

平成21年 5月18日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19590899
研究課題名（和文）肺癌の縦隔リンパ節転移抑制を目指す治療法開発のための基礎的研究
研究課題名（英文） Experimental investigation for the development of therapeutic approaches to inhibit metastasis to mediastinal lymph node in lung cancer
研究代表者 近藤 文博（KONDOH TOMOHIRO） 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教 研究者番号：40444690

研究成果の概要：

本研究の目的は、肺癌において最も一般的に認められる縦隔リンパ節転移を抑制する治療法はないかを検証することである。癌転移抑制遺伝子導入を試みる遺伝子治療、転移に関係するとされるムチン関連抗原に対する抗体療法、さらに抗腫瘍効果をうたわれる H2 受容体拮抗薬（シメチジン）の投与の3つを候補として挙げた。その結果、癌転移抑制遺伝子（MRP-1/CD9, KAI-1/CD82）の遺伝子導入により、縦隔リンパ節への転移が著明に抑制されることが明らかとなった。シメチジンには、その抑制効果がないことも判明した。さらに、ムチン関連抗原に対する抗体療法の試みは、その抗原発現細胞のマウス生体内への移植が困難、肺癌リンパ節転移モデルの作製が困難であることも明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、縦隔リンパ節転移、癌転移抑制遺伝子、

1. 研究開始当初の背景

肺癌は、癌死原因の筆頭を占めており、予後の悪い癌の代表である。この原因の一つに、腫瘍が小さくても、高率に転移をきたしていることが挙げられる。特に、縦隔リンパ節へ早期に転移するために、手術適応が非常に狭

められていることは大きな問題である。肺癌の転移、特に早期に発生する縦隔リンパ節への転移を制御する方法を見出すことが出来れば、肺癌治療への貢献は計り知れないものとなるであろう。

2. 研究の目的

マウス肺癌モデルにおける縦隔リンパ節転移に影響を及ぼす可能性のある治療法を探ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

肺癌の縦隔リンパ節転移を抑制する可能性を期待する方法として、3つのアプローチを考案した。すなわち、癌転移抑制遺伝子として知られるテトラスパニンである MRP-1/CD9, KAI-1/CD82 の遺伝子治療、転移に関係するとされるムチン関連抗原である KL-6 に対する抗体を利用する抗体療法、さらに抗腫瘍効果をうたわれる H2 受容体拮抗薬 (シメチジン) の投与、である。

1) CD9/MRP-1 及び CD82/KAI-1 による遺伝子治療モデル

最初に、CD9/MRP-1 及び CD82/KAI-1 をコードしたアデノウィルスベクターの作製を試みた。その後、C57BL/6 マウス肺へ Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞を同所移植した後に、CD9/MRP-1 及び CD82/KAI-1 をコードしたアデノウィルスベクターを経気道投与した。2週間後に、肺内腫瘍へこれらのテトラスパニンの遺伝子が導入されているのかを検証した。そして、導入が確認された場合には、LLC 細胞の同所移植によって生じた腫瘍のサイズの変化及び縦隔リンパ節への転移の程度を検証することとした。

2) 抗 KL-6 抗体療法モデル

KL-6 を高発現しているヒト肺癌細胞 PC3 を入手した。ヒト肺癌細胞であるので移植できるのはヌードマウスである。ヌードマウスを準備し、PC3 細胞をヌードマウス肺内で移植する同所移植モデルの作製を試みた。肺癌様腫瘍組織が形成されることが確認できれば、抗 KL-6 抗体の腹腔内投与を開始し、移植後 2-3 週間後の肺内腫瘍サイズの変化及び縦隔

リンパ節転移の程度を観察することとした。

3) シメチジン投与モデル

最初に、C57BL/6 マウス肺へ Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞を移植する同所移植モデルを作製した。腫瘍細胞移植後より、シメチジンの経口投与を開始し、移植後 3 週間後の肺内腫瘍サイズの変化及び縦隔リンパ節転移の程度を観察した。

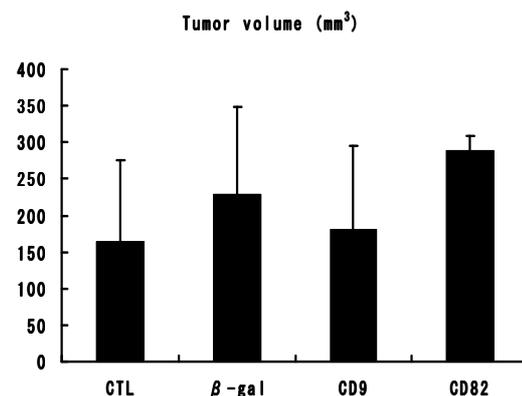
4. 研究成果

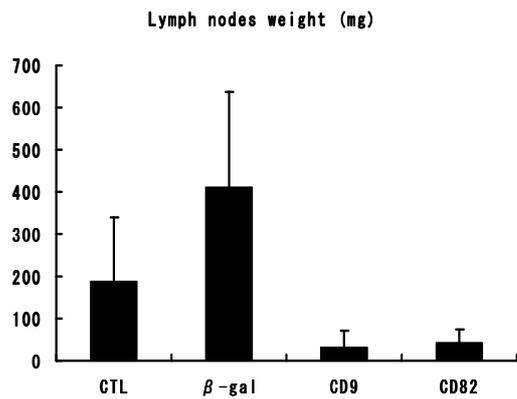
1) CD9/MRP-1 及び CD82/KAI-1 による遺伝子治療モデル

CD9/MRP-1 及び CD82/KAI-1 をコードしたアデノウィルスベクターの作製を試み、その作製に成功した。また、*in vitro* における感染実験にて、LLC 細胞にこれらの遺伝子の導入が可能であることを確認した。

次に、LLC 細胞を C57BL/6 マウス肺への同所移植を行った後に、コントロールとしての β -gal コードアデノウィルス、さらに CD9/MRP-1 及び CD82/KAI-1 をコードしたアデノウィルスベクターの経気道投与を同所移植後 3, 6, 9 日に行った。同所移植後 21 日目に原発腫瘍のサイズ、さらに縦隔リンパ節の重量を計測した。

以下の図に示すように、CD9/MRP-1 及び CD82/KAI-1 の遺伝子治療によって同所移植腫瘍サイズに変化はなかったが、縦隔リンパ節の重量は、CD9/MRP-1 及び CD82/KAI-1 の遺伝子治療群において有意に低いことがわかった。





この結果は、癌転移抑制遺伝子である CD9/MRP-1 及び CD82/KAI-1 の遺伝子治療により、肺癌診療における临床上最も問題となる縦隔リンパ節転移の制御が可能である展望を示すものである。すなわち、縦隔リンパ節転移の有無に関わらず、肺癌が診断された時点で、これらの遺伝子を腫瘍部位へ導入することにより、それ以降の縦隔リンパ節転移をコントロールできる可能性を示すものであり、臨床応用されれば肺癌治療に与えるインパクトは大きいものと考えられる。

2) 抗 KL-6 抗体療法モデル

このアプローチにおいては、まず KL-6 を高発現しているヒト肺癌細胞株 PC3 をヌードマウス肺へ同所移植することで肺癌様の腫瘍が形成されるのかを確かめた。数回の実験を行ったが、残念ながら PC3 のヌードマウスへの同所移植によって肺癌様腫瘍を形成されることが確認されなかった。PC3 はヌードマウス肺内にて腫瘍を形成しないことが判明したが、抗 KL-6 抗体を用いた抗体療法を試みる実験まで到達できなかった。

3) シメチジン投与モデル

LLC 細胞を C57BL/6 マウス肺への同所移植を行った後に、シメチジン 20mg/kg, 200mg/kg 投与する群と投与しないコントロール群の計 3 群を準備した。2008 年度の実験では、シメチジン投与は腫瘍サイズには影響を与え

ないものの、200mg/kg 投与群において縦隔リンパ節転移の程度が低い傾向にある結果が得られた。計 4 回の実験を行って、この結果が追試されるかを検証したが、残念ながら腫瘍サイズ及び縦隔リンパ節の重量に、シメチジン投与による一定の影響が認められず、最終的に、シメチジンに縦隔リンパ節転移抑制作用を認めるとは言いがたいと結論づけた。過去、シメチジンの抗腫瘍効果を示すデータは存在していたが、我々の使用した同所移植肺癌モデルにおいては、抗腫瘍効果、転移抑制効果のないことが判明した。

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 13 件)

1. Kimura T, Yokoyama A, Kohno N, Nakamura H, Eboshida A. Perceived stress, severity of asthma, and quality of life in young adults with asthma. *Allergol Int* (査読有) 58: 2009: 71-79.
2. Onari Y, Yokoyama A, Haruta Y, Nakashima T, Iwamoto H, Hattori N, Kohno N. IL-12p40 is essential for the down-regulation of airway hyperresponsiveness in a mouse model of bronchial asthma with prolonged antigen exposure. *Clin Exp Allergy* (査読有) 39; 2009: 290-298.
3. Iwamoto H, Yokoyama A, Kitahara Y, Ishikawa N, Haruta Y, Yamane K, Hattori N, Hara H, Kohno N. Airflow limitation in smokers is associated with subclinical atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* (査読有) 179; 2009: 35-40.
4. Furonaka M, Hattori N, Tanimoto T, Senoo T, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Yokoyama A, Kohno N. Suplatast tosilate prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* (査読有) 328; 2009: 55-61.
5. Kanehara M, Yokoyama A, Tomoda Y, Shiota N, Iwamoto H, Ishikawa N, Taooka Y, Haruta Y, Hattori N, Kohno N. Anti-inflammatory effects and clinical efficacy of theophylline and tulobuterol in mild-to-moderate

- chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther* (査読有) 21; 2008: 874-878.
6. Nakashima T, Yokoyama A, Onari Y, Shoda H, Haruta Y, Hattori N, Naka T, Kohno N. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits pulmonary inflammation and fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* (査読有) 121; 2008:1269-1276.
 7. Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Tanaka S, Nishino R, Yoshioka K, Ohshimo S, Fujitaka K, Ohnishi H, Hamada H, Arihiro K, Kohno N. Usefulness of monitoring the circulating Krebs von den Lungen-6 levels to predict the clinical outcome of patients with advanced nonsmall cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Int J Cancer* (査読有) 122; 2008: 2612-2620.
 8. Nakashima T, Yokoyama A, Ohnishi H, Hamada H, Ishikawa N, Haruta Y, Hattori N, Tanigawa K, Kohno N. Circulating KL-6/MUC1 as an independent predictor for disseminated intravascular coagulation in acute respiratory distress syndrome. *J Intern Med* (査読有) 263; 2008:432-439.
 9. Ishikawa N, Takano A, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Ito H, Miyagi Y, Nakayama H, Fujita M, Hosokawa M, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y. Cancer-testis antigen lymphocyte antigen 6 complex locus K is a serologic biomarker and a therapeutic target for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* (査読有) 1567; 2007:11601-11611.
 10. Ohtsuki Y, Fujita J, Hachisuka Y, Uomoto M, Okada Y, Yoshinouchi T, Lee GH, Furihata M, Kohno N. Immunohistochemical and immunoelectron microscopic studies of the localization of KL-6 and epithelial membrane antigen (EMA) in presumably normal pulmonary tissue and in interstitial pneumonia. *Med Mol Morphol* (査読有) 40; 2007:198-202.
 11. Taniwaki M, Takano A, Ishikawa N, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y. Activation of KIF4A as a prognostic biomarker and therapeutic target for lung cancer. *Clin Cancer Res* (査読有)

13(22 Pt 1); 2007: 6624-6631.

12. Sakurai J, Hattori N, Nakajima M, Moriya T, Suzuki T, Yokoyama A, Kohno N. Differential expression of the glycosylated forms of MUC1 during lung development. *Eur J Histochem* (査読有) 51; 2007: 95-102.
13. Takeda T, Hattori N, Tokuhara T, Nishimura Y, Yokoyama M, Miyake M. Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node metastasis in orthotopic lung cancer model. *Cancer Res* (査読有) 67; 2007: 1744-1749.

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 丈博 (KONDOH TOMOHIRO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 40444690

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

三宅 正幸 (MIYAKE MASAYUKI)
田附興風会医学研究所・第5研究部・部長
研究者番号: 90250076

河野 修興 (KOHNO NOBUOKI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 80215194