

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22700912

研究課題名（和文）ノッチシグナルを標的とした悪性中皮腫に対する分子標的治療

研究課題名（英文）The effect of Notch signaling on malignant mesothelioma cell growth and survival interval in an implant animal model of malignant mesothelioma

研究代表者 矢満田 慎介

(YAMANDA SHINSUKE)

東北大学 加齢医学研究所 非常勤講師

研究者番号：80571447

研究成果の概要（和文）：

in vitro, Notch シグナルのリガンドの一つである Delta-like 4 の中和抗体の投与により、6 種類のヒト悪性中皮腫細胞の増殖への(用量依存的な)抑制効果が観察された。この効果は細胞周期(特に DAN の合成)の抑制によることを見だした。細胞内のシグナルの検討の結果としては中和抗体の投与が細胞の phospho-p53 の発現量を増加した。ところが、中和抗体と Notch シグナル阻害剤である γ -secretase inhibitor のヒト悪性中皮腫モデルマウスへ投与したところ、有意な癌成長の抑制と生存期間の延長効果が観察されなかった。

研究成果の概要（英文）：

In vitro, Delta-like 4-selective neutralizing antibody treatment significantly impaired the cell proliferation rate of malignant mesothelioma (MM) cell lines, which was accompanied by an increase in phosphor-p53 levels. These effects partly involved induction of growth arrest to MM cells. *In vivo*, treatments with Delta-like 4-selective neutralizing antibody and γ -secretase inhibitor (an inhibition of Notch signaling) not significantly decreased the growth rate of MM. Finally, Delta-like 4-selective neutralizing antibody treatment also not significantly extended survival interval in an implant animal model of MM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：分子標的治療、ヒト悪性中皮腫

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は、その予後不良な性質と石綿暴露という社会的な因子の関与から大きな関心を持たれている。また、本邦の石綿輸入量のピークと、石綿暴露からの潜伏期間を考慮すると、その罹患と死亡は今後増え続けると思われ、その治療法の開発は急務である。

Notch シグナルは個体の発生・分化・増殖に関わる経路で、悪性腫瘍の進展において様々な役割を果たしており、我々はマウス肺癌モデルにおいて、その Notch シグナルのリガンドの一つである Delta-like4 (DLL4) を阻害することにより腫瘍の成長を抑制し、その機序を解明することに成功している(Yamanda S., et al, Blood. 2009;113:3631-3639)。また、我々は *in vitro* にて悪性中皮腫細胞に Notch シグナル系が発現していることを確認している(データ未発表)。

そこで我々はこれらの経験と知見を生かし、肺癌以上に予後不良である悪性中皮腫における Notch シグナルの役割を明らかにし、治療へと応用することを目指す。

2. 研究の目的

Notch シグナルは、ショウジョウバエから哺乳類に至るまで高度に保存されており、そのシグナルは種々の悪性腫瘍においても活性化していることが知られている。しかしながら、悪性中皮腫における Notch シグナルの役割は未だ明らかでない。そこで、我々は本邦において今後数十年は増え続けるであろう悪性中皮腫における Notch シグナルの役割を明らかにし、それを元に新たな分子標的治療を開発する。

3. 研究の方法

平成 22 年度(初年度)

マスクの飼育は東北大学医学部附属動物実験等で行う。また、医局研究室及び、東北大学の胸痛実験室の機器を用いて実験を行う。我々はこれらの施設及び機器

を用いて、現在までに腫瘍増殖・腫瘍血管新生に関する多くの研究を行っており、それを報告してきている(Asada M, et al, Yamanda S, Int J Cancer 123, 511-8, 2005, Okazaki T, Yamanda s, et al, Am J Pathol 171, 1093-103, 2007)。今回のテーマである Notch シグナルに関する研究もこの環境で行い、既に一定の成果を出している。また、この動物実験棟は、平成 22 年度には小動物の CT 撮影が可能になり、マウスを屠殺することなく、経時的に観察することが可能になるだろう。まずは、ウエスタンブロッティング、RT-PCR、フローサイトメトリー(FCM)を用いて、ヒトの中皮腫細胞である MST0-211H における、Notch シグナルの発現及び、我々の用いる各種抗体による *in vitro* での細胞増殖及び細胞死への影響を検討する。この系に関しては、我々は以前の実験系にて既に確立している。その実験で、標的となる Notch シグナル分子(予備実験では Jagged1)を選定し、SCIDマウスを用いた胸腔内悪性中皮腫モデルにおいて、その効果を形態学的な手法及び、分子生物学的な手法を用いて検討する。また、抗体は抗ヒトを抗マウスがあり、それぞれ交叉活性はない。その事を利用して、腫瘍内の Notch シグナルが、腫瘍細胞同士で働いているのか、腫瘍周囲の細胞(血管内皮細胞など)と腫瘍細胞で働いているのかを明らかに出来る。このことは、腫瘍の微小環境を知る上で非常に重要な知見になると思われる。

平成 23 年度

前年度の研究成果を元に、至適用量の設定、細胞障害性薬剤との併用効果を検討する。また、前年度の実験結果がどのようなメカニズムに基づくものなのかを検証する。

4. 研究成果

in vitro cell counting kit (WST-8)を用いて、Notch シグナルのリガンドの一つである Delta-like 4 の中和抗体の投与

による6種類のヒト悪性中皮腫細胞の増殖への影響を検討した結果、3日目の時点で低用量(50 μ g/ml)では、約20%;高用量(500 μ g/ml)では約70-80%の細胞増殖の抑制が見られた。また、用量依存性(50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, and 500 μ g/ml)の細胞増殖の抑制も観察された。更に、BrdU/7-AAD kitを用いた細胞周期解析により、1日目の時点で高用量(500 μ g/ml)はDNA合成期の細胞が約30%(無添加:15%;500 μ g/ml Delta-like 4の中和抗体:4.5%)抑制された。これらの結果から、Delta-like 4の中和抗体は細胞周期(特にDNAの合成)の抑制により、細胞の増殖を抑制したことが示唆された。増殖の抑制のメカニズムを検討するために、Western blotting analysisを用いて、癌抑制遺伝子 p53 に注目し、Delta-like 4の中和抗体の投与による影響を検討した。1日目の時点で用量と関係なく、約20%の活性化 p53 の発現の増加が観察された。

in vivo, 6週齢 SCID マウス 18匹(体重, 平均 \pm 標準偏差: 22.5 \pm 1.1g)を購入し, 1週間後に体重を測った上で無作為に3群に分けた(群1: 対照群 [8匹]; 群2: γ -secretase inhibitor の投与群 [Notchシグナル阻害剤であり, 本実験の中で positive control として取り入れた, 5匹]; 群3: Delta-like 4 中和抗体の投与群, 5匹)。介入前の各群の体重(平均 \pm 標準偏差)は別々に群1 (21.6 \pm 0.7), 群2 (22.2 \pm 1.2), 群3 (21.5 \pm 0.9) でした ($P=0.85$)。翌日に, 3 \times 10⁶ /300 μ l PBS/MST0-211H cells を SCID マウスの皮下に注入し, mesothelioma 皮下モデルマウスを作製した。5日後から, 群1 に 500 μ l / PBS/150 μ l DMSO/d; 群2 に 5mg/kg/d 体重の γ -secretase inhibitor ; 群3 に 100mg/kg/d の Delta-like 4 の中和抗体の腹内投与を行なった。1週間後から毎日癌の大きさを測り, 4週間後に体重を測り, マウスを殺した上で癌を取り出し, 重さを測った。介入後の各群の体重 (g), 癌サイズ (幅² \times 長さ \times 0.52 [mm³]により計算された)

及び癌の重さ (g) (平均 \pm 標準偏差)は別々に群1, 21.8 \pm 1.1, 1240.8 \pm 432.0, 0.58 \pm 0.08; 群2, 22.5 \pm 0.7, 696.3 \pm 292.6, 0.51 \pm 0.06; 群3, 21.5 \pm 1.8, 669.7 \pm 243.2, 0.57 \pm 0.10 でした ($P=0.41, 0.02$ [群2と3は群1に比べ, $P<0.05$], 0.29)。更に, もっと臨床に近いモデル(胸腔モデル)を作成し, γ -secretase inhibitor と Delta-like 4 中和抗体はモデルマウスの生存率に対する影響も検討した。まず, 胸腔モデルを作成するために, 胸腔の中で成長できる細胞の種類の検討を行なった。それから, どれぐらいの細胞を投与すればいいかを検討した。結果として, 6種類の細胞の中に1種類だけ SCID マウス胸腔の中で生長できることを確認した。更に 10⁵ cells/マウス, 10⁶ cells/マウス及び 10⁷ cells/マウスの3細胞濃度で SCID マウスに投与したところ(5匹/群), 別々の生存期間の中央値(範囲)は40日(35-50日), 29日(25-33日)と20日(13-29日)であった。臨床では悪性中皮腫の生存期間がきわめて短いことから, 10⁷ cells/マウスの細胞投与量が AICAR 投与の試験に使われた。マウスの胸腔に悪性中皮腫細胞を注入し, 5日後から, 1kg 体重あたり 5mg の γ -secretase inhibitor と 100mg の Delta-like 4 の中和抗体の腹内投与を毎日投与した。対照群では 500 μ l / PBS/150 μ l DMSO/d を投与した。生存期間を評価したところ, 対照群の生存期間の中央値(範囲)は21日(14-23日)であった。これに比べて, γ -secretase inhibitor と Delta-like 4 の中和抗体の投与群の生存期間の中央値(範囲)は別々に23日(17-27日)と24日(19-28)であった ($P>0.37$)。

以上の結果から, Delta-like 4 シグナルがヒト悪性中皮腫の *in vivo* での成長を抑制しないだけでなく, 生存期間の延長にも役立たない可能性が示唆された。本研究では *in vivo* の結果は *in vitro* の結果とも一致しなかった。その原因に関しては Delta-like 4 の中和抗体がなんらかの体内要素による影響を受け, その細

胞増殖抑制作用が見られなかった可能性がある。今後その要素を見つけ、排除することにより Delta-like 4 の中和抗体は癌の成長抑制効果を発揮する可能性が更に詳しく検討すべきと考えられる。

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 1 件)

Kaijun Niu, Masanori Asada, Tatsuma Okazaki, Shinsuke Yamanda, Takae Ebihara, Hui Guo, Dongying Zhang, Ryoichi Nagatomi, Hiroyuki Arai, Masahiro Kohzuki, and Satoru Ebihara. Adiponectin pathway attenuates malignant mesothelioma cell growth. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011, in press (10.1165/rcmb.2011-00680C) (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

牛凱軍、海老原覚、浅田成紀、矢満田慎介、岡崎達馬、荒井啓行、永富良一 AMP 活性化プロテインキナーゼ活性化と悪性中皮腫 第 50 回日本呼吸器学会学術講演会、2010 年 04 月 24 日、京都・国立京都国際会館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢満田 慎介 (YAMANDA SHINSUKE)
東北大学・加齢医学研究所・非常勤講師
研究者番号：80571447

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：