

平成 2009 年 5 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590914
 研究課題名（和文） オステオポンチンを分子標的とした悪性中皮腫の病態解明と治療への応用
 研究課題名（英文） Role of osteopontin in the pathogenesis of malignant mesothelioma
 研究代表者 高橋 和久 (TAKAHASHI KAZUHISA)
 順天堂大学・医学部・教授
 研究者番号：80245711

研究成果の概要：

中皮腫細胞の細胞機能に及ぼすオステオポンチン(OPN)の役割について検討した。OPN 遺伝子を導入することで中皮腫細胞の抗がん剤耐性(ビノレルビン(VNR), ゲムシタビン(GEM), エトポシド(VP16))が誘導された。これら抗がん剤耐性は CD44 とヒアルロン酸(HA)の結合増強に伴う MRP-1(multidrug resistance protein-1)を介することが明らかになった。これらの結果は OPN は中皮腫治療の新しい標的分子になりえることを示唆する。

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	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：呼吸器病学、オステオポンチン、CD44、抗がん剤、中皮腫

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性中皮腫はきわめて抗がん剤耐性のため予後不良の悪性腫瘍である。今後は悪性中皮腫の病態に基づく抗がん剤耐性克服が課題である。

(2) オステオポンチン(OPN)は細胞接着や遊走など様々な機能を有する分子量6万の糖蛋白である。

(3) OPNは小細胞肺癌において抗がん剤耐性に関与することが報告された。

(4) ラットの腹腔にアスベストを投与するとOPNの発現が増強し、また、中皮腫症例に

おける血清OPN値はきわめて高値を呈することから血清OPNは中皮腫のすぐれたバイオマーカーと報告された。しかし、中皮腫病態におけるOPNの役割を検討した報告は皆無である。

2. 研究の目的

本研究においては、OPNの中皮腫病態における役割を細胞レベルで検討し、OPNを標的分子とした中皮腫の治療を目指す。具体的には複数の中皮腫細胞株を用いて、OPNの中皮腫の細胞機能(遊走、接着、アポトーシス、

シグナル伝達)に及ぼす影響を検討した後、抗がん剤感受性に OPN がいかに関与するかについても解析する。

3. 研究の方法

- (1) 悪性中皮腫細胞における OPN の発現解析：肉腫型中皮腫細胞株 H28、2 相型中皮腫 ACC-Meso-1(Meso1)
- (2) 細胞機能検査（増殖、接着、遊走、アポトーシス、シグナル伝達）
- (3) 中皮腫 OPN 遺伝子導入株の樹立
- (4) 抗がん剤感受性試験

4. 研究成果

- (1) OPN の発現：H28 は OPN を強く発現するのにに対して、Meso1 は発現を認めなかった (data not shown)。
- (2) H28 は OPN と濃度依存性に結合する。

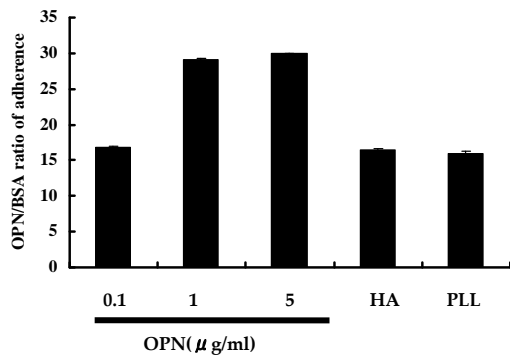


図 1. 接着試験
H28 は OPN に濃度依存性に結合する

- (3) H28 は OPN に対する強い増殖活性と遊走活性を有する。

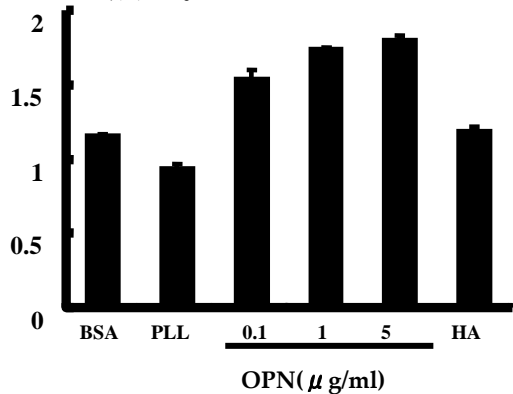


図 2. 細胞増殖試験
H28 は固相化 OPN に対して濃度依存性に増殖活性の高進を認める

- (4) H28 は OPN と結合することで FAK(focal adhesion kinase)の活性化を生じ、抗アポトーシス作用を有する。

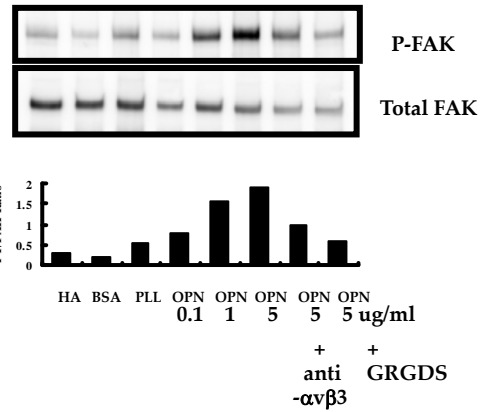


図 3. OPN による H28 細胞内 FAK 磷酸化
OPN は濃度依存性に FAK の磷酸化を生じる。磷酸化は抗 OPN 受容体抗体(αβ3 抗体)あるいは GRGDS ペプチドで阻害される。

- (5) OPN 遺伝子導入株の作成：Meso1 は OPN の発現を認めないため、OPN 遺伝子を BMGneo 発現ベクターに挿入し、遺伝子導入を行った(Meso-1/OPN)。また、コントロールとしてベクターのみを導入した遺伝子導入株も樹立した(Meso-1/Mock)

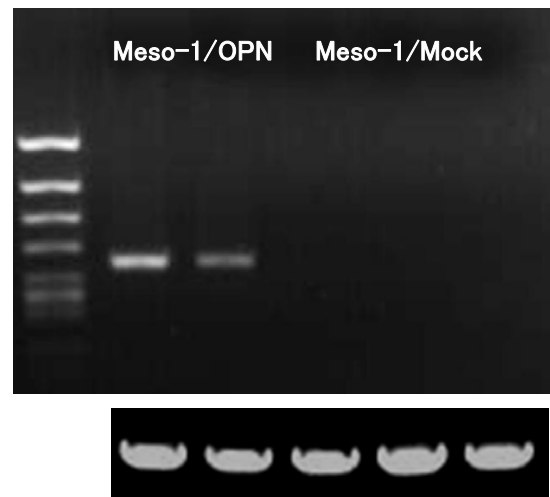


図 1. RT-PCR を用いた Meso1/OPN, Meso1/Mock における OPN 発現の確認。下段は β アクチンによるコントロール

- (6) 抗がん剤感受性試験
Meso-1/OPN と Meso-1/Mock を用い in vitro で VNR, GEM, VP-16, Cisplatin(CDDP) に対する抗がん剤感受性試験を行った。きわめて興味深いことに、Meso-1 は OPN の遺伝子導入を行うことで、CDDP 以外の抗がん剤に対して耐性になった。

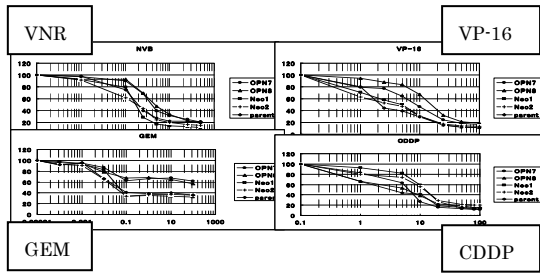


図2. In vitro chemosensitivity assay. Meso-1/OPN は Meso-1/Mock と比較して、VNR, GEM, VP-16 に対して耐性であった。しかし、CDDP に対しては耐性を獲得しなかった。

(7) OPN 遺伝子導入による CD44 発現に及ぼす影響について

Meso-1 に遺伝子導入することで CD44 のアイソフォームに変化が生じ HA に対する結合性が増強した。すなわち、OPN の強制発現させた結果 CD44v8-10 減少した。

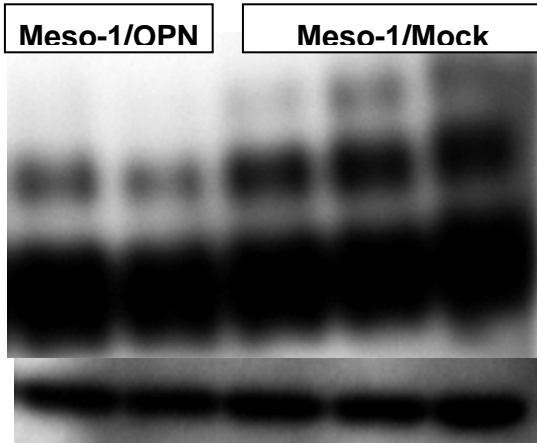


図3. CD44 の western blot.

Meso-1/OPN では CD44v8-10 の高分子量 CD44 アイソフォームが減少した。低分子量の CD44s の発現は不変であった。下段はコントロールの β アクチン

(8) OPNsiRNA, CD44v8-10siRNA の作成
OPN あるいは CD44v8-10 の発現を siRNA 法で減弱させると、これらの抗がん剤(VNR, GEM, VP-16)に対する耐性は消失した。また、CD44 の中和抗体でも同様に Meso-1/OPN の抗がん剤耐性が消失した(data not shown)。

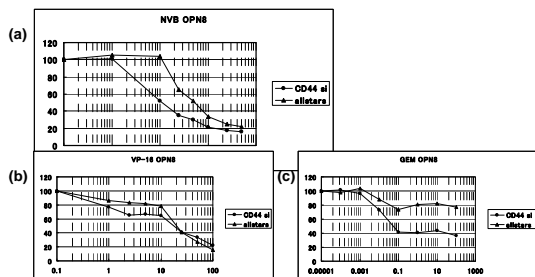


図4. In vitro chemosensitivity assay
OPN の発現を siRNA で減弱させると VNR, GEM, VP-16 に対する抗がん剤耐性が消失した。

(9) Akt のリン酸化について
Meso-1/OPN は HA と CD44 の会合を介して Akt のリン酸化を生じた。

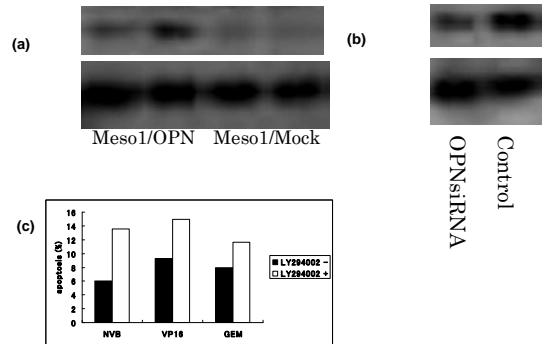


図5. P-Akt の Western Blot

Meso-1/OPN では Meso-1/Mock に比較して Akt のリン酸化が高進していた。一方、OPN の発現を siRNA で減弱させると Akt のリン酸化も減弱した。

(10) MRP-1 の関与について
Meso-1/OPN の抗がん剤耐性(VNR, VP-16) は MK571 で阻害されたが、GEM に対する抗がん剤耐性は MK571 では抑制されなかった。

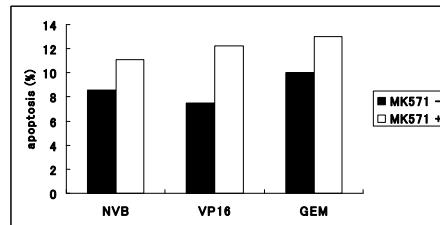


図6. MRP 阻害剤(MK571)による各種抗がん剤によるアポトーシスに及ぼす影響
MK571 で上記抗がん剤に対するアポトーシスは減少した。すなわち抗がん剤感受性に変化した。

以上より、OPN は中皮腫細胞の機能に積極的に関与し、抗がん剤耐性に寄与することが明らかになった。OPN の発現状況に伴う抗がん剤耐性機序は、CD44v8-10 の発現低下に伴う HA との結合性の増強のためと思われた。CD44 の HA との結合増強は、Akt のリン酸化を介し MRP の機能を高進させるためと思われた。しかし、GEM に対する獲得耐性は MRP 以外の機序が関与することが示唆された。今回は、分担研究者である宮元秀昭の退職のため、in vivo および臨床検体での検討は行い得なか

ったが、今後の OPN を標的とした治療が期待される。

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 2 件)

1. Gu T, Takahashi K. Osteopontin is involved in the development of acquired chemo-resistance of cisplatin in small cell lung cancer. Lung Cancer 2009 (in press)

2. Ohashi R, Takahashi K. Osteopontin modulates malignant pleural mesothelioma cell functions in vitro. Anticancer Res.2009 (in press)

[学会発表] (計 2 件)

1. 大橋里奈(高橋和久) オステオポンチンは悪性胸膜中皮腫の細胞機能に影響を与える 第 48 回日本肺癌学会総会 平成 19 年 11 月 9 日 名古屋
2. 田島健 (高橋和久) 胸膜中皮腫におけるオステオポンチンの抗がん剤耐性に対する検討 第 49 回日本肺癌学会総会 平成 20 年 11 月 14 日 小倉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 和久

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80245711

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者