究者番号：70373529**

## 研究成果の概要：

悪性中皮腫の早期診断・治療法の確立を実現化するため、我々は悪性中皮腫由来細胞株において高発現している PDGFd (血小板由来増殖因子 d) に注目した。我々は PDGFd そのものが早期発見に必須の因子である可能性を示したのみならず、PDGFd の活性をタンパク質レベルで制御するウロキナーゼおよびウロキナーゼ受容体、あるいは転写レベルで調節する (タンパク質の設計図である mRNA の量的な調節) アンジオテンシン II 受容体阻害薬が新規治療薬開発のキーとなる事を示唆した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：医化学一般・分子腫瘍学

キーワード：血小板由来増殖因子 d、悪性中皮腫、早期発見、治療法

## 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫はかなり稀な腫瘍であり、この中で最も多いとされる悪性胸膜中皮腫でさえ、その発生率は肺癌の 1% 程度である事が知られている。しかしながら、胸膜および腹膜中皮腫の発生はアスベストの吸引が原因であり、アスベストを取扱う労働者やその家族あるいは取扱い施設の周辺住民に高頻度で発症する事が知られ、関西の企業が社会責任を問われ

たニュースは記憶に新しい。

悪性中皮腫はアスベスト暴露後約 20～40 年後に突然発症し、発症 2 年後の生存率は約 30%、発症 5 年後の生存率は 10% 以下とされる極めて重篤な疾病であり、このような厳しい状況は早期発見につながる健診方法が確立されていない事、従来の外科療法・放射線療法・化学療法などが十分な治療効果を発揮しない事に起因する。また、我国のアスベスト輸入量のピークが 1970 年代半ばであり、潜伏期

間が平均30年である事を考慮すると、我国における悪性中皮腫の罹患および死亡者数は今後ますます増加すると予測される。悪性中皮腫に対する治療動向に関しては、新規葉酸拮抗薬であるペメトレキセドとシスプラチンの併用療法が患者の生存期間を30%延長させる効果があるとして、日本イーライリリー株式会社から厚生労働省へ2006年6月に製造販売承認申請がなされているが、根治につながる可能性は低く、重度の副作用も避けられないためQOLの向上も期待できない状況である。また、外科療法は解剖学的限界から局所再発率が極めて高く、温熱化学療法は限られた症例にしか効果を発揮しないといった問題点が残されたままであり、今後は放射線治療などを組み合わせた新規治療法の確立を待たねばならない状況である。

## 2. 研究の目的

(1) PDGFd やその活性を制御するウロキナーゼが悪性中皮腫の増殖・移動・浸潤といった諸性質を亢進させている事を示唆する結果を得ていたため、液性因子であるこれらの量的変化が胸水・腹水・末梢血に反映されると仮定し、末梢血を用いた新規診断システムの構築を目的とした。

(2) PDGFd の活性をタンパク質レベルで制御するウロキナーゼ、ウロキナーゼ受容体を標的とした治療法(治療薬)の検索を目的とした。

(3) PDGFd 遺伝子の転写を抑制する因子(細胞内シグナル)を標的とした治療法(治療薬)の検索を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 兵庫医科大学病院において悪性中皮腫患者より血液検体を入手。さらに、ボランティアを募り健常者の血液検体を入手する。ウエスタンブロット法あるいは ELIA 法によって血清中に含まれる PDGFd およびウロキナーゼの定量をおこない、健常者と悪性中皮腫患者に量的な差があるかどうかを解析する。また、悪性中皮腫の重篤度と PDGFd タンパク質量に相関関係があるかどうかを確認する。

(2) 以前の解析に用いた欧米人由来の細胞株以外に、日本人の悪性中皮腫患者から単離された悪性中皮腫細胞株である Meso1 および Meso4 の遺伝子発現解析。

(3) 既存の医療薬の中から PDGFd、ウロキ

ナーゼ、ウロキナーゼ受容体などの活性化メカニズムや酵素活性を阻害する作用機序を持つものをピックアップし、悪性中皮腫由来細胞株の増殖を抑制するものを探し出す。

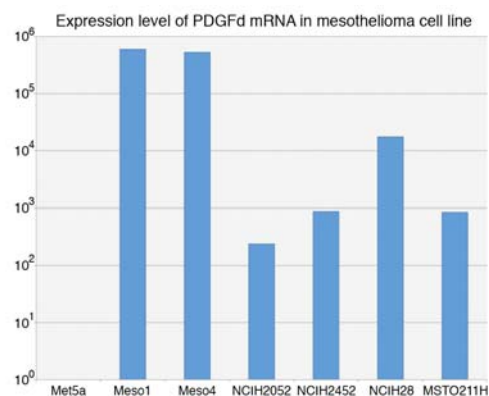
(4) 既存の医療薬の中から PDGFd の転写を抑制する作用を持つものを探し出す。

## 4. 研究成果

(1) 末梢血に含まれるタンパク定量。

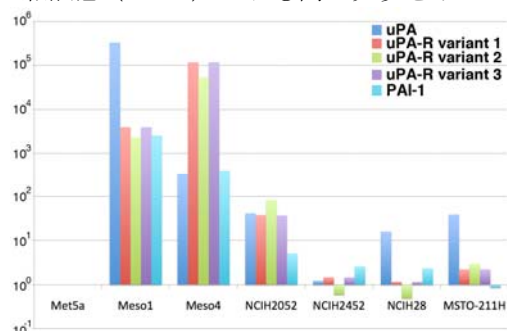
健常者および悪性中皮腫患者から採取した末梢血に含まれる PDGFd のタンパク量が早期診断システムの構築に必須であるが、市販のすべての抗体を用いてウエスタンブロット法および ELISA 法を試みたものの、十分な解析感度を得る事ができず、現在は独自で解析に使用可能なモノクローナル抗体の作成をおこなっている。

(2) 以前の解析に用いた欧米人由来の細胞株に加えて日本人由来の悪性中皮腫由来細胞株を解析に用いた。



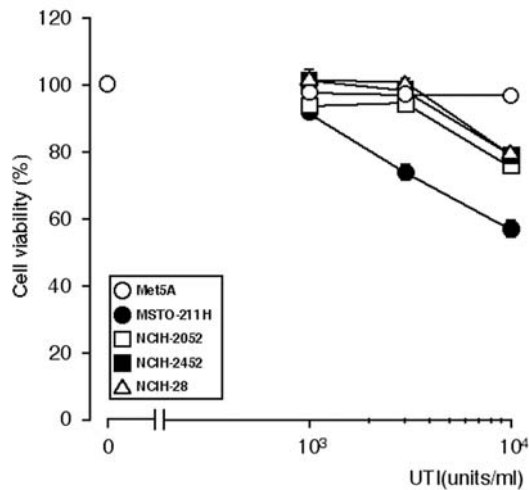
上図に示すとおり日本人由来の悪性中皮腫細胞は特に PDGFd を高発現している事が判明した。

さらに、PDGFd の活性(受容体への結合能変化)を直接制御するウロキナーゼ(uPA)とその受容体(uPAR)の発現を調べたところ、これらの遺伝子も高発現している事が判明した。uPAR には3種類のスプライス・バリエーションが存在し、Vari1は膜結合型、Vari2とVari3は分泌型である事が知られているが、特に膜結合型受容体はすべての細胞株において正常細胞(Met5a)よりも高い発現を示した。



(前項図参照) これらの結果は、PDGFd とそれを活性化する酵素 (uPA)、さらには uPA の酵素活性を安定化させる受容体の 3 因子によって悪性中皮腫の諸性質が決定される事を示唆するのみならず、これらの因子が新規診断法および治療法の標的遺伝子として極めて有用性の高いものである事を示している。

(3) uPA の転写量を抑制する薬剤が悪性中皮腫に与える影響。



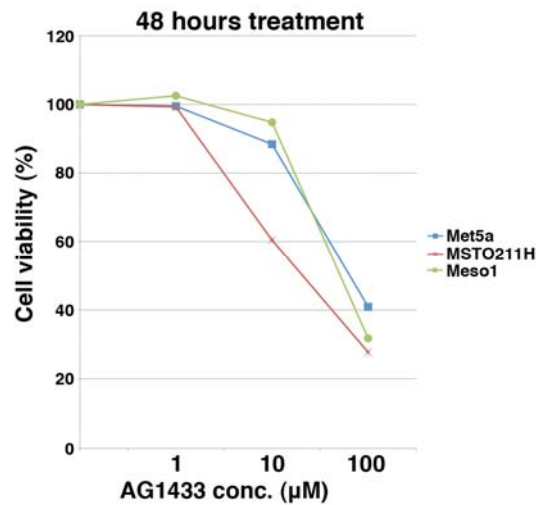
急性膵炎の治療薬として使用されている MIRACLID は生体内分子である UTI (トリプシン・インヒビター) であるが、この UTI は uPA 遺伝子の転写を抑制する事から、悪性中皮腫細胞の増殖に対する影響を解析した。その結果、10,000 units/ml の UTI (24 時間処理) が中皮腫特異的に増殖を抑制する事が判明した。同時に、やはり急性膵炎の治療薬でありトリプシンあるいはカリクレインの阻害薬である FOY の影響を解析したが、FOY は正常中皮細胞・悪性中皮腫細胞のどちらにも影響を与える事はなかった (データ省略)。これらのデータは悪性中皮腫細胞の増殖や生存において、uPA が重要な働きをしている事を示唆するものであり、その働きの一つが PDGFd を切断し活性化するものであると推測される。

(4) PDGF 受容体  $\beta$  に対する阻害薬の影響。

uPA により切断を受けて活性化された PDGFd はホモ・ダイマーを形成し、PDGF 受容体  $\beta$  のホモ・ダイマー (PDGF-R  $\beta$ ) に特異的に結合する事により細胞内シグナルを活性化する事が知られている。そこで、PDGF-R  $\beta$  の特異的阻害薬 AG1433 が悪性中皮腫細胞に与える影響を解析した。(48 時間処理)

その結果、AG1433 の濃度が 100  $\mu$ M の条件において、極めて強力な増殖抑制・細胞死誘導作用がある事が確認された。ただし、この

作用は正常中皮細胞である Met5a においても認められるため、癌細胞特異的な細胞死誘導作用ではない。(下図参照)



この結果は、以前から示唆されているとおり受容体型チロシンキナーゼに対する阻害薬は癌に対する細胞死誘導作用が期待できるものの、正常細胞に対しても同等の効果を持つために甚大な副作用を生じる事を意味している。そして、PDGF-R  $\beta$  が悪性中皮腫細胞の増殖・生存を強力に制御している事を示唆している。以上の事から、PDGFd のタンパク量、PDGFd を切断し活性化する uPA のタンパク量、uPA の酵素活性の安定化に寄与する uPA 受容体量等が悪性中皮腫の増殖・生存に対して極めて重要である事が示唆された。つまり、PDGFd のタンパク量や活性化メカニズムを制御する事によって、悪性中皮腫の増殖や細胞死誘導が制御可能となると考えられる。これらの結果は、PDGFd タンパクおよびその関連因子を悪性中皮腫に対する診断や治療法の標的因子とする事により、早期発見・早期治療の鉄則を適応する新規システムの構築につながる事を意味する。

(5) PDGFd の転写量を抑制する薬剤が悪性中皮腫に与える影響。

近年、血圧調節においてもっとも重要な因子であるアンジオテンシン II によって PDGFd の転写が活性化を受ける事が明らかとなった。そこで、悪性中皮腫細胞自身がレニン-アンジオテンシン系に関与する遺伝子群を発現しているかを解析したところ、日本人由来の細胞株 Meso1 および Meso4 はすべての関連遺伝子を高発現していた。また、欧米人由来の細胞株も関連遺伝子が亢進しているものが認められた。(次項、表中の赤字参照)

これらの結果は悪性中皮腫自身がアクティブなレニン-アンジオテンシン系を保持しており、この状況が PDGFd の高発現を招いている可能性を示唆している。そこで我々は、心筋の保護作用などで注目を浴びている血

圧降下剤であるアンジオテンシン II 受容体 1 阻害薬 (ARB) や ACE 阻害薬が悪性中皮腫の増殖や浸潤に与える影響を解析しつつある。

	Met5a	Meso1	Meso4	NCIH2052	NCIH2452	NCIH28	MSTO211H
Angiotensinogen	1.00	5.80	11.83	0.95	0.38	0.71	0.39
Renin	1.00	7.62	33.14	0.99	0.39	0.64	0.32
ACE V1	1.00	3.01	106.05	44.65	0.59	3.73	5.74
ACE V2	1.00	8.57	16.75	1.91	1.06	0.83	0.28
ACE2	1.00	3.54	7.21	0.40	0.14	0.86	0.19
Chymase	1.00	3.14	42.23	1.03	1.58	0.61	0.56
Cathapsin G	1.00	4.33	11.13	1.66	0.39	0.56	0.35
Cathapsin D	1.00	13.28	16.92	0.87	2.36	9.10	0.88
Angiotensin R1	1.00	3.38	25.66	34.37	0.31	0.65	5.03
Angiotensin R2	1.00	6.79	15.36	7.34	0.79	2.30	0.50

以上のような結果から、今後は急性膵炎の治療薬である MIRACLID や血圧降下剤である ARB・ACE 阻害薬が効果的に悪性中皮腫の増殖や浸潤を抑制する条件を見つけ出す事により、新規治療法の確立が多いに期待できる。さらに、質の良い抗 PDGFd 抗体の作製に成功すれば、末梢血を用いた新規診断システム (ELIZA) の構築が期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 英幸 (YAMAMOTO HIDEYUKI)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70373529

##### (2) 研究分担者

西崎 知之 (NISHIZAKI TOMOYUKI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00221474

永田 徹 (NAGATA TETSU)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60131588

藤川 浩一 (FUJIKAWA HIROKAZU)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40312136

菅野 武史 (KANO TAKESHI)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20434946

矢口 貴博 (YAGUCHI TAKAHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30434947

##### (3) 連携研究者

なし