

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590406

研究課題名（和文）

癌転移の多様性に対応するモデルの作製と分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）

Establishment of animal model for various types of cancer metastasis and analysis of the molecular mechanism

研究代表者

杉野 隆（SUGINO TAKASHI）

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90171165

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は転移治療における分子標的の探索である。新たな転移モデルとして乳癌肝転移モデルを樹立した。また、新たな転移関連分子として S100A14 と EMU1 を見いだした。S100A14 は癌細胞の浸潤と転移を促進し、乳癌での発現亢進は不良な予後と相関した。EMU1 は癌細胞の基質への接着を阻害し、細胞の遊離を促進することが明らかになった。これらの分子を標的とした癌の診断・治療法を開発中である。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to explore molecular targets for therapy of cancer metastasis. At first, we established a new model for breast cancer metastasis to liver. Next, we identified S100A14 and EMU1 as novel metastasis-related molecules. Experimentally, S100A14 promoted cancer cell invasion and metastasis and clinically, up-regulated expression of this protein correlated with poor survival of breast cancer patients. EMU1 protein inhibited cell-matrix adhesion and promoted detachment of cancer cells. These molecules can be new targets for drug development in cancer diagnosis and therapies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：癌、転移、実験モデル、腫瘍血管、分子メカニズム

1. 研究開始当初の背景

一般に癌の転移は癌細胞が間質や血管壁を破壊して血中へ入り、転移巣では逆に血管や結合織を浸潤して二次的増殖巣を作るという過程が想定されている（図1）。

これに対し、我々はマウス乳癌モデルを用い、癌細胞が血管壁を浸潤せずに肺に転移巣を作る経路（*invasion-independent pathway*）を見いだした（図2，*Am. J. Pathol.*, 2002）。また、10種類のヒト癌の

血管侵襲像を詳細に観察した結果、多くの癌が血管壁を破壊して血中に入る浸潤型の血管侵襲像を示したのに対し、腎細胞癌、肝細胞癌、甲状腺濾胞癌のほぼ全例および他の種類の癌でも 20~30% の症例に *invasion-independent pathway* を介する血管内侵入像が観察された (*BMC medicine*, 2004)。このことは癌の種類によって、あるいは個々の症例によって転移の様式に大きな多様性があり、関与する分子も大きく異なっていることを意味している。血管壁を破壊するタイプの転移にはおそらく蛋白分解酵素や運動因子など浸潤に関与する分子が大きく関わっていると推定されるが、*invasion-independent pathway* を介する転移には浸潤促進因子とは異なる新たな分子機構が働いていることが想定される。

2. 研究の目的

癌転移に新たな様式 “*invasion-independent pathway*” が見いだされたことにより、転移が一樣な現象でないことが明らかになった。本研究では (1) 転移の新しい様式に関与する分子メカニズムを明らかにすること、(2) 転移の多様性として重要な「臓器特異性転移」についての転移モデルを作製し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Invasion-independent metastasis* を誘導する分子の同定

本研究では *invasion-independent pathway* を介する転移を示すマウス乳癌細胞株 MCH66 から分離樹立した高転移性細胞 66HM と低転移細胞 66LM の遺伝子発現を比較することによってクローニングされた転移関連候補分子について実験的・臨床病理学的な解析を行った。

① 実験的解析 66HM に高発現する転移関連候補遺伝子のうち、S100A14 と EMU1 の 2 つの遺伝子を低転移細胞に遺伝子導入、または、66HM の遺伝子を RNAi により knockdown し、stable transfectants を作製した。これを同系マウスに移植することにより自然転移能が増強するかどうかを検証した。また、分子機能の解析のため、66HM、66LM の他に、ヒトがん細胞株 MCF7、SK-BR-3、ZR-75-1、MDA-MB-231、QG56、PC-1、PC-3、PC13、MKN45、MKN21 を用い、その遺伝子発現を調べた。さらに、いくつかの細胞にこれらの遺伝子を発現する vector、または siRNA を導入して遺伝子発現を変化させ、*in vitro* における細胞増殖能、浸潤能、運動能などを比較した。

② 臨床病理学的解析 S100A14 と EMU1 に対

する抗体を用い、ヒト癌症例におけるタンパクの発現を検出した。発現量をスコア化し、種々の臨床病理学的因子や患者の予後との相関を解析した。

(2) 臓器特異的転移モデルの樹立

マウス乳癌 MCH66 およびその全身転移性細胞亜株 66HM から臓器特異的な転移を示す細胞を選別した。方法は Fidler の方法を改変したものである。すなわち、癌細胞を同所乳腺内に移植し、肺、肝への転移巣を摘出して培養した。これを再び移植し転移した細胞を培養するという操作を繰り返し、各臓器に特異的に転移する細胞を樹立した。転移能のアッセイは移植 6 週後にマウスを屠殺し、肺、肝の転移結節数をカウントした。リンパ節への転移性は全身のリンパ節への転移を肉眼的、顕微鏡的に観察し評価した。また、転移の pathway を確認するために移植 4 週後にマウスを屠殺し、転移の初期像を組織標本で観察した。

4. 研究成果

(1) *Invasion-independent metastasis* を誘導する分子の同定

マウス乳癌細胞 MCH66 から樹立した高転移性細胞 66HM と低転移性細胞 66LM の発現遺伝子を比較することによって得られた 2 つの転移誘導候補遺伝子 S100A14 と EMU1 についての解析結果を示す。

① S100A14 (図 1) カルシウム結合タンパク S100ファミリーのメンバーである。その機能や臨床的な意義はほとんど知られていない。まず、S100A14 とマウス乳がん細胞の転移との関わりを調べるために、S100A14 を knockdown した 66HM (HM-A14-KD) の転移能をアッセイした。HM-A14-KD は mock transfectant に比べて自然転移能が有意に減少した。次に、ヒト乳癌での S100A14 の発現の意義を調べるために乳がん症例 168 例を用いて免疫染色を行い、臨床病理学的に解析した。このタンパクを高度に発現する症例は発現の低い症例に比べて低年齢 (60 才未満)、estrogen receptor 陰性、HER2 陽性と正の相関が見られ、また、患者の予後が有意に不良であることが示された。ヒト乳癌細胞株のうち S100A14 を高度に発現する MCF7、SK-BR-3 を用いた実験では S100A14 が細胞の遊走や浸潤を促進する作用があることが明らかとなった。この分子は乳癌患者の不良な予後を予測するバイオマーカーとして、また、分子治療のターゲット分子となる可能性があり、研究を進める予定である。

② EMU1 (図 2) EMU1 は細胞外基質成分と推測されている分子であるが、その発現や機能はほとんど不明である。我々の組織標本

を用いた解析ではこのタンパクは正常組織にはほとんど発現がなく、がん間質に特異的に発現することが明らかとなった。EMU1を遺伝子導入した66LM細胞を移植した場合、このタンパクはがん間質に沈着し、類洞状血管の周囲に分布する傾向がみられた。今後、このタンパク質を用いたがん診断システムやEMU1を標的としたDDS抗がん剤の開発の可能性を検討する。

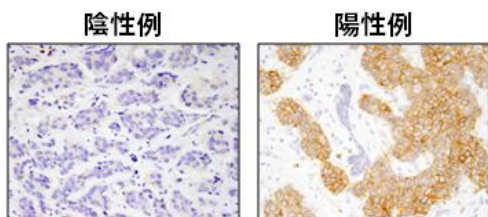
(2) 臓器特異的転移モデルの樹立 (図3)

がんの臓器特異性転移に関わる分子機構を明らかにするために、マウス乳癌細胞を用いて肝、肺、リンパ節へ高転移する細胞の選別を試みた。本研究では肝に高度に転移する細胞 HM-KAN5 を樹立することができた。HM-KAN5 を乳腺内に同所移植した場合の肝への自然転移結節数は有意に増加した。移植4週後の観察では肝類洞内に数個の癌

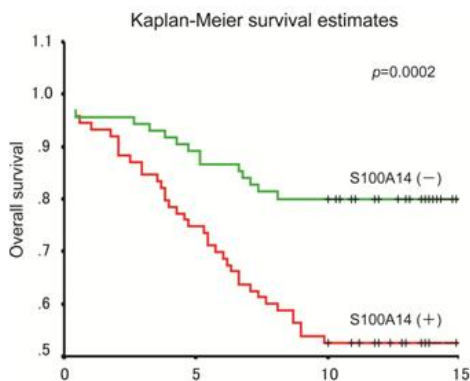
細胞が塞栓する初期転移巣を認めた。初期転移巣の数はHM-PとKAN1-5の間に差を認めなかったが、HM-Pの転移巣には炎症細胞が動員され癌細胞の多くが細胞死に陥っていた。このことからこの細胞系で亢進した肝転移能は肝における細胞の生存と増殖に依存すると推定された。In vitroではHM-Pがシート状に増殖したのに対し、HM-KANsはpile-upし、さらに浮遊してanoikis抵抗性を示した。これらの細胞は乳癌の予後に重要な肝転移のモデルとして有用であると考えられる。現在、これらの細胞における発現遺伝子の差異を3D-Gene Mouse Oligo chip (TOYOBO)を用いて解析中である。

図1

S100A14はヒト乳癌の細胞膜に発現する



S100A14はヒト乳癌の予後と相関する



S100A14は細胞の浸潤を促進する

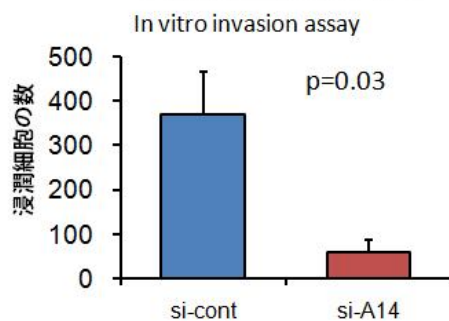
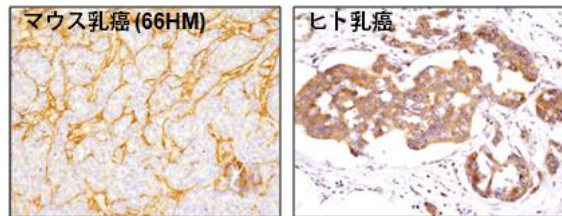


図2

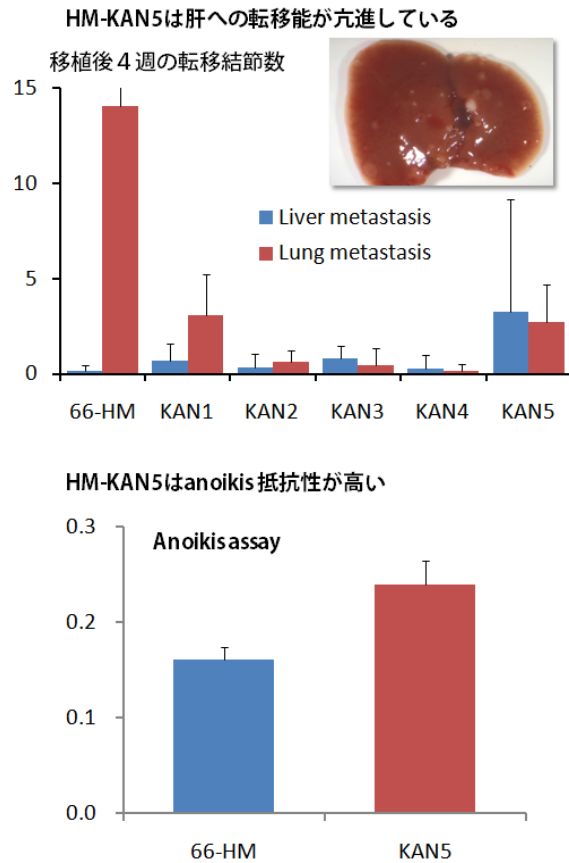
EMU1は細胞外に沈着する



organs	positivity
esophagus	-
stomach cardia	++
stomach pylorus	-
intestine	-
liver	-
pancreas	++
lung	-
heart	-
thymus	-
skin	-
mammary gland	-
uterus	-
ovary	-
placenta	-
prostate	-
kidney	+
urinary bladder	-
thyroid	-
adrenal	-
spleen	-
skeletal muscle	-
brain	-

Cancers	n	positive
Breast	8	4 (50%)
Kidney	16	6 (38%)
Liver	9	2 (22%)
Lung	143	23 (16%)
Stomach	7	0 (0%)
esophagus	5	0 (0%)
total	184	40 (22%)

図 3



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 11 件)

- ① Taniguchi Y, Kawano K, Minowa T, Sugino T, Shimojo Y, Maitani Y. Enhanced antitumor efficacy of folate-linked liposomal doxorubicin with TGF- β type I receptor inhibitor, *Cancer Sci*, 査読有, 101, 2010, 2207-2213.
- ② Kuroda J, Kuratsu J, Yasunaga M, Kog Y, Kenmotsu H, Sugino T, Matsumura Y. Antitumor Effect of NK012, SN-38 Incorporating Polymeric Micelle, on U87MG Orthotopic Glioblastoma Compared with CPT-11 in Combination with Bevacizumab. *Clin Cancer Res*, 査読有, 16(2), 2010, 521-529.
- ③ Nagano T, Yasunaga M, Goto K, Kenmotsu H, Koga Y, Kuroda J, Nishimura Y, Sugino T, Nishiwaki Y, Matsumura Y, Synergistic antitumor activity of the SN-38-incorporating polymeric micelles NK012 with S-1 in a mouse model of non-small cell lung cancer, *Int J Cancer*, 査読有, 127, 2010, 2699-2706.

Sugino T, (6 名中 1 番目), Overexpression of fatty acid synthase in human urinary bladder cancer and combined expression of

④ the synthase and Ki-67 as a predictor of prognosis of cancer patients, *Med Mol Morphol*. 査読有, 2010, in print.

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 杉野隆、乳癌における S100A14 発現の臨床的意義と分子機能解析、第 100 回病理学会総会、2011 年 4 月 28 日、横浜
- ② 杉野隆、マウス乳癌を用いた自然肝転移モデルの作製、第 19 回日本がん転移学会学術集会、2010 年 6 月 16 日、金沢
- ③ 杉野隆、浸潤非依存性転移モデルの開発と分子メカニズムの解明、第 54 回日本病理学会秋期特別総会(A 演説)、2008 年 11 月 20 日、松山
- ④ 杉野隆、マウス乳癌を用いた癌転移モデルの開発とヒト癌への応用、第 18 回乳癌基礎研究会(特別講演)、2008 年 7 月、福島

〔図書〕(計 4 件)

- ① 杉野隆、田中瑞子、秀潤社、細胞工学別冊 転移のプロセスとその要因、2010 年、209-213
- ② 杉野隆、鈴木利光、西村書店、ダイナミック病理学 腫瘍、2010 年、50-75
- ③ 杉野隆、鈴木利光、西村書店、ダイナミック病理学 腎・尿路系、2010 年、672-678
- ④ 杉野隆、金芳堂、日本がん転移学会書 がん転移研究の実験的手法、2008 年、298-302

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉野 隆 (SUGINO TAKASHI)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90171165

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし